

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROMANA ROŠIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROMANA ROŠIČ

**PROUČEVANJE HIDROGELOV ZA VLAŽNO CELJENJE RAN Z
VGRAJENIM MODELNIM PROTEINOM**

PROTEIN LOADED HYDROGELS AS DRESSINGS FOR MOIST
WOUND HEALING

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Saše Baumgartner, mag.farm.

Iskrena hvala mentoriciizr.prof.dr. Saši Baumgartner, mag.farm. za strokovno pomoč, trud, razumevanje in optimizem pri izvedbi diplomske naloge.

Za koristne nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju se zahvaljujem tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo.

Nenazadnje, pa vendar iz vsega srca, se zahvaljujem tudi svoji družini, ki brez izjem vedno verjame vame.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentoriceizr.prof.dr. Saše Baumgartner, mag.farm.

Ljubljana, september 2009

Predsednik diplomske komisije: prof.dr. Danijel Kikelj, mag.farm.

Član diplomske komisije: doc.dr. Iztok Grabnar, mag.farm.

VSEBINA

VSEBINA	2
1. POVZETEK	4
2. SEZNAM OKRAJŠAV	6
3. UVOD	7
3.1. FIZIOLOGIJA CELJENJA RAN	7
3.1.1 Obdobje hemostaze	8
3.1.2 Obdobje vnetja	8
3.1.3 Obdobje proliferacije	9
3.1.4 Obdobje maturacije	10
3.2. RASTNI FAKTORJI IN PROTEAZE V RANAH	10
3.2.1 Rastni faktorji	10
3.2.2 Proteaze	11
3.2.3 Cisteinske proteaze	12
3.3. KRONIČNE RANE	12
3.3.1 Procesi v kronični rani	13
3.3.2 Nesorazmerje med rastnimi faktorji in proteazami v kronični rani	13
3.3.3 Cistatini – inhibitorji cisteinskih proteaz	14
3.3.4 Zdravljenje kroničnih ran	15
3.4. SODOBNI MATERIALI ZA OBLOGE ZA VLAŽNO CELJENJE RAN	17
3.4.1 Izbor optimalnega polimera za sodobno oblogo	18
3.5. DOSTAVA PROTEINSKIH MOLEKUL IZ HIDROGELOV	20
3.5.1 Lastnosti hidrogelov	20
3.5.2 Uporaba hidrogelov	21
3.5.3 Primernost hidrogelov za dostavo proteinov	21
3.5.4 Dosedanje raziskave na področju vlažnega celjenja kroničnih ran	21
3.6. POLIMERI ZA IZDELAVO HIDROGELOV ZA VLAŽNO CELJENJE	23
3.6.1 Hidroksietilceluloza (HEC)	23
3.6.2 Ksantan	24
3.7. REOLOŠKO VREDNOTENJE HIDROGELOV	25
4. NAMEN DELA	28
5. EKSPERIMENTALNO DELO	29
5.1 MATERIALI	29
5.2 NAPRAVE	30
5.3 POSTOPKI IN METODE	31
5.3.1 Priprava hidrogelov	31
5.3.2 Reološko vrednotenje hidrogelov	32
5.3.3 Sterilizacija z vodno paro	32
5.3.4 Hidrogel z vgrajenim albuminom	33
5.3.5 Preskus sproščanja albumina iz hidrogela	34
5.3.6 Liofilizacija hidrogelov	37

5.3.7 Rehidracija liofiliziranih vzorcev	39
6. REZULTATI IN RAZPRAVA	40
6.1 REZULTATI REOLOŠKEGA VREDNOTENJA KOMERCIALNIH HIDROGELOV: Purilon[®], Tegaderm[®], Intrasite[®]	40
6.2 IZBIRA SESTAVIN ZA IZDELAVO HIDROGELOV	43
6.3 IZBIRA USTREZNE KONCENTRACIJE POLIMERA ZA IZDELAVO HIDROGELOV IN NJIHOVA STERILIZACIJA	44
6.4 STABILNOSTI ALBUMINA IN ENAKOMERNOST PORAZDELITVE PO HIDROGELU	48
6.4.1 Določitev enačbe umeritvene premice	48
6.4.2 Stabilnost albumina in enakomernost porazdelitve po hidrogelu	50
6.5 SPROŠČANJE ALBUMINA IZ HIDROGELA	52
6.5.1 Sproščanje albumina iz 3% HEC hidrogela	52
6.5.2. Vrednotenje hidrogelov po liofilizaciji	59
7. SKLEP	66
8. LITERATURA	69

1. POVZETEK

Sodoben pristop k celjenju ran temelji na vzdrževanju vlažnega mikrokolja na rani, kar prinaša številne prednosti pred klasično oskrbo ran. Raziskave so pokazale, da se kronične rane ne celijo zaradi porušenega ravnovesja med ravnimi faktorji in proteazami. Zaradi prevelike aktivnosti proteaz v ranah prevladujejo procesi razgradnje. Če takšni rani dodajamo rastne faktorje ali inhibiramo proteaze, premagamo uničujoče delovanje proteaz, ponovno se vzpostavi ravnovesje in s tem izboljša celjenje.

Kot sodobne obloge za vlažno celjenje ran se nam ponujajo hidrogeli. Ti zaradi svoje visoke vsebnosti vode zagotavljajo na rani vlažno okolje, hkrati pa je okolje v hidrogelu primerno za dostavo proteinov brez porušanja njihove native strukture.

Namen našega dela je bil razvoj ter proučevanje hidrogelov, ki bodo omogočili nadzorovano sproščanje vgrajenega proteina ves čas zadrževanja obloge na rani. Vgrajeni protein je predstavljal modelni protein za proteazni inhibitor cistatin. Ker je stabilnost proteinov v hidrogelu običajno slabša kot v suhem stanju, smo hidrokele posušili z liofilizacijo. Ugotavljali smo, ali različni načini zamrzovanja ter celoten proces liofilizacije vplivajo na kinetiko sproščanja proteina iz hidrogela po rehidraciji. Ideja celotnega dela je bila, da bi se sistem shranjeval kot liofiliziran suh vzorec, saj je tako bolj zaščiten tudi pred mikrobiološko kontaminacijo. Vzorec bi pred nanosom rehidrirali in s tem ponovno pridobili hidrogel, le tega pa bi aplicirali na rano.

Najprej smo z rotacijsko reometrijo proučili reološke lastnosti komercialnih hidrogelov, njihove viskoznosti pa so nam predstavljale referenčne vrednosti. Nato smo iz širokega nabora hidrofilnih biokompatibilnih polimerov, ki so primerni za oblikovanje sodobnih oblog, izbrali hidroksietilcelulozo in ksantan ter pripravili različno koncentrirane hidrokele. Kot hidrogela s primerno viskoznostjo sta se izkazala 3% hidrogel iz hidroksietilceluloze in 6% hidrogel iz viskoviskoznega ksantana. Ker je struktura hidrogela iz HEC manj občutljiva na povišano temperaturo pri sterilizaciji ter ionsko moč in pH medija, smo nadaljnjo raziskovalno delo izvajali le na hidrogelu iz HEC, v katerega smo vgradili jajčni albumin kot modelni protein. Ovrednotili smo stabilnost proteina vgrajenega v hidrogel, poiskali optimalen postopek izdelave hidrogela ter spremljali štiridnevno sproščanje albumina z modelom, ki smo ga delno razvili sami.

Ugotovili smo, da je protein po vgradnji v hidrogel stabilen. Najverjetneje se ohranja njegova nativna struktura, saj smo s HPLC analizo potrdili enak retencijski čas in obliko kromatografskih vrhov. Za dokončno potrditev pa bi morali izvesti preskus aktivnosti proteina, kar za jajčni albumin ni mogoče. To bi izvedli v primeru cistatina. Izkazalo se je, da ročni način izdelave hidrogela omogoči homogeno porazdelitev proteina po celotnem hidrogelu.

Večdnevno sproščanje proteina iz HEC hidrogela poteka po procesu dvofazne kinetike, z nekoliko hitrejšim začetkom do 10 h, temu sledi sproščanje s kinetiko po ničtem redu.

Vzorci smo zamrzovali na tri različne načine ter jih nato posušili z liofilizacijo. Ugotovili smo, da niti liofilizacija niti način zamrzovanja ne vplivata na strukturo proteina ali na kinetiko sproščanja.

Izdelali smo hidrogel, katerega struktura omogoča aplikacijo in kontinuirano štiridnevno sproščanje proteina ter pri tem najverjetneje ohranja njegovo nativno strukturo. Izbrani hidrogel z vsemi postopki vrednotenja in povečanja njegove stabilnosti predstavlja dobro osnovo za vgrajenje inhibitorjev proteaz, ki bi po aplikaciji izboljšali celjenje rane z dveh vidikov. Hidrogel bi zagotavljal vlažno okolje, cistatin pa bi hkrati povrnil ravnovesje med premalo izraženimi rastnimi faktorji ter preveč aktivnimi proteazami.

2. SEZNAM OKRAJŠAV

DSC.....Differential Scanning Calorimetry- diferenčna dinamična kalorimetrija

HEC.....hidroksietilceluloza

HPLC.....High Performance Liquid Chromatography- tekočinska kromatografija visoke
ločljivosti

PBS.....fosfatni pufer s pH 7

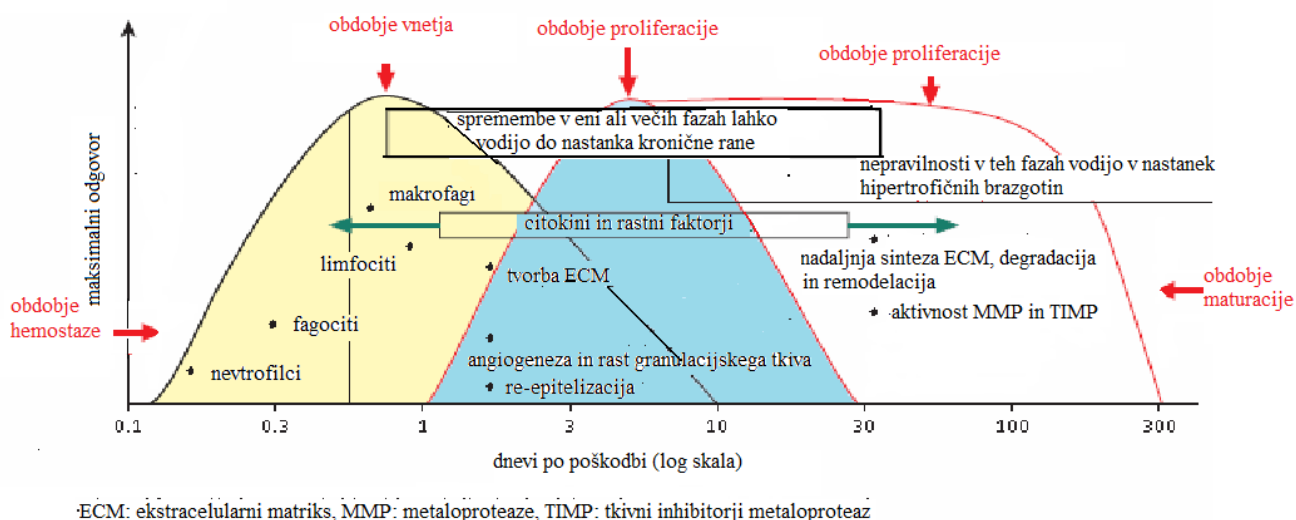
3. UVOD

Koža je največji organ človeškega telesa, ki varuje vse ostale organe v organizmu. Po površini je največji, po masi najtežji, po funkciji pa najbolj vsestranski organ. Služi za razmejevanje telesa od okolice, uravnavanje telesne temperature, proizvodnjo vitamina D, je prva obrambna linija pred vdorom tujkov v organizem in človekovo največje čutilo.

Kadar je integriteta kože prekinjena, govorimo o rani. Rana je po definiciji odprta poškodba kože in globljega tkiva ali sluznic zaradi fizikalnih dejavnikov (1). Poškodba kože pomeni prekinitev njene integritete, kar je lahko vzrok za oslabitev ali izpad njenih funkcij. Tem spremembam nasprotujejo endogeni procesi celjenja rane, saj ima vsaka rana lastno sposobnost, da se sama zaceli. Kadar je samoceljenje okrnjeno in oslajeno, je potrebna zunanja pomoč naravnim procesom celjenja (1,2).

3.1. FIZIOLOGIJA CELJENJA RAN

Fiziološki proces celjenja se odvija v večih fazah, kjer se posamezne celične aktivnosti odvijajo v določenem časovnem zaporedju in se navezujejo ena na drugo. Včasih teh obdobij ni mogoče ločiti, saj se med seboj prekrivajo ali napredujejo skupaj. Ponavadi celjenje razdelimo v štiri faze: hemostaza, vnetna faza, proliferacija ter faza remodelacije oziroma maturacije (slika 1).



Slika 1: Faze celjenja ran. Povzeto po (2).

3.1.1 Obdobje hemostaze

Po preinitvi tkiva in s tem preinitvi žile nastopi vazokonstrikcija zaradi živčnih refleksov, lokalnega miogenega spazma in lokalnih humoralnih faktorjev, sproščenih iz poškodovanih tkiv in trombocitov. Na poškodovanem mestu pride kolagen iz žilne stene v neposreden stik s krvjo, kar privlači trombocite, iz endotelnih celic pa se začneta sproščati tromboplastin in von Willebrandov faktor. Vse to povzroči takojšno adhezijo trombocitov na razgaljeni kolagen bazalne membrane v žilni steni preko von Willebrandovega faktorja. Sama adhezija aktivira trombocite in povzroči njihovo agregacijo, ob čemer hkrati pride tudi do sprememb oblike trombocitov in sproščanja ADP, serotonin, fibrinogena, kalikreina, tromboksana A₂. Med agregacijo se trombociti tudi krčijo in močno spreminjajo obliko, na površini pa se izpostavijo glikoproteini IIb/IIIa, ki omogočajo povezavo trombocitov s fibrinogenom. Oblikuje se beli krvni strdek, ki začasno zaustavi krvavitev. Pretok krvi v žili se zmanjša, kar pospeši koagulacijo. V steni rane, kjer so se skrčile prekinjene arterije, postopoma pada tlak kisika; v tkivu in tudi v steni skrčene arterije nastaja acidoza. Ta privede do pasivne iztegnitve mišic v žilni steni in arterija se ponovno razširi (pasivna vazodilatacija), rano pa napolnijo eritrociti. V fazi koagulacije se tvori končni krvni strdek, sestavljen iz fibrinske mreže in v njej ujetih krvnih celic. Koagulacija poteka po intrinzični in ekstrinzični poti. Intrinzična pot se sproži, ko pride do stika med plazmo in razgaljenim kolagenom bazalne membrane žilne stene, ekstrinzična pa ob stiku plazme s tkivnim faktorjem, sproščenim iz poškodovanih celic. Obe poti potekata vzporedno kot kaskada encimskih reakcij, ki na koncu privedejo do nastanka fibrinske mreže. V njej sodelujejo koagulacijski faktorji, kalcijevi ioni in fosfolipidi, ki izhajajo iz trombocitov in iz tkiva. Strdek zapolni poškodbo v žilni steni v 3-6 minutah po poškodbi, po 20-60 minutah pa se začne strdek krčiti, kar še bolj zapre žilo. Da je koagulacija omejena le na mesto poškodbe, poskrbi encim plazmin, ki nastane iz plazminogena pod vplivom tkivnega aktivatorja plazminogena (t-PA), urokinaze (u-PA) ali streptokinaze, in je sposoben razgraditi vezi fibrina, a tudi fibrinogena in nekaterih faktorjev koagulacije (2,3).

3.1.2 Obdobje vnetja

Ko je hemostaza zaključena, sledi vnetni proces, ki nastopi nekaj ur po poškodbi. V vnetni fazi ali fazi čiščenja se rana znebi odmrlega tkiva, bori se proti okužbam in se

pripravlja na proliferativno fazo. V rano pridejo levkociti, iz razširjenih žil pa izstopa plazma z beljakovinami. Onkotski tlak v okolici žil raste, tekočina se seli v intersticij, posledica je oteklina območja v okolici rane. V področje vnetja prvi pridejo nevtrofilci (slika 1), ki imajo sposobnost fagocitiranja bakterij in zunajceličnega matriksa, nato še monociti. Slednji se pretvorijo v makrofage, ki imajo dve nalogi: razgrajujejo odmrlo tkivo v steni rane in v strdku ter spodbujajo razmnoževanje fibroblastov in preko njih rast kapilar.

V področju vnetja se torej cirkulacija upočasni, povečajo se katabolni procesi, nastopi lokalna acidoza, ki dodatno stimulira avtolitično razgradnjo nečistot na rani. Fagociti za svoje procese potrebujejo proste kisikove radikale, zato je pomembna zadostna koncentracija kisika v lokalnem tkivu (2). Ta faza je najbolj bogata z izločkom iz rane, ki mehansko odplavlja mrtvino, tujke in redči toksične sestavine. Fagociti, tako nevtrofilci kot makrofagi, z mrtvino in eksudatom predstavljajo gnoj. Vnetno fazo spremlja tudi bolečina, ki je posledica razkritja živčnih končičev in delovanja različnih mediatorjev vnetja (prostaglandini, bradikinin). Ta faza lahko traja več dni. Infiltracija nevtrofilcev doseže svoj maksimum po približno 24 urah in nato upada v naslednjih dneh. Nevtrofilci preživijo v območju vnetja okoli 24 ur (2).

3.1.3 Obdobje proliferacije

Medtem ko so v vnetni fazi prevladovali katabolni, v fazi proliferacije prevladujejo anabolni procesi kot so angiogeneza, epitelizacija itd. Razvoj tega obdobja, ki ga vidimo kot rast granulacijskega tkiva, je odvisen od hitrosti vraščanja novih kapilar in razmnoževalne sposobnosti fibroblastov. Lahko traja tudi do 24 dni, v aseptičnih razmerah pa doseže proliferativno obdobje vrhunec sedmi dan po nastanku rane (4).

V proliferativni fazi nastajajo nove kapilare in vezivno tkivo. Makrofagi poleg mediatorjev vnetja izločajo tudi rastne dejavnike, ki spodbujajo rast novega granulacijskega tkiva (slika 1). Granulacijsko tkivo lahko opišemo kot prehodno, primitivno maso tkiva ali tudi organ, ki dokončno zapre rano in služi kot podlaga za naslednjo stopnjo v procesu celjenja rane. Po 3-5 dneh je tkivo po izgledu rožnato in mehko ter že dobro osnovano, kapilarne pentlje pa dajejo izgled tipične granuliranosti (2). Pomembne celice te faze so torej fibroblasti, ki pridejo v rano po principu kemotakse in začno proizvajati kolagen in ekstracelularni matriks. Kolagenska vlakna so ključna pri procesu celjenja, saj so bila identificirana kot

najobilnejše vezno tkivo (5). Hipoksično okolje v rani stimulira angiogene dejavnike in tvorbo nove kapilarne mreže, ki oskrbuje rano in celice s hranilnimi snovmi in kisikom.

Za normalni neprekinjeni epitelij je značilno, da izloča lokalni inhibitorni faktor. Ob nastanku rane se njegova koncentracija zmanjša, zato se 24 ur po prekinitvi epitelija začne povečana metabolna aktivnost na robovih epitelija. Celice z robov začenjajo v eni plasti prekrivati nastajajoče granulacijsko tkivo, sedmi do deveti dan je površina pokrita z nežnim epitelijem. Ta se začne debeliti in dvanajsti dan epiteljske celice že vraščajo v globino v samo granulacijsko tkivo. V tem obdobju se tudi zmanjša zunanja površina rane. Pogoji za epitelizacijo je vlažna in gladka površina (2).

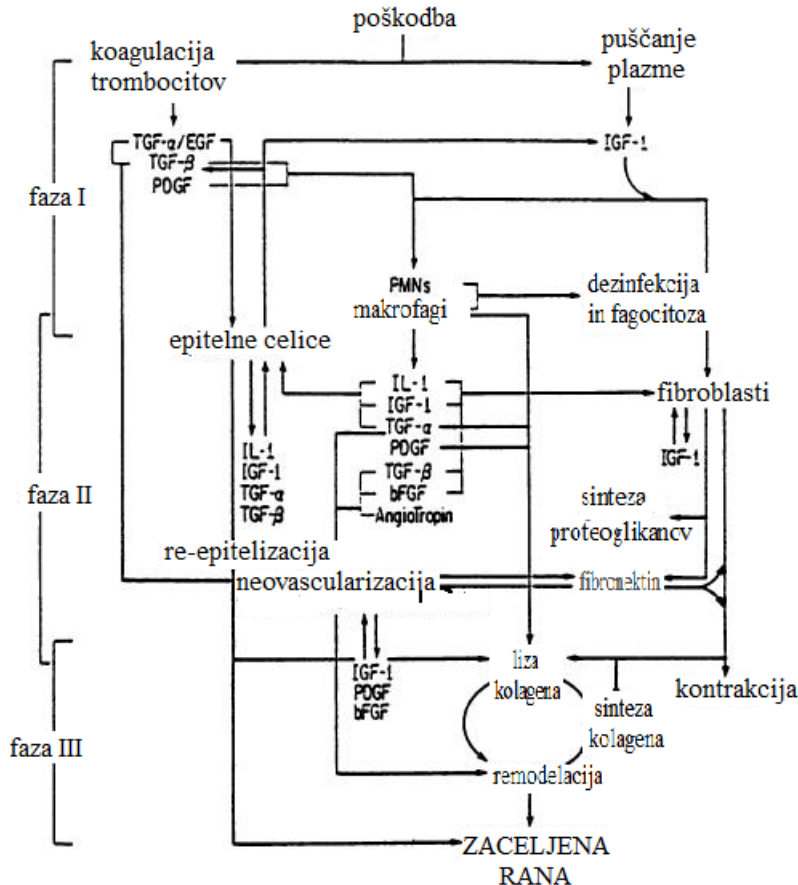
3.1.4 Obdobje maturacije

To obdobje se prične takrat, ko začne upadati število novih fibroblastov. V tem času je prostornina granulacijskega tkiva največja. Število kapilar se zmanjšuje in namesto rdečega granulacijskega tkiva nastaja čedalje bolj blede brazgotine, ki jo tvorijo kolagenska vlakna ter epitelij. Čim bolj je brazgotina zrela, tem slabše je ožiljena. Njena čvrstost na raztezanje se povečuje, vendar v odvisnosti od vrste tkiva, starosti organizma in delovanja področnih in sistemskih dejavnikov, ki vplivajo na celjenje. Mehansko gledano ima zrela brazgotina dve vlogi: spajanje tkiv in zapolnjevanje prostora, ki nastane po odstranjenju tkiva (5). Ker se melanociti, ki tvorijo pigment, ne morejo obnoviti, ostane brazgotina bele barve (2,5).

3.2. RASTNI FAKTORJI IN PROTEAZE V RANAH

3.2.1 Rastni faktorji

Rastni faktorji PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor-beta), VEGF (vascular endothelial growth factor) in EGF (epidermal growth factor) so ključni v procesu normalnega celjenja rane; sodelujejo pri migraciji celic, proliferaciji, sintezi proteinov in tvorbi ekstracelularnega matriksa. Delujejo lahko na endokrini, parakrini, avtokrini in tudi juksakrini način. Način njihovega nastanka in sproščanja je zelo kompleksen (2,6). Njihovo premajhno izločanje ali inhibicija delovanja vodi v neravnotežje in posledično se rana ne celi (6).



Slika 2: Shema kompleksnega uravnavanja sproščanja rastnih faktorjev pri procesu celjenja ran. Povzeto po (6).

3.2.2. Proteaze

Proteolitični encimi oziroma proteaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidnih vezi. Sodelujejo pri procesih, ki zagotavljajo normalen razvoj organizma npr. uravnavajo katabolizem celičnih proteinov, sodelujejo pri procesiranju in aktivaciji prekurzorjev v aktivne encime, hormone in rastne faktorje. Njihova aktivnost je natančno uravnavana na različnih nivojih: na nivoju sinteze in razgradnje, pri aktivaciji proencimov, s subcelično lokalizacijo ter specifičnimi inhibitorji.

Proteolitični encimi so prisotni v vseh izločkih ran in igrajo pomembno vlogo pri celjenju. Večinoma jih v rani izločajo granulociti, keratinociti in fibroblasti. Njihova aktivnost je močno nadzorovana, zato okvara katerega od mehanizmov kontrole vodi v zvečano proteolitsko aktivnost. Slednje velja za primarni vzrok neceljenja kroničnih ran. Zato je glavni cilj celjenja rane ravno uravnavanje delovanja proteaz.

Glede na mesto cepitve peptidne vezi, proteaze delimo na endopeptidaze ter eksopeptidaze. Eksopeptidaze delimo glede na mesto cepitve peptidne vezi (N- oz. C-konec polipeptidne verige) in glede na velikost odcepljenih fragmentov. Endopeptidaze pa delimo glede na kemijsko naravo katalitske skupine v aktivnem mesta: serinske, cisteinske, aspartatne, metaloproteaze in proteaze z neznanim mehanizmom (7,9).

3.2.3 Cisteinske proteaze

Nekaj več opisa namenjamo cisteinskim proteazam, saj smo v diplomskem delu poskušali razviti model za sproščanje njihovega inhibitorja cistatina. Cisteinske proteaze (CP) se ne nahajajo le v živalih in človeku, pač pa tudi v rastlinah in mikroorganizmih. CP lahko glede na njihovo strukturo delimo v pet klanov (CA-CE), posamezne klane pa v družine. Največja med cisteinskimi družinami je papainska družina (C1), ki jo sestavljajo papain in njemu podobne proteaze (9).

Vse papainu podobne cisteinske proteaze imajo podobno primarno in terciarno strukturo. Povprečna velikost molekul je med 30 in 50 kDa. Sintetizirajo se kot neaktivni prekurzorji, na katere se v Golgijevem aparatu vežejo ogljikovi hidrati in fosfatne skupine. Sestavljeni so iz dveh domen, med katerima je reža z aktivnim mestom. Aminokislinska preostanka Cys 25 in His 159 v aktivnem mestu tvorita ionski par, sestavljen iz tiolne in imidazolne skupine. Cepitev vezi poteka prek tvorbe kovalentnega intermediata, pri čemer sodelujeta tako cisteinski kot tudi histidinski ostanek (9,10).

3.3. KRONIČNE RANE

Kronične rane so vse sekundarno zdravljene rane, ki se v času osmih tednov ne zacelijo. Kronične rane lahko nastanejo kadarkoli iz akutne rane zlasti v primeru, ko pride do vnetja rane, ali kadar primarna oskrba rane ni bila ustrezna. Ponavadi kronične rane predstavljajo zadnji stadij napredujočega uničenja tkiva, ki ga povzročajo venozne, arterijske ali presnovne poškodbe ožilja, kot tudi poškodbe zaradi pritiska, sevanja ali tumorjev. V teh primerih gre za nezadostno funkcionalnost, ki ima za posledico metabolne motnje tkiva s hipoksijo. Posledično pride do odmrtnosti tkiva – nekroze (4).

Kronične rane lahko nastanejo kjerkoli na telesu, vendar jih največkrat najdemo na spodnjih okončinah. Vzroki za nastanek so številni, mnogokrat se tudi prepletajo. Kronične rane razdelimo glede na prevladujoč vzrok nastanka na:

- ishemične rane,
- venozne razjede,
- diabetične razjede,
- preležanine
- in druge (4).

3.3.1 Procesi v kronični rani

V kronični rani je eden ali več naravnih procesov celjenja prekinjenih. Najpogosteje se celjenje ustavi v vnetni fazi (4). V kroničnih ranah je prisotno neravnovesje med rastnimi faktorji in proteazami, pri čemer je koncentracija rastnih faktorjev znižana, proteaz pa povišana. V vnetni fazi makrofagi izločajo vnetne citokine, ki povišajo produkcijo proteaz in znižajo sintezo inhibitorjev ter rastnih faktorjev. Tako je za razliko od fiziološke rane, ki se celi in kjer so vnetni citokini vedno v ravnotežju z njihovimi inhibitorji, v kronični rani prisotna prevlada citokinov. Dodatno stanje še poslabšajo reaktivne kisikove spojine, kopica nekroznega tkiva ter kolonizacija bakterij (4).

3.3.2 Nesorazmerje med rastnimi faktorji in proteazami v kronični rani

Kronična rana, ki se ne celi, ima biokemično okolje z veliko vnetnimi citokini, proteazami in malo rastnimi faktorji. Bakterijski eksotoksini, ki se sprostijo ob uničenju bakterije, povzročijo sprostitve vnetnih citokinov, ki stimulirajo nastanek protez. Nenormalno povišane koncentracije proteaz uničujejo rastne faktorje in njihove receptorje, inhibirajo angiogenezo ter razgrajujejo granulacijsko tkivo. Ko torej proteaze uničijo rastne faktorje, se rana zaradi povečanega uničenja tkiva slabo celi. Če rani, ki se slabo celi, dodajamo že prej omenjene rastne faktorje ali inhibiramo proteaze, lahko premagamo uničujoče delovanje proteaz in s tem omogočimo rani boljše celjenje. Tak primer inhibitorja proteaz je cistatin, ki ga uvrščamo med:

- ✧ reverzibilne inhibitorje
- ✧ inhibitorje s tesno vezavo in
- ✧ inhibitorje, ki delujejo v zunajceličnem prostoru (9).

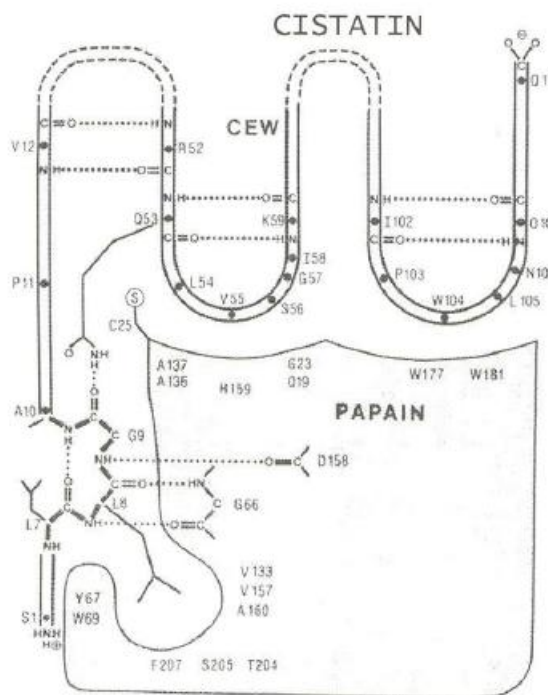
3.3.3 Cistatini – inhibitorji cisteinskih proteaz

Cistatin ni samo en protein, temveč obstaja cela družina cistatinov. V zadnjih 10 letih je postalo jasno, da lahko cistatini, inhibitorji cisteinskih proteaz, zaščitijo celice pred neželeno endogeno ali eksogeno proteolizo. Vežejo se reverzibilno na papainu podobne cisteinske proteaze. Družino homolognih proteinov cistatinov lahko razdelimo v tri poddružine inhibitorjev: stefini, cistatini in kininogeni, seveda pa ni izključena tudi prisotnost novih družin (10).

Stefini so enoverižni proteini z molekulsko maso okrog 11 kDa, so brez ogljikovih hidratov in disulfidnih vezi. So toplotno stabilni, prav tako pa ohranijo strukturo v nevtralnem in alkalnem okolju. Za razliko od cistatinov ne vsebujejo signalnega peptida, odgovornega za prenos inhibitorja v zunajcelični prostor, zato stefine uvrščamo med inhibitorje znotrajceličnega prostora. Stefini so reverzibilni kompetitivni inhibitorji, inhibicijska konstanta humanega stefina A za papain je 1.9×10^{-11} M (10).

Glavna značilnost družine *cistatinov*, kot ene izmed poddružin cistatinov, je prisotnost dveh disulfidnih vezi v bližini karboksilnega konca. So enoverižni, približno 115 aminokislin dolgi in 13 kDa veliki proteini, svojo aktivnost pa ohranjajo v alkalnem in nevtralnem okolju. Ti proteini se v relativno visokih koncentracijah pojavljajo v številnih telesnih tekočinah. Cistatin nastaja v vseh jedrnih celicah, njegova serumska koncentracija pa je neodvisna od spola, stanja prehranjenosti, akutnih in kroničnih bolezni. Kokošji cistatin in njegov človeški analog sta najmočnejša reverzibilna inhibitorja cisteinskih proteaz (slika 3) (10).

Kininogeni so večfunkcionalni proteini, katerih molska masa znaša od 50 do 115 kDa. Glede na dolžine njihovih verig jih delimo v več skupin. Svojo encimsko aktivnost ohranjajo v nevtralnem in alkalnem okolju, ne pa pod pH 4. Kratek čas so stabilni tudi pri povišani temperaturi (10). Nahajajo se ekstracelularno in so prekursorji vazoaktivnega peptida kinina, vpleteni so v kaskado koagulacije, imunski odziv akutne faze, vnetje ter pri inhibiciji cisteinskih proteaz (9).



Slika 3: Mehanizem delovanja inhibitorjev cisteinskih proteaz. Primer inhibicije papaina s kokošjim cistatinom (10).

3.3.4 Zdravljenje kroničnih ran

Prej omenjeno nesorazmerje med rastnimi faktorji, citokini in proteazami vodi v nastanek kroničnih ran. Zdravljenje takšnih ran predstavlja pogost in težaven problem za številne veje medicinske znanosti in tudi za mnoge sorodne stroke. Zdravljenje je dolgotrajno, povezano z velikimi materialnimi stroški in potrebo po spremembi načina življenja. Zdravljenje pogosto ni popolnoma uspešno.

Kronične rane lahko oskrbujemo na več načinov:

- z nekrektomijo,
- z metodo stalnega podtlaka (vacuum sealing),
- z laserjem,
- z dodatkom rastnih faktorjev in/ali inhibitorjev proteaz,
- prekrijemo jih lahko s sodobnimi oblogami, ki morajo biti vpojne, zagotavljati morajo vlažno okolje in nuditi zaščito rane ter okolice (11).

Z lokalnega vidika je pogoj za začetek celjenja čista rana, ki ima ustrezno oskrbljeno ležišče, zadostno vlažnost in preskrbo s krvjo (5). Šele takšna rana namreč omogoča

naslednje faze celjenja, proliferacijo in epitelizacijo. Vlažna mikroklima je za celjenje zelo pomembna, saj z izsušitvijo rane lahko ponovno pride do odmiranja celic in nastanka novih nekroz. Vlaženje je ključnega pomena, predvsem v zadnjih fazah, ko rana zelo malo izloča.

3.3.4.1 Klasična oskrba rane

Tako akutne kot kronične rane se še vedno veliko oskrbujejo na klasičen način. Pri klasični oskrbi rane le-to prekrijemo s gazo, ki je prepojena s fiziološko raztopino ali antiseptiki. Gaza se na rani začne sušiti, novonastalo granulacijsko tkivo se vrašča v nitke gaze, zato je prevezovanje boleče in vsakokrat privede do poškodbe tkiva, v rani ostajajo drobci materiala, ki kot tujki povzročajo vnetje. Poleg tega ima gaza veliko prepustnost za bakterije, pline in izločke in je zato velika možnost kontaminacije. Zaradi hitrega sušenja in ohlajanja rane se celjenje upočasni, saj celice in encimi ne morejo delovati v suhem okolju. Zato se rana počasneje celi, prevez je veliko ter so boleče. Nenazadnje so stroški klasične oskrbe visoki, zdravljenje dolgotrajno in zelo obremenilno za pacienta (8).

3.3.4.2 Sodobna oskrba rane

Vse prej naštetе pomanjkljivosti so pripeljale do razvoja sodobnejše oskrbe rane. Sodobni pristopi k celjenju ran temeljijo na vzdrževanju vlažnega mikrokolja na rani. Prednosti, ki jih prinaša vlažno okolje so številne. Vlaga ustrezno hidratira tkivo in omogoči večjo celično in encimsko aktivnost. Posledično se zniža pH, nastane blaga hipoksija, ki stimulira angiogenezo in omogoči tvorbo novega kapilarnega omrežja. Takšno okolje ugodno vpliva na avtolitične procese čiščenja in razkrajanja nekroz (5). Vlažno okolje prekrije proste živčne končiče, zato je njihovo draženje zmanjšano in bolečina umirjena.

Sodobne obloge predstavljajo nadomestek manjkajočega tkiva, ustrezno pripravijo ležišče rane, vpijajo izločke, zaščitijo pred sekundarno infekcijo, potrebno je manj pogosto prevezovanje, ki je tudi manj boleče. S tem se poveša kakovost bolnikovega življenja, zmanjšajo pa se tudi celokupni stroški zdravljenja, čeprav so sodobni materiali dražji od klasične gaze.

Zdravljenje s sodobnimi oblogami je torej bistveno hitrejše in poteka bolj naravno kot celjenje v suhem okolju. Sodobne obloge pa niso univerzalne, vsaka je namenjena za določeno vrsto rane ali faze celjenja. Katere izberemo je odvisno od velikosti rane, količine izcedka, prisotnih infekcij in lastnosti okoliške kože (8).

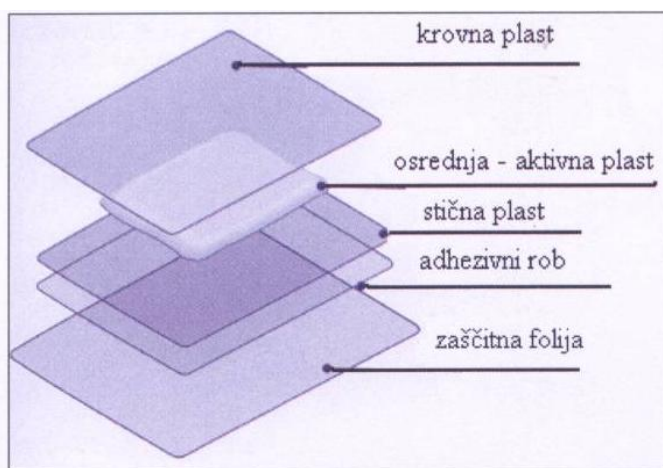
3.4 SODOBNI MATERIALI ZA OBLOGE ZA VLAŽNO CELJENJE RAN

Materiale, iz katerih so sestavljene obloge, delimo glede na izvor na:

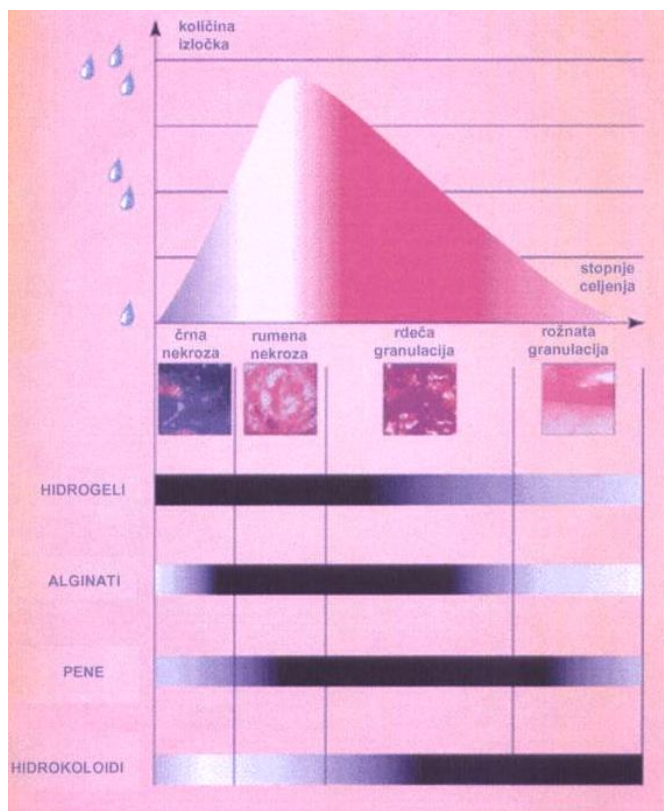
- naravne (celuloza, bombaž, alginat, pektin, hitosan in drugi)
- sintezne in polsintezne (poliamidi, poliestri, poliuretani, polipropileni, celulozni acetati, akrilati, silikoni in drugi).

Povečini so to polimeri, ki imajo sposobnost, da vodo ali izloček iz rane vežejo bodisi kemijsko ali fizikalno, pri čemer nabrekajo, lahko tvorijo tudi gel. Sodobne obloge za rane so sestavljene iz stične, aktivne in krovne plasti (slika 4).

Po eni od razdelitev jih lahko razvrstimo v hidrogеле, hidrokoloide, pene, alginatne in poliuretanske filme. Tovrstna delitev je zelo razširjena, čeprav z vidika osnovnih gradnikov oblog, polimerov, ni najbolj smiselna. Alginati tako spadajo lahko med hidrokoloide ali hidrogеле. Prav tako tudi ločnica med hidrogeli in hidrokoloide ni jasna. Glede na vrsto ran in fazo celjenja imamo možnost izbrati različne sodobne obloge, kot je prikazano na sliki 5.



Slika 4: Shematski prikaz večplastne obloge za rane (8)



Slika 5: Uporaba sodobnih oblog za vlažno celjenje ran glede na fazo celjenja in količino izločka iz rane. Črne lise na trakovnih modelih pri oblogah kažejo primernost uporabe (8).

3.4.1 Izbor optimalnega polimera za sodobno oblogo

Raziskave na področju novih materialov so pokazale, kakšne lastnosti naj bi imel optimalni polimer za obloge:

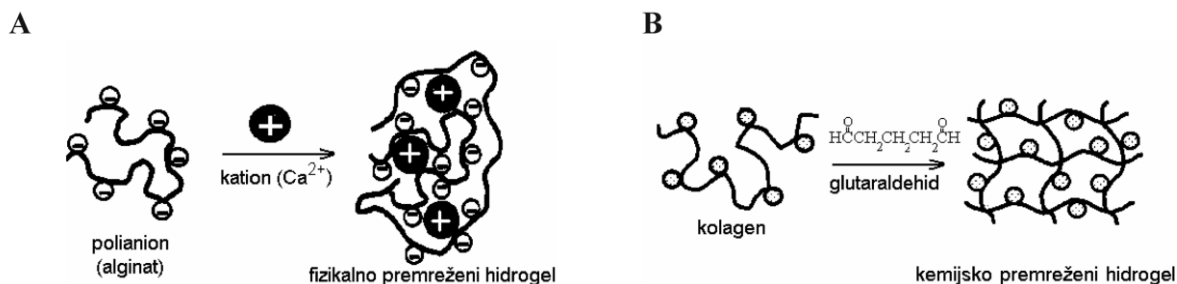
1. Hidrofilni značaj ter s tem posledično veliko afiniteto za vezavo hidrofilnih tekočin. Hidrofilni polimeri lahko delujejo tako, da bodisi vpijajo izloček iz rane, ali pa hidratirajo in vlažijo zasušene obloge in mrtvine. V vpojnih oblogah so hidrofilni polimeri v nehidratiranem stanju, ki nato ob stiku z izločkom iz rane nabrekajo in na rani tvorijo vlažen gel, kar ugodno vpliva na celjenje. Le te uporabljamo v primerih, kadar rana obilno izloča. Po drugi strani so v hidrogelih hidrofilni polimeri že v hidratiranem stanju in vsebujejo že vezano vodo, lahko do 80%. Po mehanizmu delovanja so hidrogeli namenjeni oskrbi suhih in zasušenih ran, kjer vlažijo, in s tem pospešijo odstranjevanje nekroz in fibrinskih oblog (8).

2. Prisotnost hidroksilnih, karboksilnih in drugih funkcionalnih skupin, ki razpolagajo z mesti dovzetnimi za radikalske reakcije, saj v vnetnem področju nastajajo tako radikali kot tudi reaktivne kisikove spojine. Te funkcionalne skupine so sposobne loviti radikale in s tem zmanjšati njihov škodljiv učinek. Prisotnost večjega števila teh funkcionalnih skupin pa omogoči kompleksiranje kovinskih ionov in tako lahko ustavijo katalizo reakcij oksidacij na proteinskih molekulah (8).
3. Sposobnost tvorbe vodikovih vezi in elektrostatskih interakcij z encimi. Biomateriali na ta način inhibirajo encime in imajo pomembno vlogo v inhibiciji proteaz, elastaz in matriks metaloproteaz. Mehanizem same inhibicije še ni pojasnjen, predpostavljajo pa, da denaturacija proteinov nastopi ravno zaradi omenjenih interakcij, zaradi česar se poruši nativna konformacija aktivnega mesta encima. Funkcionalne skupine, ki bi naj vstopale v interakcije z encimi, so OH, COOH, CO ter CHO. Z modifikacijo teh skupin so namreč dokazali zmanjšano inhibicijo encimov. Za tovrstne obloge pa so ugotovili še dodatne prednosti, saj stimulirajo delovanje fibroblastov in tvorbo novega krvožilja (8).
4. Prisotnost molekul v obliki vlaken. Fibrilarne molekule, kot v primeru kolagenskih oblog, dodatno omogočajo pravilno nalaganje in orientacijo novonastalih kolagenskih vlaken ter dajejo podporo tudi drugim celičnim elementom, kar vodi k zgodnejši zacelitvi (8).
5. Možnost sterilizacije oblog. Obloga mora biti ob aplikaciji na odprto rano sterilna, da ne pride do dodatnih infekcij. Zaradi učinkovitosti in varnosti je metoda izbire sterilizacija z vodno paro. Tako imajo pri izbiri sestavin prednost tiste pomožne snovi, pri katerih po končanem avtoklaviranju ne pride do significantnih sprememb v lastnostih (5).
6. Ustrezno viskoznost gela. Ustrezna viskoznost je pomembna iz večih razlogov: omogočati mora proizvodnjo, ob aplikaciji na rano pa mora na rani ostati in zagotavljati dober in tesen kontakt (5).

3.5. DOSTAVA PROTEINSKIH MOLEKUL IZ HIDROGELOV

3.5.1 Lastnosti hidrogelov

Hidrogeli so sestavljeni iz hidrofilnih polimerov, ki tvorijo premreženo tridimenzionalno strukturo, v katero sprejmejo večjo količino vode. Polimer v vodi nabreka, ne da bi se pri tem raztapljal. Netopnost in fizikalna integriteta sta posledica prisotnih kemijskih (ireverzibilni hidrogeli) ali fizikalnih (reverzibilni hidrogeli) premreženj med polimernimi verigami. Povezava med polimernimi verigami je pri kemijskih premreženjih kovalentne narave, pri fizikalnih pa so verige medsebojno povezane s šibkimi van der Waalsovimi ali vodikovimi vezmi, hidrofobnimi interakcijami oziroma pride le do prepletov verig (slika 6) (12).



Slika 6: Primer tvorbe interakcij v fizikalno premreženem alginatnem gelu (A) in kovalentno premreženje kolagena s glutaraldehydom (B) (12).

Polimeri tvorijo skupaj z vodo v hidrogelih trdno gelsko mrežo, ki ima določene lastnosti tekočin. Ta omogoča prepustnost snovi v hidrogelu, ki je posledica ujete vode v tridimenzionalni mreži polimera. Na začetku hidratacije pride najprej do vezave vode na polimer zaradi močnih interakcij med hidrofilnimi skupinami polimera in vodo-vezana voda. Hidrogel nato zaradi osmotske sile vsrka dodatno vodo, ki pa ni vezana. V splošnem velja: čim več je vezane vode, tem manj je na razpolago za raztapljanje zdravilne učinkovine in za njeno difuzijo skozi gel. Končna količina vode je odvisna od hidrofilnosti polimera in stopnje premreženja. Bolj kot polimer nabrekne, večja je njegova vpojnost v oblogah za rane. Prednost hidrogela je tudi ta, da je potrebna le majhna količina izcedka za zagotovitev vlažnega okolja, saj geli že sami po sebi vsebujejo veliko količino vode (12). Hidrogeli so zaradi svoje sorazmerno visoke vsebnosti vode ter mehke konsistence podobni tkivom. Mehka konsistenca in prožnost hidrogela zmanjšujeta možnost draženja

okoliškega tkiva, zato je biokompatibilnost hidrogelov zelo velika. Poleg tega zaradi nizke medfazne napetosti med hidrogelom in okoliško tekočino obstaja manjša možnost adsorpcije proteinov iz telesnih tekočin (12). Adsorpcija proteinov je namreč začetni korak pri prepoznavanju in zavračanju tujih snovi in s tem povezano nekompatibilnostjo materiala. Biorazgradljivost polimernega nosilca sicer ni vedno nujna, zlasti pri oblogah za rane, saj hidrogel z rane speremo s fiziološko raztopino (12). Zaradi naštetih ugodnih lastnosti hidrogelov so možnosti uporabe le-teh v biomedicini zelo velike.

3.5.2 Uporaba hidrogelov

Hidrogeli so na medicinskem, farmacevtskem in kozmetičnem področju v uporabi že več let. Geli z ali brez vgrajene zdravilne učinkovine se večinoma aplicirajo dermalno za doseganje lokalnega učinka. Izjema so seveda transdermalni dostavni sistemi. V zadnjem času pa hidrogelom ponovno posvečajo veliko pozornosti predvsem zaradi možnosti sistemske dostave tako proteinov kot tudi majhnih molekul.

3.5.3 Primernost hidrogelov za dostavo proteinov

Peptidi in proteini morajo, dokler ne dosežejo ciljnega mesta, ohraniti svojo nativno strukturo, med to potjo pa ne sme priti do njihove encimske razgradnje. Le v tem primeru bodo namreč ohranili svojo biološko aktivnost. Fiziološke bariere, kot so koža in celične membrane, predstavljajo še dodatno oviro. Vse to mora zagotavljati ali izboljšati tudi dostavni sistem, v katerega je protein vgrajen.

Vodno okolje hidrogela je podobno fiziološkemu okolju proteinov v organizmu, zato so hidrogeli eden izmed najprimernejših sistemov za ohranjanje stabilnosti in aktivnost teh občutljivih substanc. Adsorpcija proteinov na hidrogele in adhezija na celice sta majhni zaradi majhne površinske napetosti med hidrogeli in vodo. Prav tako lahko hidrogeli sprejmejo učinkovine z različno molekulsko maso in hidrofilnostjo, neproblematična je tudi največja količina vgrajene učinkovine (13). Vse te lastnosti omogočajo uporabo hidrogelov kot dostavnih sistemov za peptide in proteine (5).

3.5.4 Dosedanje raziskave na področju vlažnega celjenja kroničnih ran

Kronične rane, med njimi diabetični ulkus in venozna razjeda, prizadenejo globalno več kot 12 milijonov ljudi. Pristopi k zdravljenju so številni in različni. Da bi preprečili

infekcije, se v terapiji že dolgo uporabljajo antibiotiki, med njimi na primer neomicin in gentamicin, jod, srebrove soli, klorheksidin in metronidazol. Čeprav so učinkovine lahko vgrajene v obloge, se pogosteje nanašajo direktno na rano v obliki praškov, mazil, krem, pen ali gelov. Slabost teh tradicionalnih vehiklov je, da je težko nanesti natančno količino zdravila, prav tako nanos ni vedno enakomeren, zato lokalne koncentracije lahko nihajo. Takšni načini aplikacije seveda ne vodijo do kontroliranega ali podaljšanega sproščanja (14).

Novejše raziskave na molekularnem nivoju so dale možnost boljšega razumevanja celjenja ran in razkrile potencialne tarče za njihovo izboljšanje. S tega vidika največ obeta aplikacija rastnih faktorjev in inhibitorjev proteaz.

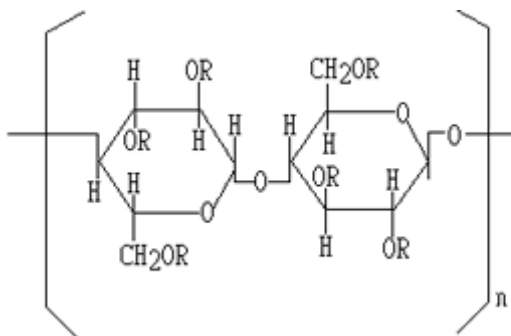
Kljub temu da so rastne faktorje poskušali dostaviti s pomočjo polimernih gelov, prečno premreženih hidrogelov, proteinskih matric, še vedno ni razvit idealen način aplikacije (14). Z rastnimi faktorji so bila izvedena že številna klinična testiranja, a so rezultati glede uspešnosti precej kontradiktorni. Klinične študije, ki so jih izvedli Richard et al., niso ugotovile nobene razlike v uspešnosti zdravljenja diabetične razjede z dostavo b-FGF v primerjavi s placebom (5). Po drugi strani pa je bil že leta 1999 odobren PDGF (Regranex[®]) za hitrejše in popolnejše celjenje diabetičnih stopal (5). Rayment et al. poročajo, da se lahko cinkove metaloproteaze v kronični rani inhibira z alendronatom, bifosfonatom, ki so ga vgradili v hidrogel (15).

Mnogi avtorji trdijo, da je vzrok neuspešnosti zdravljenja z rastnimi faktorji izredno visoka aktivnost proteaz (15). Gre za to, da je aktivnost proteaz tako velika, da le te razgradijo aplicirane rastne faktorje, še preden bi lahko prišla do izraza njihova aktivnost. Zaradi tega se je porodila ideja o dermalni dostavi proteaznih inhibitorjev v kronično rano, kar bi izboljšalo celjenje. Kot proteazni inhibitorji so bile patentirane že številne majhne molekule, pa tudi α -antikimotripsin so že raziskovali v te namene (5), vendar do sedaj še nobena od spojin ni pridobila dovoljenja za promet (5). Dobra in učinkovita alternativa tem spojinam je lahko tudi fiziološki inhibitor cistatin. Z aplikacijo slednjega bi lahko inhibirali cisteinske proteaze ter z deaktivacijo proteaz omogočili delovanje rastnih faktorjev. Tako bi ponovno vzpostavili ravnotežje med razgradnjo in izgradnjo.

3.6 POLIMERI ZA IZDELAVO HIDROGELOV ZA VLAŽNO CELJENJE

3.6.1 Hidroksietilceluloza (HEC)

Kemijsko je HEC delno substituiran poli(hidroksietilni)celulozni eter (slika 7). Na tržišču je prisotnih več vrst, ki se med seboj razlikujejo po stopnji substitucije in viskoznosti 2% vodne raztopine polimera pri 20 °C (16).



Slika 7: Strukturna formula HEC : n je število polimernih enot, R =H ali -(H₂-CH(CH₃)O)-xH

HEC je neionski polimer, po videzu bel do kremno obarvan prašek, brez vonja in okusa. Topen je tako v hladni kot v topli vodi in praktično netopen v večini organskih topil. V bolj polarnih organskih topilih, kot so glikoli, je HEC delno topen ali nabrekne (16).

HEC v obliki praška je stabilen, čeprav higroskopen material. V vodnih sistemih je HEC kemijsko stabilna v pH območju od 2 do 12, čeprav pri pH pod 5 že poteka hidroliza, pri višjih pH-jih pa lahko pride do oksidacije.

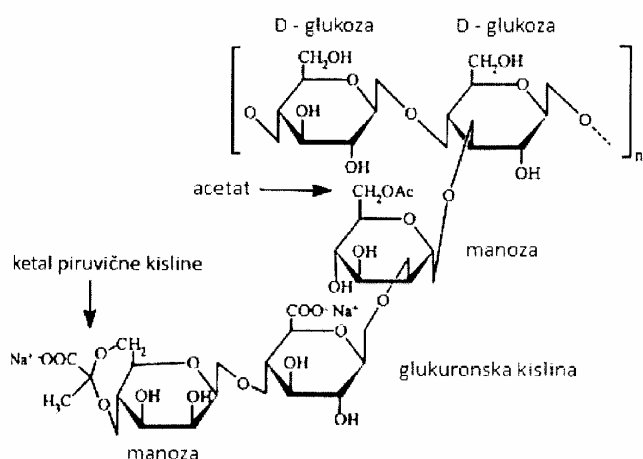
Na viskoznost vodnih raztopin pH ne vpliva, ima pa vpliv temperatura. Z višanjem temperature namreč pada viskoznost, vendar pa se z ohlajanjem sistem povrne v prvotno stanje (16).

HEC je široko uporabna pomožna snov, ki se uporablja v številnih farmacevtskih oblikah. V peroralnih farmacevtskih oblikah se uporablja kot vezivo v tabletah ter za filmsko oblaganje, ali kot ogrodje tablet s podaljšanim sproščanjem. V dermalnih farmacevtskih oblikah in v kapljicah za oči se uporablja kot zgoščevalo. Uporaba HEC pa je zelo razširjena tudi v kozmetiki (16). Kot hidrogel je primerna tudi za vgradnjo in dostavo proteinskih molekul v oblogah za vlažno celjenje ran.

3.6.2 Ksantan

Ksantan (ang. xanthan) je visokomolekularni anionski polisaharid, ki ga ekstracelularno izloča gram negativna bakterija *Xanthomonas Campestris* z namenom, da jo ščiti pred visoko temperaturo in vplivom svetlobe. Bakterija je povzročitelj številnih bolezni pri rastlinah, za človeka pa ni patogena (17).

Kemijsko je ksantan heteropolisaharid, sestavljen iz osnovnega skeleta, ki ga tvorijo molekule D-glukoze, povezane z β (1,4) vezmi, kar je enako kot pri celulozi. Vsaka druga molekula glukoze je substituirana s trisaharidno stransko verigo, ki jo sestavljata dve manozī, med kateri je vrinjena molekula glukuronske kisline. Manozā, pripeta na osnovno verigo, je lahko na mestu 6 acetilirana, na terminalni manozī je lahko na mestu 4 in 6 pripet ketal piruvične kisline (slika 8). Stopnja acetilacije in količina piruvične kisline sta odvisno od pogojev fermentacije ter seva bakterije, iz katerega je ksantan izoliran. Evropska farmakopeja pa postavlja zahtevo po minimalni vsebnosti piruvičnih kislin 1.5% glede na suho substanco. Ksantan je dostopen v obliki natrijeve, kalijeve in kalcijeve soli (17,18,19).



Slika 8: Struktura ksantana

Po videzu je ksantan bel ali rahlo rumen prah, topen v vodi, pri čemer daje viskoviskozno raztopino, medtem ko je v organskih topilih praktično netopen (18).

V vodnih sistemih je ksantan kemijsko stabilen v širokem temperaturnem intervalu (10-90°C) in pH območju (pH 3-12). Pri višjih pH vrednostih poteče delna deacetilacija

stranskih verig. Molekula ksantana se pri sobni temperaturi v trdnem stanju in mediju z visoko ionsko močjo nahaja v obliki dvojne vijačnice, kar je njena nativna konformacija. Povišanje temperature ali znižanje ionske moči privede do denaturacije molekule, dvojna vijačnica se razpre in pri določeni temperaturi povsem razpade. Ksantan je anionski polimer, zato praviloma ni združljiv s kationskimi površinsko aktivnimi snovmi, polimeri ali konzervansi (16).

Viskoznost ksantana v vodnem mediju je odvisna od temperature, koncentracije biopolimera, koncentracije soli in pH. Viskoznost raztopine ksantana močno narašča z naraščajočo koncentracijo polimera.

Ksantan je netoksičen, neiritirajoč in kompatibilen z večino farmacevtskih pomožnih snovi, zato je pogosto uporabljata v prehrambeni, kozmetični in farmacevtski industriji kot zgoščevalo in stabilizator suspenzij in emulzij (16).

3.7. REOLOŠKO VREDNOTENJE HIDROGELOV

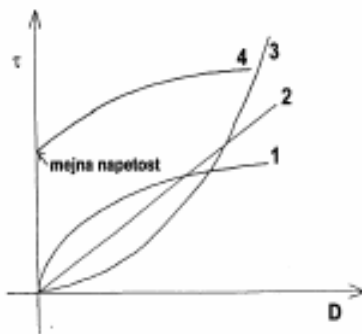
Izraz reologija izhaja iz grškega jezika in je sestavljen iz dveh besed: RHEOS, kar pomeni tok, in LOGOS, kar pomeni veda. Reologija je znanost o toku, deformacijah in preoblikovanju snovi in snovnih sistemov pod vplivom različnih strižnih sil. Preiskave reoloških lastnosti snovi segajo od pravih kapljev in preko poltrdnih teles vse do trdnih snovi (18).

Najlažje prikažemo pestrost tokovnega obnašanja sistemov z reogrami, kjer predstavimo odvisnost strižne napetosti (τ) od strižne hitrosti (D), druga možnost t.i. viskoznostni reogram pa je prikaz odvisnosti viskoznosti (η) od strižne hitrosti (D) (15,17). Viskoznost predstavlja notranjo upornost tekočin pri pretakanju.

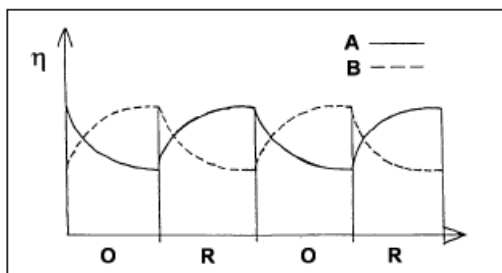
Sisteme, ki jih reološko preučujemo, v grobem delimo na:

- newtonske, kjer je viskoznost lastnost sistema in odvisna le od temperature in atmosferskega tlaka, na pa tudi od tokovnih pogojev (smeri, jakosti in časa mehanske obremenitve). Med te sodijo idealne tekočine (voda, mineralna olja...). Z naraščajočo temperaturo viskoznost pada zaradi povečanega Brownovega gibanja osnovnih molekul. Čim bolj je tekočina viskozna, tem bolj je temperaturno občutljiva (18).

- nenenewtonske, ki pri konstantnem tlaku in temperaturi nimajo konstantne viskoznosti, ampak je le ta odvisna od jakosti in smeri mehanske sile, ki deluje na njih. V nekaterih primerih pa imajo tudi časovno odvisno strukturo. Nenenewtonski sistemi lahko izkazujejo strižno odvisno upadanje viskoznosti ali pa, pod določenimi pogoji, strižno odvisno naraščanje viskoznosti-dilatanco. Nekateri pa stečejo šele potem, ko je presežena neka mejna strižna napetost (18). Sisteme lahko razdelimo na časovno neodvisne in časovno odvisne. Med časovno neodvisne sisteme, katerih viskoznost je odvisna le od jakosti delovanja strižne sile, ne pa tudi od časa obremenitve, sodijo pseudoplastični, plastični in dilatantni sistemi (slika 9). Če pa se viskoznost sistema pri konstantnih strižnih pogojih spreminja tudi s časom in smerjo delovanja sile, take sisteme imenujemo časovno odvisne. Med te pa sodijo tiksotropni in reopeksni sistemi (slika 10). Spreminjanje viskoznosti nenenewtonskih sistemov pri danem tlaku in temperaturi je posledica preurejanja notranje strukture sistema pod vplivom delovanja strižne sile (18). Med obremenitvijo časovno odvisnih sistemov pride do porušitve strukture, ki pa se po prenehanju delovanja sile obnovi, vendar le delno. Med nenenewtonske sisteme, največkrat pseudoplastične ali plastične, pa sodijo tudi geli (16,17).



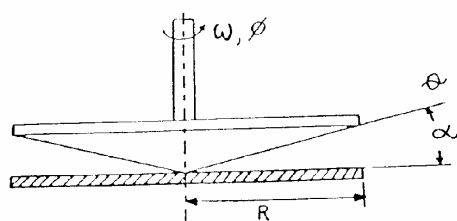
Slika 9: Reogrami oziroma odvisnost strižne napetosti τ od strižne hitrosti D za newtonske (2), pseudoplastične (1), dilatantne (3) in plastične (4) sisteme.



Slika 10: Viskoznostne krivulje za tiksotropne (A) in reopeksne sisteme (B)

Za preučevanje reološkega obnašanja nenewtonskih snovi običajno uporabljamo rotacijske reometre in viskozimetre. Te naprave sodijo med t.i. absolutne metode, saj lahko vrednosti reoloških parametrov izračunamo s pomočjo merljivih in nastavljivih količin (navor, kotna hitrost) ter s pomočjo značilnosti senzorskega sistema.

Merilni sistem rotacijskega reometra je sestavljen iz dveh delov, od katerih lahko eden miruje in drugi rotira, ali pa oba dela rotirata. Za določanje reoloških lastnosti zelo pogosto uporabljamo rotacijski reometer s senzorskim sistemom stožca in plošče. Poglavitne prednosti tega sistema so enostavnost odmerjanja vzorca in čiščenja merilnega sistema po opravljeni meritvi, majhna količina potrebnega vzorca ter konstantna strižna hitrost po celotnem vzorcu pri majhnih kotih stožca.



Slika 11: Shematski prikaz merilnega sistema stožec – plošča (17)

Na sliki 11 je prikazan senzorski sistem stožca in plošče, kjer se stožec vrti s kotno hitrostjo ω , plošča s polmerom R pa miruje. Naprava meri navor na stožcu, ki je posledica upora tekočine proti strigu, in kotno hitrost stožca. Ob poznavanju geometrijskih parametrov stožca (polmer in kot) lahko izračunamo strižno napetost in viskoznost sistema. Strižna hitrost je sorazmerna nastavljeni kotni hitrosti, strižna napetost pa izmerjenemu navoru (17, 21).

4. NAMEN DELA

Na področju celjenja kroničnih ran zbuja veliko zanimanje farmacevtske oblike, ki bi omogočile prenos rastnih faktorjev in inhibitorjev proteaz na mesto njihovega delovanja, jim omogočile nadzorovano sproščanje ter tako aktivno posegale k celjenju.

Kot možnost prenosa proteinov se nam ponujajo hidrogeli, ki se sami že na široko uporabljajo, prav tako pa je že bila dokazana kompatibilnost hidrogelov tako z mnogimi proteini kot tudi živim tkivom (15).

Namen diplomske naloge bo izdelati hidrogel, ki bo omogočil nadzorovano sproščanje vgrajenega jajčnega albumina. Slednji bo predstavljal modelni protein za proteazni inhibitor cistatin. Z razvojem takšnega hidrogela bi izboljšali celjenje z dveh vidikov: po eni strani bi hidrogel zagotavljal idealno vlažno okolje rane, po drugi strani pa bi inhibitor proteaz zmanjšal prekomerno aktivnost teh encimov. Posledica takih posegov bi tako bilo hitrejše in popolnejše celjenje zlasti kroničnih ran.

Na tržišču so že prisotni hidrogeli, ki se uporabljajo kot sodobne obloge za rane, saj zagotavljajo vlažno okolje. Zato bomo preučili reološke lastnosti treh različnih hidrogelov s tržišča z metodo rotacijske reometrije. S tem bomo ugotovili, kakšna je primerna viskoznost hidrogelov za aplikacijo na rano. Nato bomo izbrali polimer, ki bi bil primeren za oblikovanje sodobne obloge.

Z izbranim polimerom bomo pripravili hidrokele različnih koncentracij in izbrali tisto, ki najbolje ustreza referenčnim vrednostim. Hidrogel bomo sterilizirali in ovrednotili nastale spremembe.

V izbrani hidrogel bomo vgradili modelni protein- jajčni albumin. Najprej bomo preverili stabilnost albumina pod pogoji v hidrogelu. Ovrednotili bomo uspešnost ročne izdelave hidrogela z vrednotenjem enakomernosti porazdelitve jajčnega albumina po celotnem hidrogelu ter izvedli preskus sproščanja albumina.

V zadnjem delu naloge bomo hidrokele, zaradi izboljšanja stabilnosti med shranjevanjem, še liofilizirali. Vzorce bomo zamrznili na tri različne načine in po rehidraciji ugotavljali, ali različni načini zamrzovanja ter celoten proces liofilizacije poškodujejo strukturo proteina ter vplivajo na njegovo sproščanje.

5. EKSPERIMENTALNO DELO

5.1 MATERIALI

Hidrogeli s tržišča:

- Intrasite[®] gel, Smith&Nephew, Velika Britanija
- Purilon[®], Coloplast, Danska; sestava: karboksimetilceluloza, propilen glikol, voda
- Tegaderm[®] hydrogel 91110, Wound Filler, 3M Health Care, Velika Britanija; sestava: guar gumi, propilen glikol, voda, natrijev tetraborat



Materiali za izdelava hidrogelov:

- brezvodni glicerol (> 99,5%), Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- hidrokisetilceluloza Natrosol[®] Pharm, tip 225 HHX- Pharm, Lot: X-01017
- jajčni albumin (albumine from chicken egg white, Grade V), min. 98% (agaroza gelska elektroforeza), kristaliziran in liofiliziran, brez prisotnosti soli;

molekulska masa: 44287 Da, videz: beli do svetlo rumeni kosmiči, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija

- ksantan (xanthan gum) XANTURAL[®] 75, CP Kelco Knowsley Plant, Velika Britanija; videz: bel do svetlo rumen prah, viskoznost 1% gumija v 1% KCl 1200-1600 mPas
- ksantan (xanthan gum), Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija; molekulska masa 1×10^6 Da videz: bel do svetlo rumen prah
- dinatrijev tetraborat dekahidrat (>99.5%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- bidestilirana voda

Reagenti za pripravo fosfatnega pufra in mobilne faze za HPLC analitiko:

- dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat (99,0- 102,0%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat (99,5 - 100,5%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev klorid (>99,5%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- klorovodikova kislina 37%, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev hidroksid ($\geq 99\%$), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev klorid (>99,5%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- bidestilirana voda

5.2 NAPRAVE

- avtoklav Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- avtomatska pipeta BIOHIT m1000 (100-1000 μ l), Kemomed, Finska
- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- digitalna tehtnica, Exacta 2200 EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- digitalna tehtnica, Sartorius BP310S, Göttingen, Nemčija
- DSC 1, Star system, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- Liofilizator CHRIST BETA 1-8K, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Nemčija
- naprava za merjenje viskoznosti, ki jo sestavljajo: oscilacijsko rotacijski viskozimeter Rheolab MC 100, Paar Physica, Stuttgart, Nemčija; termostat

Viscotherm VT 10, Pysica, Stuttgart, Nemčija; osebni računalnik ter merilni sistem stožec ploščica KP 22

- pH meter, MA 234, Mettler Toledo, pH/Ion Analyzer, Schwerzenbach, Švica
- sistem za visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC), Agilent Series, Agilent Technologies, Nemčija; kolona ZORBAX GF-225 z dolžino 225mm in notranjim premerom 9,4 mm ter velikostjo delcev 4 μ m
- ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija

5.3 POSTOPKI IN METODE

5.3.1 Priprava hidrogelov

Po preučitvi optimalnih lastnosti, ki bi jih naj imel polimer za sodobne obloge, smo se odločili, da se želenim lastnostim dobro približata tudi hidroksietilceluloza (HEC) in ksantan. Hidrogeli so ponavadi sestavljeni iz polimera, vlažilca, konzervansa ter vodne faze.

Pripravili smo hidrokele z 1,5-, 3- in 4,5-odstotno koncentracijo HEC. Na digitalni tehtnici smo natehtali ustrezne količine HEC (1,5g; 3g; 4,5g) in 10,0g brezvodnega glicerola (vlažilec) ter ju zmešali v časi. Nato smo v drugo čašo natehtali do skupno 100g vzorca bidestilirane vode (88,4g; 86,9g; 85,4g), dodali 0,1 g natrijevega tetraborata (konzervans) ter mešali z magnetnim mešalom, dokler se ves tetraborat ni raztopil. Potem smo raztopino konzervansa ob stalnem mešanju s stekleno palčko počasi dodajali k zmesi glicerola in HEC. Po dodatku celotne količine vodne raztopine smo vzorec hidrogela še za približno 0,5 min dali v ultrazvočno kadičko. Med pripravo hidrogela je bilo potrebno paziti, da smo razbili polimerne skupke, saj so ti nastali takoj ob prvem stiku vodne raztopine in zmesi polimera z glicerolom. Skupke smo razbili s stalnim mešanjem, dodatno je k temu pripomogla tudi ultrazvočna kadička, ki je hkrati omogočala tudi hitrejšo difuzijo zraka iz vzorca. Hidrogel smo nato pustili gelirati en dan pri sobni temperaturi. Nastal je homogen gel.

Na enak način smo pripravili tudi hidrokele iz ksantana, pri čemer smo uporabili tako nizkoviskozni kot tudi viskoviskozni ksantan. Pripravili smo 1,5-,3-,4,5-in 6-odstotne koncentracije hidrogelov obeh ksantanov. Pri izdelavi hidrogelov smo morali bistveno počasneje dodajati vodo in intenzivneje mešati, da bi razbili nastale skupke. Prav tako je

bil ksantanski gel dlje časa v ultrazvočni kadički (15 minut), vse to z namenom, da bi izdelali homogene vzorce.

5.3.2 Reološko vrednotenje hidrogelov

Preizkušali smo odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti z rotacijsko reometrijo. Uporabili smo senzorski sistem stožec-plošča. Meritve smo izvajali tako da, smo v režo med stožcem in ploščico dali ustrezno količino vzorca, spustili stožec do plošče in morebitni prebitek vzorca odstranili, da ni segal čez rob stožca za več kot 1 mm. Meritve smo vodili z računalniškim programom Rheo-logic OS 300, Version 1.10 E, ki teče pod programom Windows 3.1. Program je omogočal sproten prikaz izmerjenih točk na zaslonu, izračunal reološke parametre in omogočil izpis podatkov v obliki grafov in preglednic.

Spremljali smo viskoznost v odvisnosti od strižne hitrosti, pri čemer se je strižna hitrost spreminjala od $0-50\text{ s}^{-1}$ in navzdol od $50-0\text{ s}^{-1}$. Ker smo želeli ovrednotiti vpliv temperature na viskoznost, smo meritve izvajali pri treh različnih temperaturah:

1. pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ - sobna temperatura
2. pri $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ - temperatura na površini kože
3. pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ - telesna temperatura.

Najprej smo kot referenco za primerno viskoznost reološko ovrednotili hidrokele s tržišča ter nato še lastno izdelane hidrokele.

5.3.3 Sterilizacija z vodno paro

Sterilizacija je postopek, s katerim dosežemo odsotnost vseh živih mikroorganizmov v ali na nekem materialu. To lahko dosežemo z izpostavitvijo materiala letalnemu fizikalnemu, kemijskemu ali mehanskemu učinku. Poznamo številne sterilizacijske metode, izbor pa je večinoma odvisen od priročnosti postopka in narave materiala, ki ga je potrebno sterilizirati.

Sterilizacija z nasičeno vodno paro pod tlakom ali avtoklaviranje je metoda izbire končne sterilizacije predvsem za vodo in vodne raztopine termostabilnih učinkovin v zaprtih posodah (ampule, stekleničke), kovinske, steklene in porcelanaste instrumente, obvezilni material, obleke, perilo in gumijaste zamaške. Nasičena vodna para kot izvor toplote povzroči uničenje celic mikroorganizmov kot posledica denaturacije kritičnih proteinov in

nukleinskih kislin, kar je rezultat pretrganja vodikovih vezi. Tako močan sterilizacijski učinek nastane zaradi masovnega prenosa toplote ob kondenzaciji pare na celico mikroorganizma (24).

Vzorci smo natehtali v čaše, pokrili z alufolijo ter sterilizirali v avtoklavu pri standardnih pogojih sterilizacije, ki jih določa Evropska farmakopeja: $T = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 2\text{ bara}$, $t = 15\text{ min}$. Po sterilizaciji smo vzorce organoleptično ocenili in jim ponovno izmerili viskoznost.

5.3.4 Hidrogel z vgrajenim albuminom

5.3.4.1 Priprava izotoničnega fosfatnega pufru s $\text{pH}=7$ (PBS)

Fosfatni pufer (PBS) smo pripravili tako, da smo natehtali 0,2g KCl, 0,24g KH_2PO_4 , 1,44g Na_2HPO_4 ter 8g NaCl. Vse soli smo kvantitativno prenesli v litrsko bučo, dodali približno 800 mL bidestilirane vode ter mešali s magnetnim mešalom, dokler se vse soli niso raztopile. Tako pripravljeni raztopini smo z 1M NaOH ali 1M HCl umerili pH na vrednost $7,0 \pm 0,05$, nato pa bučko z vodo dopolnili do oznake.

Fosfatni pufer predstavlja okolje, v katerem je albumin najbolj stabilen, zato smo vso vodo, ki smo jo uporabili pri tvorbi gela, zamenjali s pufrom. Najprej smo naredili prazen hidrogel s pufrom ter ponovno izmerili viskoznost, da bi ugotovili, kako večja osmolarnost medija vpliva na reološke lastnosti hidrogela. Pri HEC z menjavo medija nismo imeli večjih težav. Sam ksantan pa je zaradi svoje polianionske narave zelo občutljiv na prisotnost soli v mediju. V odvisnosti od jakosti moči medija namreč zavzame različne konformacije, kar se kaže kot različna čvrstost nastalega hidrogela. Poleg tega je ksantan problematičen tudi z mikrobiološkega vidika, zato smo se v nadaljevanju osredotočili na hidrokele iz HEC.

5.3.4.2 Vrednotenje stabilnosti albumina

Pred vgradnjo albumina v hidrogel smo morali preveriti, ali je albumin pri takšnih pogojih sploh stabilen. Pripravili smo raztopini albumina v vodi s koncentracijo 1mg/ml brez in z dodatkom 0,1 % natrijevega tetraborata ter raztopini albumina v PBS s koncentracijo

1mg/ml z in brez konzervansa. Raztopine smo razdelili v plastične epruvete, jih zaprli ter za testiranje stabilnosti odvzeli vzorce ob časih 0, 12, 22, 44, 60 h. Prav tako smo preverili stabilnost že vgrajenega albumina v HEC hidrogel. Približno 1 g hidrogela z že vgrajenim albuminom smo raztopili v PBS ter testirali stabilnost 4 dni v časovnih točkah 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 in 96 h. Vzorce smo ovrednotili s HPLC metodo opisano v nadaljevanju.

5.3.4.3 Vgraditev albumina v 3% HEC hidrogel

Proteine je možno enostavno in homogeno vgraditi v hidrokele tako, da ustrezno količino proteina raztopimo v vodni fazi, le to pa nato uporabimo pri tvorbi hidrogela (25) .

Natehtali smo 86,9 mg albumina, ga raztopili v 86,9 ml PBS in tako dobili raztopino s koncentracijo 1mg/ml. Dodali smo še 0,1g natrijevega tetraborata ter mešali na magnetnem mešalu, dokler se ves konzervans ni raztopil. To raztopino smo nato uporabili kot vodno fazo pri pripravi hidrogela po že opisanem postopku (5.3.1). Za koncentracijo raztopine albumina 1 mg/ml smo se odločili z ozirom na mejo detekcije HPLC sistema, da bi tako lahko detektirali količino sproščenega albumina tudi na začetku, ko je delež le tega še majhen.

5.3.4.4 Enakomernost porazdelitve albumina po celotnem hidrogelu

Ali ročna metoda izdelave omogoča enakomerno porazdelitev albumina po celotnem hidrogelu, smo preverili tako, da smo odvzeli vzorce hidrogela iz dna čaše, iz sredine hidrogela in iz površine ob steni posode. Vzorcem smo nato dodali 10 ml PBS ter jih mešali z magnetnim mešalom. Ker se tudi po daljšem času mešanja (4 ure) niso popolnoma raztopili, smo postopoma dodajali po 2 ml medija do končnega volumna pufra 14 ml. Raztopljene vzorce smo ovrednotili s HPLC.

5.3.5 Preskus sproščanja albumina iz hidrogela

5.3.5.1 Priprava umeritvene premice za albumin

Na digitalni tehtnici smo zatehtali 50,0 mg albumina, ga kvantitativno prenesli v 25 ml bučko in z mobilno fazo dopolnili do oznake. Tako smo dobili osnovno raztopino s koncentracijo 2 mg/ml, ki smo jo nato z mobilno fazo redčili tako, da smo dobili raztopine s koncentracijo 1, 0,5, 0,2, 0,1 in 0,010 mg/ml. Najnižja koncentracija je bila določena

glede na mejo detekcije HPLC sistema. Umeritveno krivuljo smo izdelali na osnovi priprave dveh osnovnih raztopin.

5.3.5.2 Izdelava mobilne faze in vrednotenje albumina s HPLC

Iz analiznih postopkov, ki jih na Fakulteti za farmacijo že uporabljajo za testiranje albumina z visokotlačno tekočinsko kromatografijo, smo povzeli naslednje parametre:

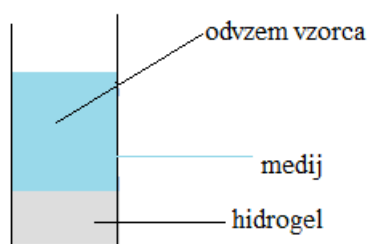
- mobilna faza je bila sestavljena iz 130 mM NaCl in 20 mM Na₂HPO₄ s pH 7. Pripravili smo jo tako, da smo 7,6g NaCl in 7,2 Na₂HPO₄*12H₂O raztopili v približno 1800 mL bidestilirane vode, z 1M NaOH ali 1M HCl uravnali pH na 7±0,05, ter dopolnili do 2000 ml
- uporabili smo kolono ZORBAX GF-225 z dolžino 225 mm in notranjim premerom 9,4 mm ter velikostjo delcev 4µm. Ločevanje poteka na osnovi izključitvene kromatografije po velikosti, primerna pa je za vodotopne makromolekule z molekulsko maso od 4 do 400 kDa;
- volumen avtomatsko injiciranega vzorca je bil 10 µL
- pretok mobilne faze je bil 1ml/min
- sistem je bil termostatiran na 23°C, temperatura vzorce je bila 20°C
- UV detekcija je potekala pri valovni dolžini 210 nm
- čas potovanja enega vzorca po koloni je bil 15- 20 min
- vzorce za stabilnost in sproščanje smo hranili v vialah, ki smo jih takoj po odvzemu zamrznili, da bi lahko analizo vseh vzorcev izvedli skupaj.

5.3.5.3 Razvoj modela za izvedbo sproščanja jajčnega albumina iz hidrogela

Najbolj uveljavljen model sproščanja za farmacevtske oblike, ki jih apliciramo dermalno, so Franzove celice. Pri teh učinkovina prehaja skozi membrano iz enega razdelka v drugega, kjer vzorčimo. V našem primeru pa uporaba Franzovih celic ni najboljša za posnemanje realne situacije. Ob aplikaciji na kronično rano namreč nimamo kožne bariere, ki bi predstavljala oviro pri prehodu proteina. Torej sploh ne gre za klasično perkutano absorpcijo. Protein lahko iz hidrogela prehaja na mesto delovanja nemoteno z enostavno difuzijo.

Razvoj modela, ki bi bolj posnemal realno stanje, smo deloma povzeli po člankih, delno smo ga razvili sami. Najprej smo v majhne penicilinke ($V \cong 4\text{ml}$) z ravnim dnom natančno natehtali približno 1 g gela, tako da je bil stolpec hidrogela visok približno 1 cm. Nanj smo dodali dvakratno maso (volumen) modro obarvanega pufra ter tako mediju izpostavili le zgornjo površino hidrogela. Vzorce smo opazovali več dni, da bi videli, če plasti hidrogela in medija ostaneta ločeni in ali je možno odvzeti vzorec medija, ne da bi posegali v vzorec hidrogela. Prav tako smo opazovali tudi, ali se je spremenila konsistenca hidrogela oziroma če in koliko medija je hidrogel še sprejel s površine.

Ko smo potrdili, da dodani medij, v katerega se bo sproščal jajčni albumin, pretirano ne redči hidrogela v času petih dni in je jemanje vzorca neproblematično, smo dokončno postavili model za sproščanje albumina (slika 12). V penicilinke smo natehtali ustrezno količino hidrogela (približno 1g), nanj odpipetirali PBS, pri čemer je bilo razmerje masa hidrogela/ volumen pufra vedno 1:2. Vzorce smo pokrili s parafilmom in sproščanje izvajali na sobni temperaturi. Iz sredine medija smo odvezemali vzorčke po 500 μl ob rednih časovnih intervalih ter jih nadomestili z enakim volumnom svežega pufra, da bi zagotovili sink pogoje. Poleg hidrogelov, ki so vsebovali albumin, smo sproščanje izvajali tudi na praznih hidrogelih kot negativno kontrolo. Odvzete vzorčke smo zamrznili do ovrednotenja s HPLC. Vsako sproščanje smo izvajali v treh paralelkah.



Slika 12: Shematski prikaz postavljenega modela za sproščanje albumina iz hidrogela

Da bi ugotovili, ali in kako sproščanje sploh poteka, smo prvo sproščanje izvajali 2 dni, pri čemer smo vzorce odvezemali 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 10 h, 24 h in 48 h po začetku sproščanja. Optimalen čas zadrževanja sodobne obloge na rani je 5 dni (2), zato smo sproščanje podaljšali. Zaradi neugodnega časovnega odvzema (zadnji vzorec med vikendom) sproščanje ni potekalo 5 dni, temveč 4, pri čemer smo vzorce odvezemali še dodatno po 72 h in 96 h od začetka sproščanja.

5.3.6 Liofilizacija hidrogelov

Liofilizacija je postopek sušenja, pri katerem gre za odstranjevanje topila (običajno vode) iz zamrznjenega vzorca s sublimacijo. Parametri, ki jih moramo nastaviti, so temperatura police ter tlak. Liofilizacijo moramo izvajati pod temperaturo tališča vzorca oziroma pri raztopinah pod temperaturo evtektične točke, da se vzorec ne tali. Pomembna je tudi debelina vzorca, ki naj ne bi presegala 10 mm, saj se spodnje plasti vzorca sušijo zelo dolgo (26).

Proces liofilizacije poteka v treh fazah (slika 13):

1. FAZA ZAMRZOVANJA:

V tej fazi vzorce zamrznemo, ponavadi pri atmosferskem tlaku, voda v vzorcih se spremeni v led, hkrati pa tako vzorec imobiliziramo, da ohrani svojo strukturo, velikost in obliko.

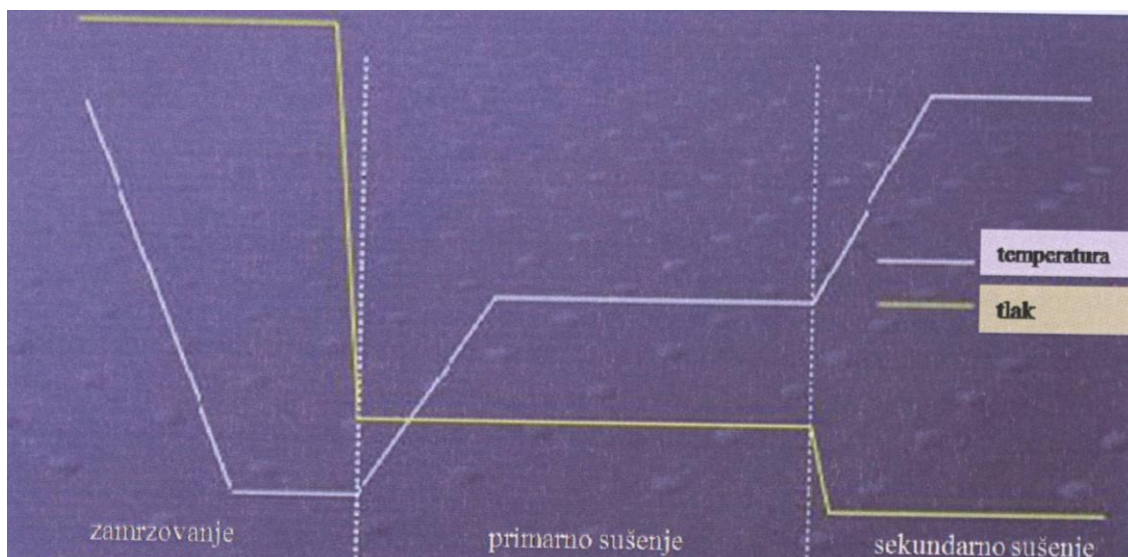
2. PRIMARNO SUŠENJE

Pri zelo znižanem tlaku in naraščajoči temperaturi police poteka sublimacija, pri čemer trdna snov (led) preide direktno v plinasto stanje (paro). V tej stopnji odstranimo 95% vsebnosti vode, in sicer nevezano vodo. Čeprav vzorec stoji na toplejši podlagi, se zaradi hladilnega efekta sublimacije ne tali, zato se ohrani struktura, ki smo jo dosegli z zamrzovanjem. To je najdaljša faza v procesu liofilizacije.

3. SEKUNDARNO SUŠENJE

Vzorec lahko po odstranitvi ledu še vedno vsebuje nekaj odstotkov vode, ki je nismo mogli odstraniti, in sicer gre za kapilarno vodo, fizikalno adsorbirano vodo, vodo za nabrekanje...

Desorpcijo vezane vode dosežemo tako, da tlak še dodatno znižamo, temperaturo pa dvignemo na 15-40 °C. Sekundarno sušenje omogoča, da imamo na koncu v vzorcu prisotne le še 0,5% vode, vendar pa še vedno ne moremo odstraniti kristalizacijske ter kemijsko vezane vode (26).



Slika 13: Shema liofilizacijskega postopka

Naši eksperimentalni parametri:

- najprej smo s pomočjo DSC določili evtektično točko 3% HEC hidrogela z vgrajenim albuminom, ki je znašala od -13 do -18°C. Temperaturo evtektika smo sprva poskušali določiti s pomočjo elektrod za temperaturo in upornost v liofilizatorju, vendar pa ta pristop ni dal pričakovanih rezultatov.
- vzorce smo zamrznili na 3 različne načine: v zmrzovalniku pri -22°C 5 ur, v liofilizatorju na polici, kjer se je temperatura znižala od 18°C in do -22°C v petih urah ter v tekočem dušiku, ki ima približno -200°C in vzorci zamrznejo takoj.
- odločili smo se, da bomo liofilizacijo izvajali še nekaj °C pod evtektično točko, zato smo temperaturo police nastavili na -21°C, kar je bila najnižja temperatura, ki jo je bil liofilizator še sposoben doseči.
- tlak primarnega sušenja je znašal 0,37 milibarov, sekundarnega pa okoli 0,11 milibarov
- čas liofilizacije je bil od 20-24 ur
- proces liofilizacije smo izvajali na vzorcih enake mase v enaki steklovini kot smo jo uporabljali za vrednotenje sproščanja, da bi se izognili nepotrebnemu prenašanju vzorca ter napakam pri nadaljnjem delu. Nekaj vzorcev pa je bilo večjih, saj smo jih uporabili za nadaljnje reološko vrednotenje. Preverjali smo namreč, če po dodatku vode ob rehidraciji, vzorci ohranijo prvotno obliko.

Po končani liofilizaciji smo pridobili HEC hidrogel z vgrajenim albuminom- kserogel, ki smo ga do nadaljnjega dela hranili v eksikatorju.

5.3.7 Rehidracija liofiliziranih vzorcev

Liofilizirane vzorce smo rehidrirali in na tak način ponovno rekonstituirali. Rehidracijo smo izvedli tako, da smo vzorce 3% HEC hidrogela z albuminom v ustrezni steklovini pred liofilizacijo stehali, nato liofilizirali in ponovno stehali po liofilizaciji, pri čemer je prišlo do izgube mase zaradi odstranitve vode. Suhim vzorčkom smo s kapalko dodali toliko bidestilirane vode, da smo povrnili prvotno maso. Vzorčke smo potem pustili stati en dan na sobni temperaturi ali čez vikend v hladilniku, pri čemer je suh vzorec sprejel celotno dodano vodo in se povrnil v prvotno stanje. Rehidracija je enostavna in poteka spontano brez dodatnih posegov v sistem.

Rehidrirane vzorce smo reološko ovrednotili z rotacijsko reometrijo pri treh različnih temperaturah, prav tako pa smo ponovili preskuse sproščanja albumina iz rehidriranih vzorcev.

6. REZULTATI IN RAZPRAVA

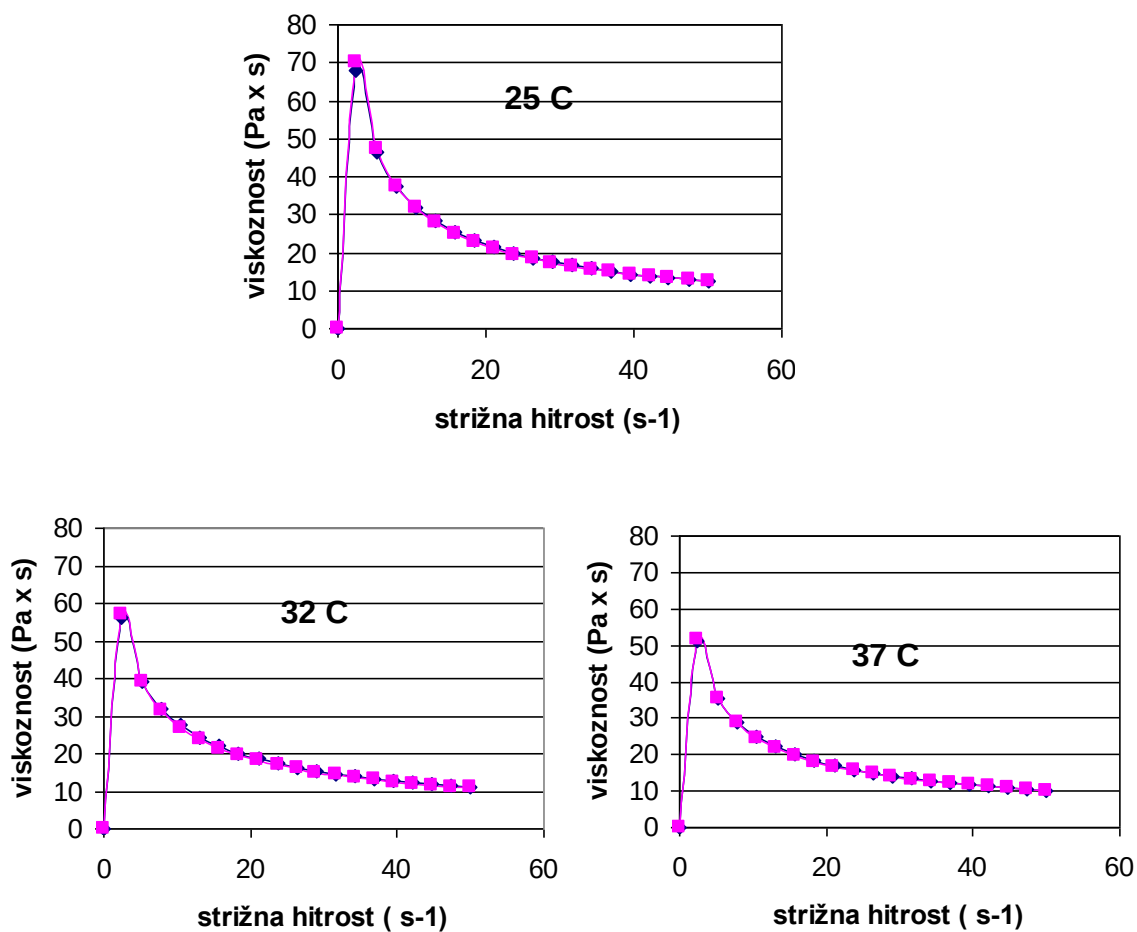
6.1 REZULTATI REOLOŠKEGA VREDNOTENJA KOMERCIALNIH HIDROGELOV: Purilon[®], Tegaderm[®], Intrasite[®]

Primerna viskoznost hidrogelov je bistvenega pomena, saj mora biti takšna, da hidrogel po aplikaciji ostane na rani ter zagotavlja tesen kontakt z njo, prav tako pa mora omogočiti primerno proizvodnjo in aplikacijo iz vsebnika. Da bi postavili merilo za primerno viskoznost hidrogelov za vlažno celjenje ran, smo uporabili tri hidrogele s tržišča: Purilon[®], Intrasite[®] in Tegaderm[®]. Vsi se že uporabljajo kot sodobne obloge za vlažno celjenje ran, med seboj pa se razlikujejo po sestavi ter proizvajalcu.

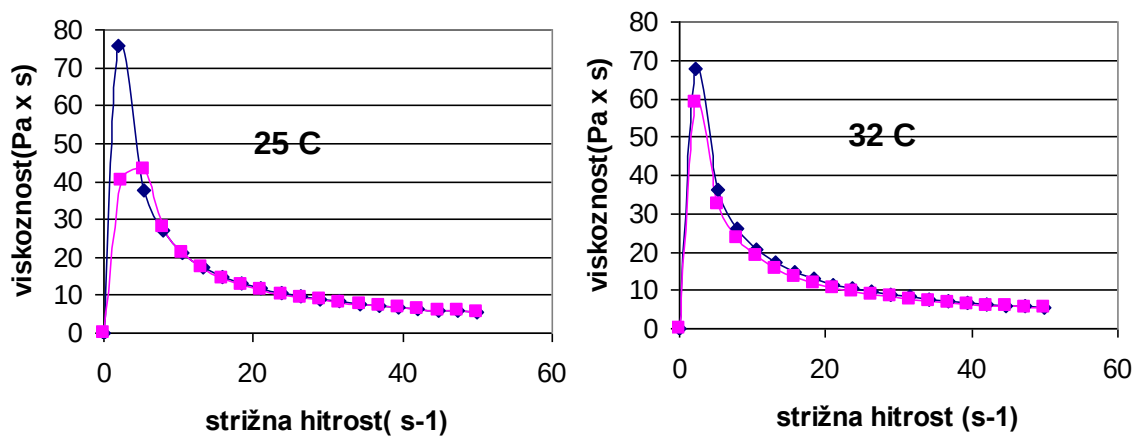
V ta namen smo vse hidrogele s tržišča reološko ovrednotili s pomočjo rotacijske reometrije s sistemom stožec-ploščica pri treh različnih temperaturah in tako opredelili odvisnost viskoznosti od temperature. Temperature, ki smo jih izbrali, predstavljajo realne situacije, katerim je hidrogel izpostavljen. Hidrogele shranjujemo pri sobni temperaturi, zato je izbrana temperatura 25°C. Ko hidrogel naneseemo na odprto rano je temperatura približno 37°C oziroma 32°C v primeru površinske rane.

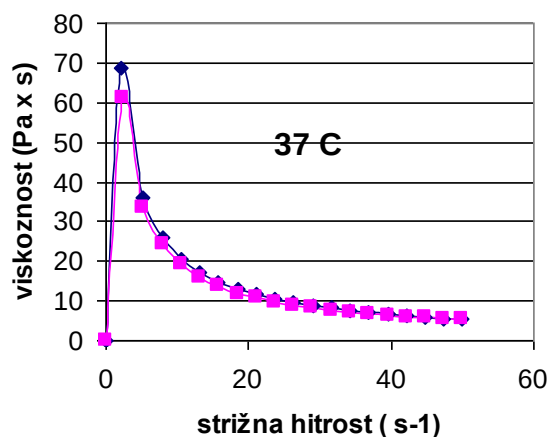
Viskoznostni reogrami različnih hidrogelov pri različnih temperaturah imajo vsi podobno obliko (slika 14,15,16), zato lahko sklepamo, da imajo vsi sistemi med seboj primerljive tiksotropne lastnosti. Tiksotropni sistemi so sistemi, katerih obnašanje je odvisno tudi od časa delovanja mehanske sile. Viskoznost tiksotropnih sistemov s časom in naraščajočo obremenitvijo pada, kar je značilno za gele in paste. Razlog za tiksotropijo je porušenje strukture sistema v obremenitveni fazi, v razbremenitveni fazi pa se po določenem času struktura ponovno zgradi (reverzibilen proces). Če je čas do povrnitve strukture neskončen, pravimo, da gre za nepopolno tiksotropijo (17).

Pri vseh treh obravnavanih hidrogelih sicer gre za reverzibilen proces (slika 14,15,16), vendar v primeru Purilon[®]-a in Tegaderm[®]-a (slika 15,16) do popolne obnovitve strukture hidrogela ne pride. Opazna je namreč histerezna zanka, katere površina je mera za tiksotropijo, njena velikost in oblika pa sta odvisni od strižnih pogojev in časa trajanja eksperimenta (18). Vse razlike so seveda posledica različnih osnovnih komponent. Ker natančne sestave, tako kvalitativne kot kvantitativne, od proizvajalcev nismo mogli dobiti, bolj poglobljena diskusija ni mogoča.

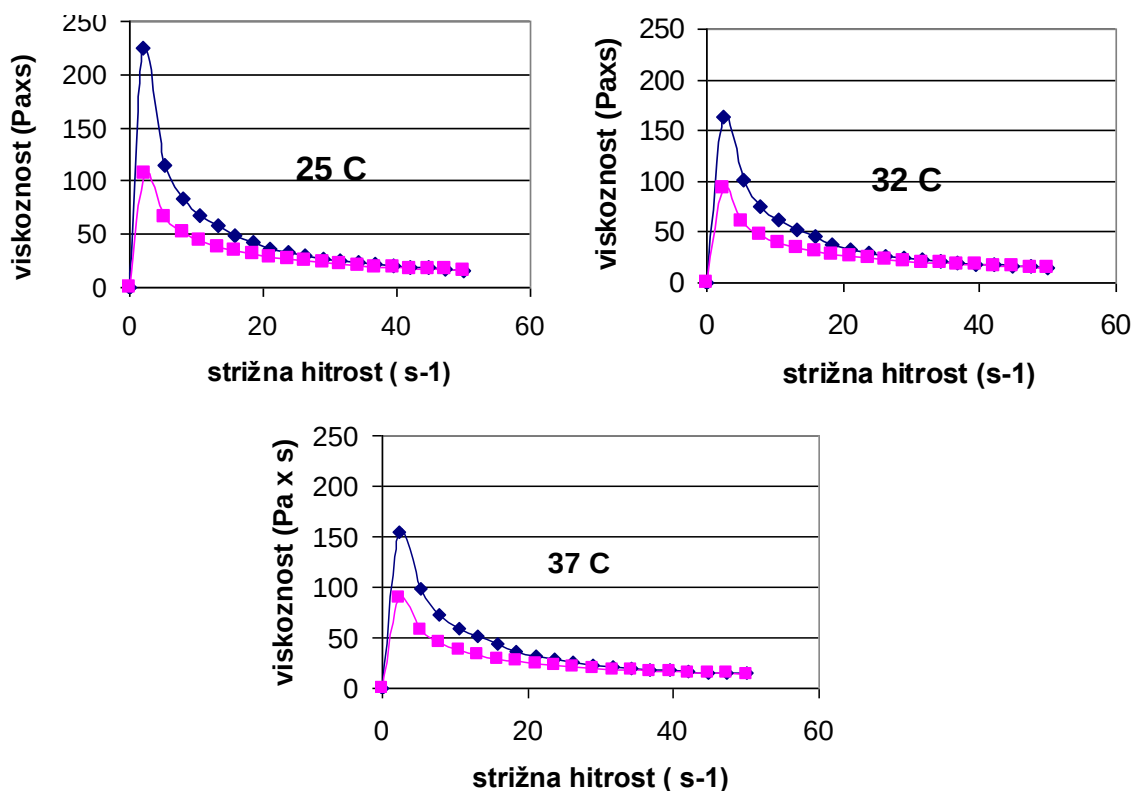


Slika 14: Viskoznostni reogram Intracite[®] hidrogela pri 25°C, 32°C in 37°C, kjer predstavlja naraščajočo strižno hitrost od 0-50 modra, padajočo od 50-0 pa roza krivulja.





Slika 15: Viskoznostni reogram Tegaderm® hidrogela pri 25°C, 32°C in 37°C, kjer predstavlja naraščajočo strižno hitrost od 0-50 modra, padajočo od 50-0 pa roza krivulja.



Slika 16: Viskoznosti reogram Purilon® hidrogela pri 25°C, 32°C in 37°C, kjer predstavlja naraščajočo strižno hitrost od 0-50 modra, padajočo od 50-0 pa roza krivulja.

Iz viskoznostnih reogramov smo odčitali viskoznost za posamezni hidrogel pri strižni hitrosti približno $2,3 \text{ s}^{-1}$ (druga točka meritve), kjer je bila le- ta najvišja (Preglednica I).

Iz tabele je razvidno, da imajo lahko hidrogeli kot sodobne obloge zelo različne viskoznosti. Tako lahko postavimo širok interval, znotraj katerega viskoznost lahko variira,

in sicer med 50 in 225 Pa*s, pri večini primerov pa s povišanjem temperature opazimo padec viskoznosti, kar je značilno za gelske sisteme. Povišanje temperature pomeni večjo mobilnost polimernih verig v vodnem mediju, zato je načeloma potrebna manjša obremenitev za porušenje strukture oziroma za ureditev polimernih verig v smeri deformacije (18). Pri povišani temperaturi je viskoznost manjša zaradi manjše upornosti gela proti vsiljeni deformaciji.

Preglednica I: Viskoznost (Pas) hidrogelov s tržišča pri različnih temperaturah

HIDROGEL	Viskoznost pri 25°C	Viskoznost pri 32°C	Viskoznost pri 37°C
Purilon [®]	225,3 ± 8,51 Pas	163 ± 4,58Pas	154,3 ± 6,11 Pas
Tegaderm [®]	75,7 ± 3,16Pas	67,7 ± 1,59 Pas	68,7 ± 2,66 Pas
Intrasite [®]	67,9 ± 1,77 Pas	56,1 ± 1,45 Pas	51,0 ± 1,53 Pas

6.2 IZBIRA SESTAVIN ZA IZDELAVO HIDROGELOV

Izmed velikega nabora polimerov smo glede na literaturne podatke o optimalnih lastnostih za polimere, ki tvorijo sodobne obloge za vlažno celjenje, izbrali hidroksietilcelulozo in ksantan iz naslednjih razlogov:

- oba polimera imata hidrofilni značaj,
- oba polimera sta biokompatibilna,
- oba polimera imata hidroksilne skupine, ksantan tudi karboksilne. Le te na eni strani omogočajo reakcije z radikali in tako zmanjšujejo oksidativni stres, na drugi pa te iste funkcionalne skupine omogočajo tvorbo vodikovih in elektrostatskih interakcij z encimi ter s tem inhibicijo njihovega prekomernega izražanja v kroničnih ranah,
- z izbiro ustrezne koncentracije polimerov lahko pripravimo hidrokele z ustrezno viskoznostjo po geliranju.

Glicerol ima v hidrogelu vlogo vlažilca. Tako omogoča lažje raztapljanje HEC na začetku priprave hidrogela ter hidratacijo polimernih verig ob geliranju. Skupaj z vodnim medijem je imobiliziran v koherentni rešetki iz HEC in preprečuje prikrito izhlapevanje vode po aplikaciji hidrogela.

Za zaščito pred razvojem mikroorganizmov smo izbrali enak konzervans - natrijev tetraborat- kot v komercialnih hidrogelih. Najpogosteje uporabljena koncentracija natrijevega tetraborata v gelskih sistemih je 0,1%, zato smo to koncentracijo uporabili tudi pri našem delu. Zavedamo se, da iz odločbe Komisije evropskih skupnosti z dne 21. junija 2007 izhaja, da borova kislina, borati in perborati ne smejo biti vključeni v proizvod, niti kot del sestave niti kot del kateregakoli pripravka, vključenega v sestavo, zaradi njihove toksičnosti tudi pri dermalnih pripravkih (22). Vendar pa smo v našem delu natrijev tetraborat vseeno uporabili, ker je prisoten tudi v komercialnih hidrogelih. Poleg tega je šlo pri našem delu še vedno za začetne študije v in vitro sistemih, v primeru nadaljnjih testiranj pa bi bilo potrebno konzervans zamenjati. Pod pogojem, da konzervans na strukturo proteina ne bi vplival, menimo, da se uporaba drugega konzervansa, predvsem zaradi uporabljenih nizkih koncentracij, ne bi bistveno odražala na rezultatih.

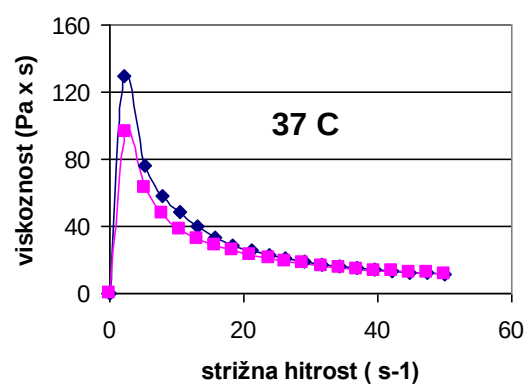
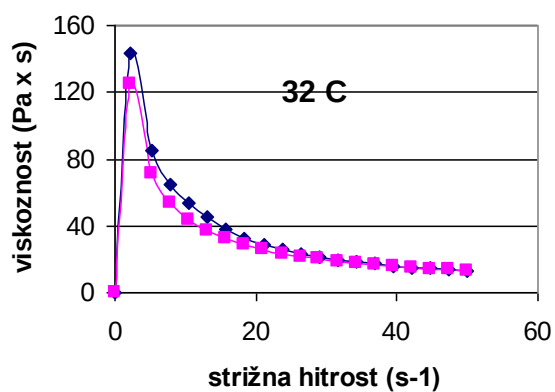
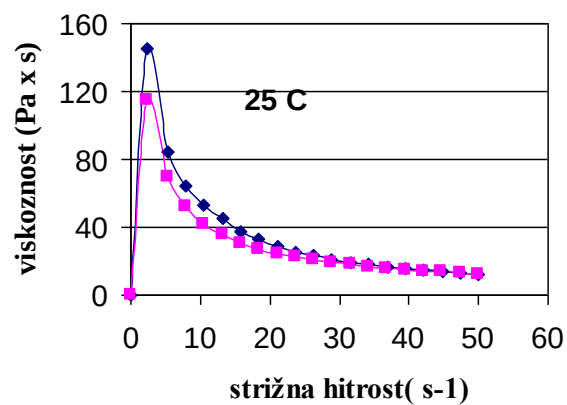
6.3 IZBIRA USTREZNE KONCENTRACIJE POLIMERA ZA IZDELAVO HIDROGELOV IN NJIHOVA STERILIZACIJA

Izdelali smo hidrokele z 1,5-, 3-, 4,5-odstotno koncentracijo obeh polimerov in dodatno še hidrogel s 6% ksantanom ter jih reološko ovrednotili. Sliki 16 in 17 predstavljata tipične viskoznostne reograme. Opazimo, da so tudi v primeru HEC-ih in ksantanskih hidrogelov viskoznostne krivulje podobne tistim s tržišča (slika 14, 15, 16).

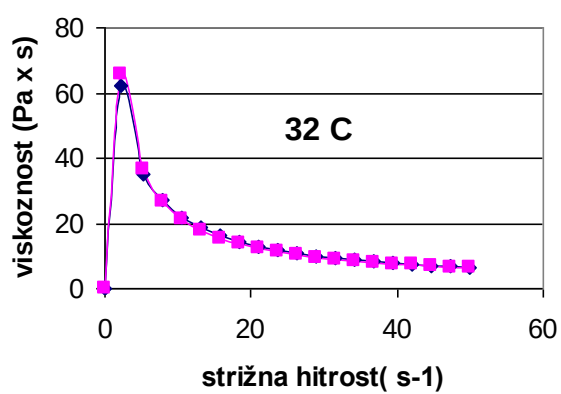
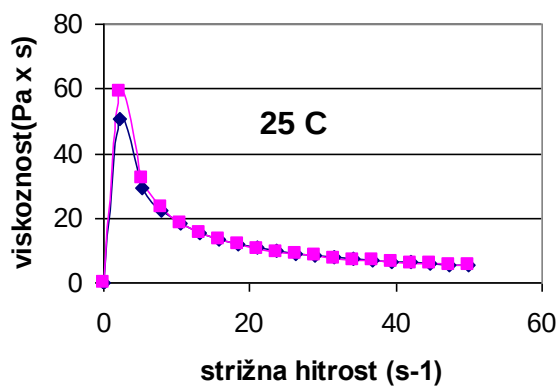
Pri treh različnih temperaturah sta izmed vseh hidrogelov postavljenim mejam viskoznosti, od 50 do 225 Pas, ustrezala le 3% HEC hidrogel ter 6% hidrogel iz ksantana z višjo viskoznostjo (preglednica II). Viskoznost vseh ostalih hidrogelov je bila bodisi prenizka (1,5% HEC, vsi odstotki nizkoviskoznega ksantana ter 1,5-,3-, 4,5- odstotki viskoviskoznega ksantana) bodisi previsoka (4,5% HEC hidrogel). Vsi rezultati so zbrani v preglednici II.

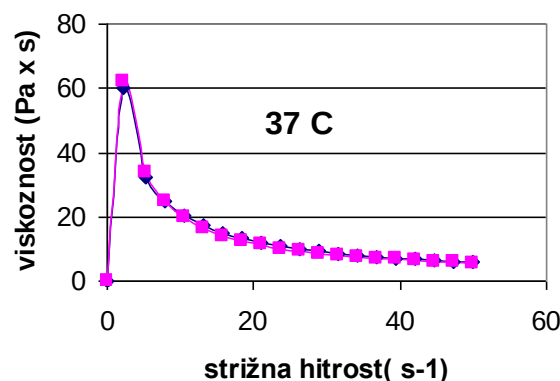
Viskoznost HEC hidrogelov nekoliko pade s temperaturo, pri hidrogelih iz ksantana pa se viskoznost v temperaturnem območju od 25 do 37°C praktično ne spremeni.

Zaključimo lahko, da tako 3% HEC hidrogel kot tudi 6% ksantanski hidrogel z višjo viskoznostjo dobro posnemata že uveljavljene sodobne obloge za vlažno celjenje ran.



Slika 17: Viskoznostni reogram 3% HEC hidrogela pri 25°C, 32°C in 37°C, kjer predstavlja naraščajočo strižno hitrost od 0-50 modra, padajočo od 50-0 pa roza krivulja.





Slika 18: Viskoznostni reogram 6% hidrogela iz viskoviskoznega ksantana pri 25°C, 32°C in 37°C, kjer predstavlja naraščajočo strižno hitrost od 0-50 modra, padajočo od 50-0 pa roza krivulja.

V naslednji stopnji smo hidrogel s primerno viskoznostjo sterilizirali v avtoklavu ter jih po končanem procesu organoleptično ocenili in ponovno reološko ovrednotili. Ker je reološko obnašanje zelo odvisno od zgodovine vzorcev, smo meritve viskoznosti po sterilizaciji izvedli po 24 urah.

3% HEC hidrogel je po sterilizaciji ostal brezbarven, njegova čvrstost se je na videz zmanjšala, saj je bil po izgledu bolj tekoč. Rezultati reološkega vrednotenja pa so pokazali, da se je viskoznost spremenila malo, z naraščanjem temperature je še dodatno padla, a je kljub temu še vedno znotraj postavljenih mej viskoznosti od 50-225 Pas (preglednica II).

6% hidrogel iz ksantana je po sterilizaciji postal bolj rumen, lepljiv in gostejši. Viskoznost le tega se je po sterilizaciji pri vseh temperaturah povečala, a je bila prav tako še vedno znotraj zahtevanega intervala (preglednica II). Ksantan pri povišani temperaturi preide v denaturirano obliko, kar pomeni, da stranske trisaharidne verige štrlijo stran od osnovne verige. To pa pomeni, da je veliko hidrofilnih skupin izpostavljenih mediju, afiniteta vode do polimera je velika. Vodne molekule se uredijo okrog ksantana, zato pri povišani temperaturi viskoznost naraste.

Vse hidrogelne smo nato izdelali tudi s PBS namesto z vodo. Zamenjavo smo izvedli z namenom, da bi ugotovili vpliv povečane osmolarnosti na viskoznost. Vse seveda s ciljem zagotovitve optimalnega okolja modelnemu proteinu v hidrogelu, vendar kljub temu ohraniti želene reološke lastnosti. Vpliv zamenjave vode s PBS smo pri HEC hidrogelu opazili kot majhen padec viskoznosti, pri ksantanu pa je prišlo do povečanja le te (preglednica II). Vzrok temu je struktura polimerov. HEC je neionski polimer, zato je nabrekanje relativno neodvisno od ionske moči. Zaradi povečane ionske moči lahko pride

do odtegnitve vodnega medija (izsoljevanje) in zato nekoliko nižja viskoznost. Z razliko od HEC pa ionska jakost močno vpliva na strukturo osnovnih molekul ksantana. V mediju z višjo ionsko jakostjo se molekule ksantana nahajajo praviloma v nativni konformaciji, v tej obliki pa, po nekaterih literaturnih podatkih, lahko tvorijo bolj čvrst gel (16). V našem primeru pa gre za kombinacijo vpliva pH in ionske moči medija na strukturo ksantana. pH s PBS izdelanega hidrogela je 7, kar pomeni, da so po eni strani $-\text{COOH}$ skupine ionizirane, dodani elektroliti pa senčijo negativne naboje. Glede na rezultate viskoznosti kaže, da ionizacija prevladuje nad senčenjem naboja, saj se viskoznost poveča. To pomeni, da ksantan ni ohranil nativne strukture, pač pa je prešel v denaturirano obliko, kjer je količina vezane vode na polimer lahko večja in viskoznost sistema naraste.

Preglednica II: Zbrani rezultati viskoznosti hidrogelov pred in po sterilizaciji ter z uporabo PBS kot vodnega medija

POLIMER	Viskoznost pri 25°C	Viskoznost pri 32°C	Viskoznost pri 37°C
HEC 1,5%	21,7 ± 1,65 Pas	20,5 ± 0,43 Pas	11,3 ± 7,33 Pas
HEC 3%	145 ± 3,46 Pas	143,7 ± 7,55 Pas	129,3 ± 7,51 Pas
HEC 4,5%	412 ± 4,21 Pas	408,3 ± 6,98 Pas	390,2 ± 8,97 Pas
HV ksantan 1,5%	18,8 ± 2,33Pas	19,5 ± 1,76 Pas	19,7 ± 1,84 Pas
HV ksantan 3%	27,9 ± 5,63 Pas	30,5 ± 2,11 Pas	30,3 ± 3,54 Pas
HV ksantan 4,5%	36,4 ± 7,22 Pas	43,3 ± 2,21 Pas	40,2 ± 2,55 Pas
HV ksantan 6%	50,6 ± 1,56 Pas	62,3 ± 6,01Pas	60,3 ± 10,5 Pas
STERILIZACIJA			
HEC 3%	111 ± 2,43 Pas	94,2 ± 3,55 Pas	81,6 ± 6,32 Pas
HV ksantan 6%	121 ± 7,07 Pas	132 ± 5,33 Pas	102 ± 8,69 Pas
PBS			
HEC 3%	134 ± 4,24 Pas	131 ± 3,22 Pas	116 ± 7,89 Pas
HV ksantan 6%	93,2 ± 1,13 Pas	90,2 ± 2,65 Pas	96,3 ± 2,89 Pas

Za nadaljnje delo smo izbrali 3% HEC hidrogel zaradi bistveno lažje izdelave in s tem povezano manjšo verjetnostjo poškodovanja nativne strukture proteina. Dodatno je k odločitvi prispevalo dejstvo, da je njegova viskoznost ravno nekje na sredini postavljenega intervala viskoznosti, ter da so HEC hidrogeli mikrobiološko bolj obstojni kot hidrogeli iz

ksantana. Na osnovi reoloških meritev smo prav tako ugotovili, da je sama struktura ksantanskega hidrogela bistveno bolj občutljiva tako na povišanje ionske jakosti ter pH kot tudi na pogoje sterilizacije, kar pomeni, da bi sistemi na osnovi ksantana le težko zagotavljali enakomerno sproščanje proteina.

6.4 STABILNOSTI ALBUMINA IN ENAKOMERNOST PORAZDELITVE PO HIDROGELU

6.4.1 Določitev enačbe umeritvene premice

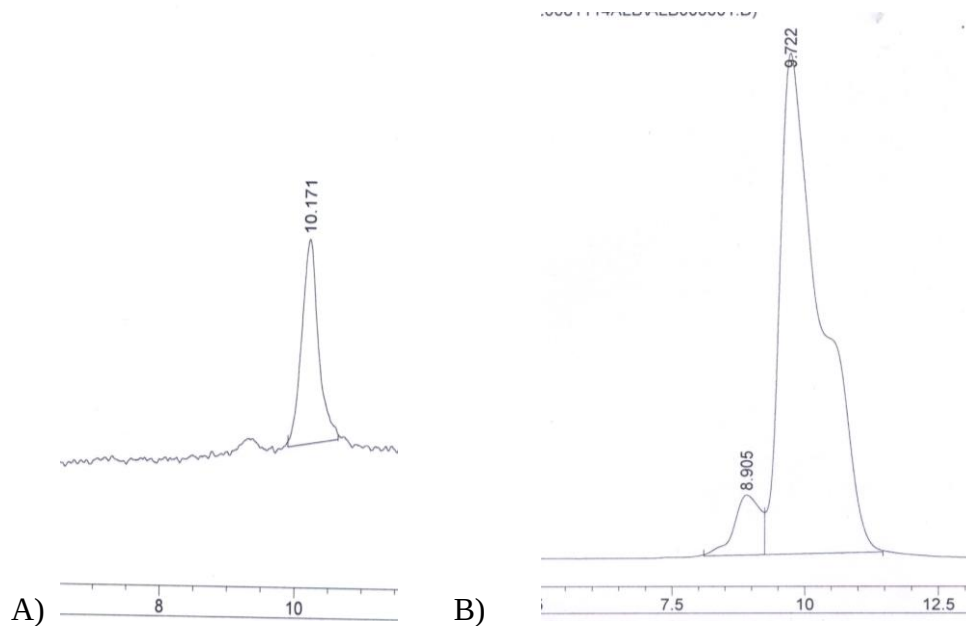
Izdelali smo različne koncentracije raztopin jajčnega albumina ter jih ovrednotili s HPLC metodo. V splošnem se, predvsem zaradi nižje cene, v raziskavah pogosteje uporablja goveji albumin (MM= 69 kDa) kot jajčni, vendar pa ga pri našem delu nismo uporabili, saj je molekulska masa jajčnega manjša (MM= 44 kDa) in s tem bližje molski masi cistatina (MM= 14 kDa). Jajčni albumin je zato predstavljal primernejši modelni protein. Temu primerno smo izbrali tudi HPLC kolono, ki je bila primerna za določitev molekulske mase od 4 do 400 kDa. Ostali eksperimentalni podatki so opisani v poglavju Eksperimentalno delo 5.3.5.2.

Na kromatogramu iz umeritvene premice je jasno viden kromatografski vrh z retencijskim časom okoli 10 min (slika 19A). Z višanjem koncentracije albumina se poleg tega osnovnega vrha pojavljata še dodatna vrhova s retencijskim časom 9,0 min in 11,0 min (slika 19B). Ker tudi ta dva kromatografska vrhova predstavljata albumin (razlaga v poglavju 6.5.2), smo iz podatkov o površinah pod vsemi krivuljami pri različnih koncentracijah postavili umeritveno premico (slika 20) z enačbo:

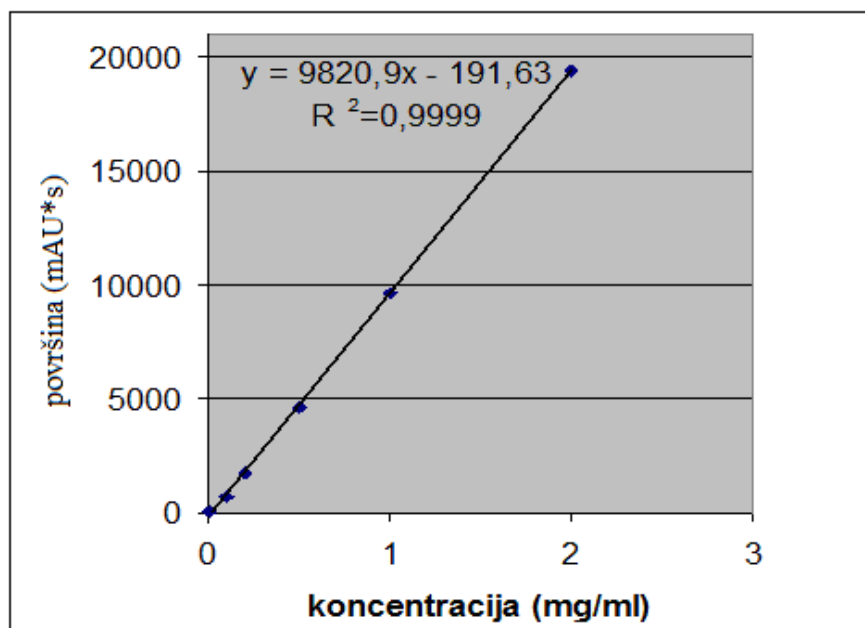
Enačba umeritvene premice:

$$A=9820,9 \cdot c - 191,63 \rightarrow c[\text{mg/ml}] = (A + 191,63) / 9820,9 \quad / \text{enačba 1/},$$

kjer A predstavlja vsoto površin pod krivuljami ($R_t = 9-11$ min), c pa koncentracijo albumina.



Slika 19: Oblike kromatografskih vrhov za albumin pri različnih koncentracijah v mobilni fazi: A) 0,1 mg/ml, B) 1mg/ml

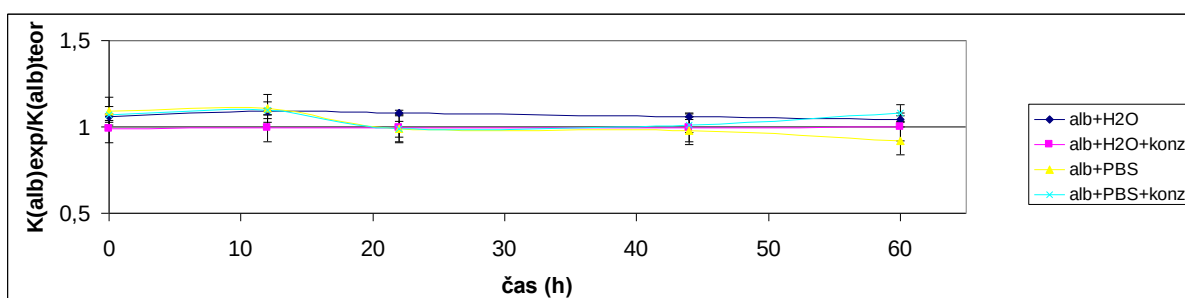


Slika 20: Umeritvena premica: odvisnost vsote površin pod vrhovi albumina od njegove koncentracije v mobilni fazi.

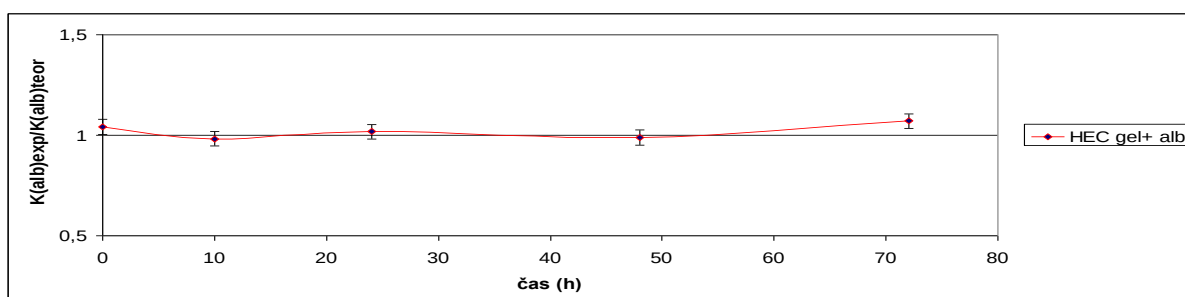
6.4.2 Stabilnost albumina in enakomernost porazdelitve po hidrogelu

Preverili smo, ali je jajčni albumin po vgradnji v hidrogel stabilen, zlasti v smislu tvorbe agregatov in vezave na polimer v hidrogelu. Znano količino albumina smo natehtali v različne medije: vodo ali PBS z ali brez konzervansa, nato pa smo s HPLC analitiko preverjali, ali lahko to znano količino tudi določimo. Albumin smo v mediju pustili do časa 60 ur, s čimer smo preverili, ali do kakršnekoli agregacije morda pride v časovnem obdobju izvajanja preskusa sproščanja. Rezultati so prikazani na sliki 21 in so podani kot razmerje med eksperimentalno določeno koncentracijo albumina (iz površin s pomočjo umeritvene premice) in dejansko, ki smo jo pripravili. Ker je razmerje $K(\text{alb})_{\text{exp}}/K(\text{alb})_{\text{teor}} = 1$ za vse vzorce, pomeni, da smo teoretično koncentracijo albumina v vseh medijih lahko tudi eksperimentalno določili. To pa pomeni, da PBS in konzervans na določitev albumina ne vplivata. Prav tako v času 60 ur ne povzročata njegove agregacije.

Nato smo 86,9 mg albumina vgradili v hidrogel (koncentracija 1mg/ml) in ga pustili 24 ur. Po 24 urah smo ga raztopili v PBS in določili, koliko ga dejansko lahko detektiramo (slika 22).



Slika 21: Spremljanje znane koncentracije albumina v različnih medijih v odvisnosti od časa. $K(\text{alb})_{\text{exp}}$ pomeni koncentracijo albumina določeno iz umeritvene krivulje s HPLC analizo, $K(\text{alb})_{\text{teor}}$ pa je dejanska koncentracija albumina, ki je bila 1mg/ml ($n=3$)



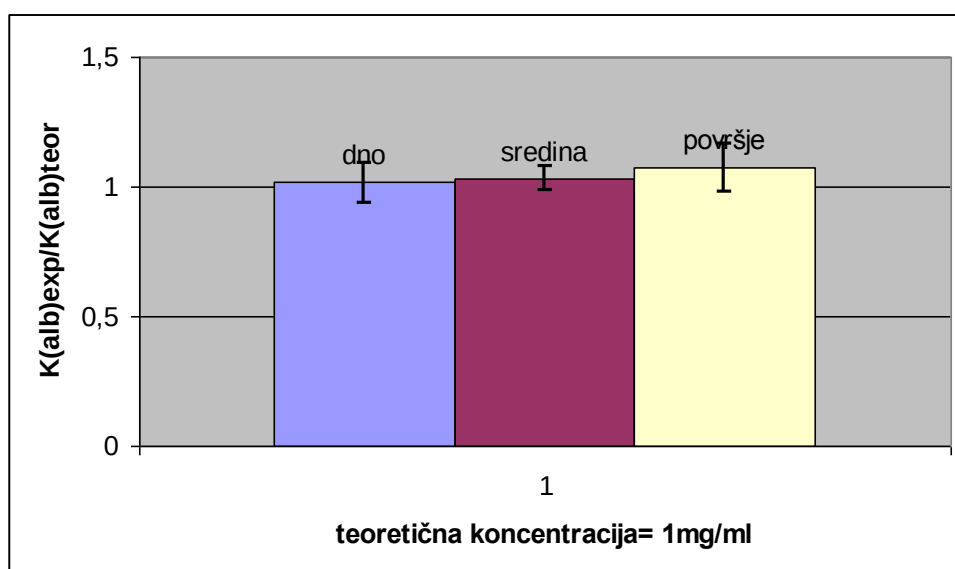
Slika 22: Spremljanje znane koncentracije albumina v hidrogelu. $K(\text{alb})_{\text{exp}}$ pomeni koncentracijo albumina določeno iz umeritvene krivulje s HPLC analizo, $K(\text{alb})_{\text{teor}}$ pa je dejanska koncentracija albumina, ki je bila 1mg/ml ($n=3$)

S slik 21 in 22 je razvidno, da smo albumin lahko določali tako v PBS s konzervansom ali brez in tudi v hidrogelu. Najverjetneje albumin ohranja tudi svojo nativno strukturo. To smo lahko sklepali iz dveh razlogov:

- začetna koncentracija se ni spreminjala ter je ostajala tudi po večih dneh enaka
- kromatografski vrhovi so pri vseh odvzetih vzorčkih bili enaki po obliki in retencijskih časih ($t \approx 10$ min).

Velja omeniti, da sta imela vzorca brez konzervansa po koncu testiranja bolj neprijeten vonj, ki je nakazoval, da je verjetno že prišlo do mikrobiološke kontaminacije.

Eden od pomembnih preliminarних poskusov je bil tudi ugotavljanje homogenosti vzorca in ponovljivosti ročne izdelave. Zato smo izdelali 3% HEC hidrogel z vgrajenim albuminom v treh ponovitvah. Naš cilj je bil optimizirati postopek izdelave do te mere, da bo omogočil enakomerno porazdelitev albumina po celotnem hidrogelu. Iz vseh treh pripravljenih hidrogelov smo odvzeli več vzorčkov hidrogela iz različnih mest (3 odvzemi s posameznega mesta) ter jim določili vsebnost albumina (slika 23).



Slika 23: Koncentracije albumina na različnih mestih odvzema v hidrogelu. $K(\text{alb})_{\text{exp}}$ pomeni koncentracijo albumina določeno iz umeritvene krivulje s HPLC analizo, $K(\text{alb})_{\text{teor}}$ pa je dejanska koncentracija albumina, ki je bila 1mg/ml ($n=3$)

Čeprav je postopek izdelave ročen, smo potrdili, da je albumin enakomerno porazdeljen po celotnem sistemu in da ni prišlo do lokalnega kopičenja le tega (stolpčni diagram). Na vseh mestih odvzema smo določili vsebnost albumina v hidrogelu zelo blizu teoretični.

S slike 23 je razvidno, da je nekoliko višja koncentracija na površju hidrogela, vendar je razlika minimalna oziroma nesignifikantna. Višja koncentracija na površini lahko predstavlja tudi dodatno prednost, saj je zgornja površina tista, ki bo prva v stiku s rano in bo na tak način čas potreben za doseg terapevtske koncentracije krajši.

Velja omeniti, da za zdaj v literaturi še nikjer ni navedeno ali opisano, kolikšna bi bila terapevtska koncentracija proteaznega inhibitorja, da bi ravnotežje pri celjenju ran premaknili v pravo smer. V našem primeru smo izbrali koncentracijsko območje do 1mg/ml, kar je primerno zlasti s stališča HPLC analitike. Menimo pa, da so »terapevtske« koncentracije s tem precej presežene.

6.5 SPROŠČANJE ALBUMINA IZ HIDROGELA

6.5.1 Sproščanje albumina iz 3% HEC hidrogela

Ob iskanju primerne modela za sproščanje albumina (Eksperimentalni del 5.3.5) smo na začetku preverili, ali ostaneta plasti hidrogela in medija ločeni, potem ko pufer nalijemo neposredno na hidrogel. To pa je možno le, če raztapljanje hidrogela ob stiku s pufrom ni prehitro, plasti morata ostati ločeni po večih dneh izpostavitve. Dodaten sprejem vode v strukturo hidrogela je sicer sprejemljiv, če pri tem hidrogel še ohrani svojo strukturiranost. Ni pa dopustna popolna raztopitev hidrogela, saj takšen sistem ne bi zagotavljal nadzorovanega sproščanja modelnega proteina.

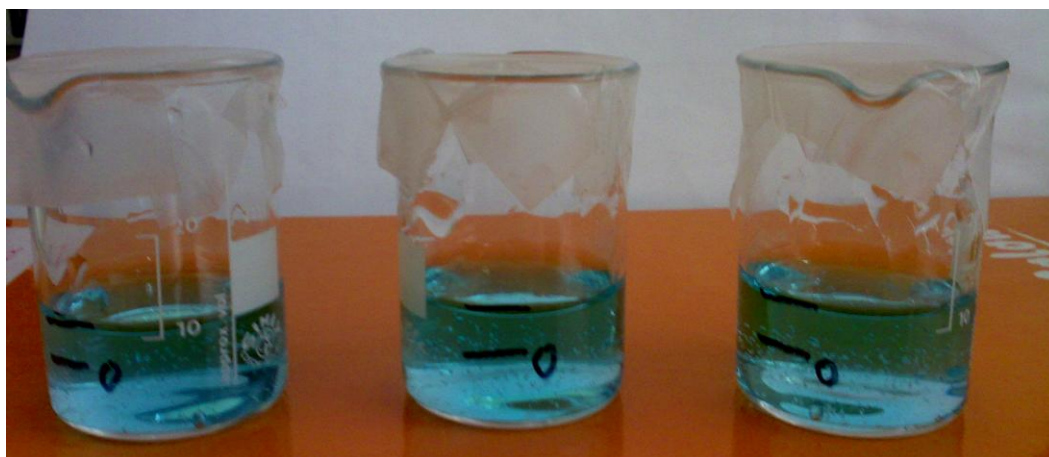
Pufer smo obarvali modro z metilenskim modrilom, da bi, sicer brezbarven medij, lahko videli ter spremljali obarvanost hidrogela v stiku z obarvanim PBS več dni. Do 24 h od začetka testiranja je hidrogel ostal brezbarven, plasti medija in hidrogela pa sta bili jasno ločeni (slika 24). Po tem času smo opazili, da je hidrogel sprejel nekaj medija in se obarval modro, ločeni plasti nista bili več tako jasno vidni (slika 25). Vendar pa je bilo še vedno možno odliti medij nad gelom, pri čemer je v čaši ostal hidrogel, a nekoliko šibkejše konsistence.

3% HEC hidrogel se torej počasi raztaplja, saj so pogoji precej stacionarni. HEC je visokomolekularni polimer, katerega erozija je ob tako stacionarnih pogojih počasna. Polimer je prav tako dobro hidratiran, zato dodatnega PBS medija ne sprejema tako intenzivno. Po 4 dneh sicer res sprejme dodatno približno 36% medija, vendar je struktura

hidrogela ohranjena in omogoča odvzem vzorca vzorce medija nad gelom. Potrdili smo, da je postavljen model za sproščanje albumina primeren.



Slika 24: 3% hidrogel HEC v stiku z obarvanim PBS po 6 urah. Oznaka 0 predstavlja začetno višino hidrogela v čaši.



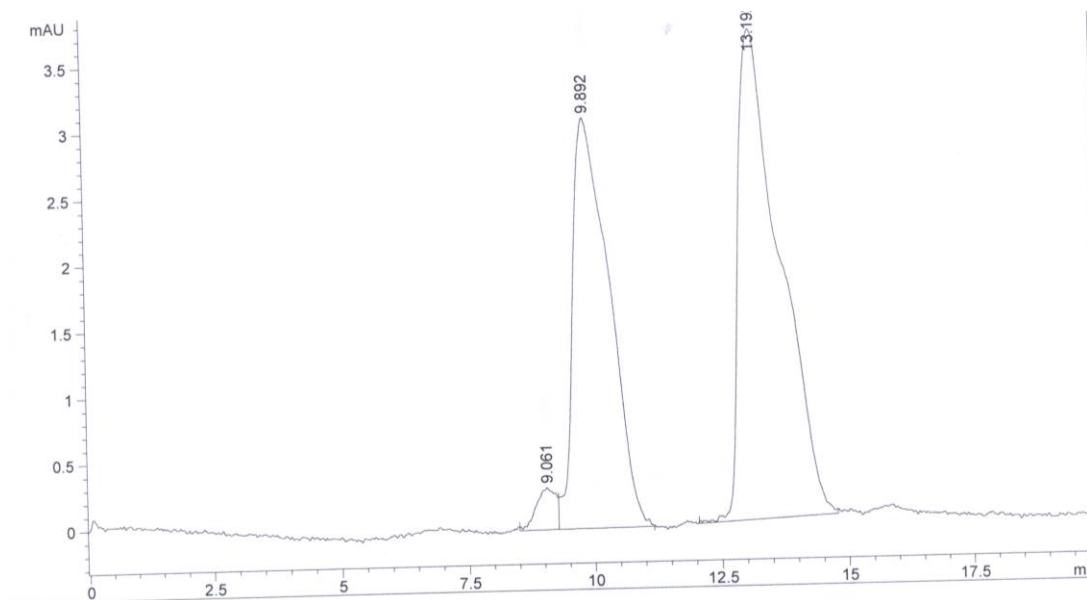
Slika 25: 3% hidrogel HEC v stiku z obarvanim PBS po 48 urah. Oznaka 0 predstavlja začetno višino hidrogela v čaši.

Po ugotovitvi, da se HEC ne raztaplja prehitro v PBS, smo pripravili hidrogel z vgrajenim albuminom, ga približno 1g prenesli z injekcijsko brizgo v penicilinke, dodali dvakratni volumen pufru ter izvedli najprej 2-dnevno, nato še 4-dnevno sproščanje. Poleg hidrogelov z vgrajenim proteinom smo izvajali sproščanje tudi iz hidrogelov brez albumina, t.i. praznih hidrogelov, ki so predstavljali negativno kontrolo. Naš cilj je bil narediti takšen dostavni sistem, ki bo omogočal čim bolj kontrolirano enakomerno sproščanje albumina skozi daljši časovni interval (nekaj dni), saj je za sodobne obloge značilno, da jih ne menjujemo vsakodnevno. V tem času naj bi se iz hidrogela sprostil ves albumin in ne bi

zaostajal v hidrogelu, saj bi to kasneje pomenilo, da v realnih pogojih ne bo na voljo vsa učinkovina oziroma bi le to z menjavo obloge odstranili skupaj s hidrogelom.

V rednih časovnih intervalih smo odvezemali 500 μ l vzorčke iz sredine PBS medija s pipeto ter jih prenesli direktno v vialo, ki so namenjene testiranju vzorcev na HPLC sistemu. Vse vialo smo takoj po odvzemu zamrznili in jih zamrznjene shranjevali do začetka kromatografije.

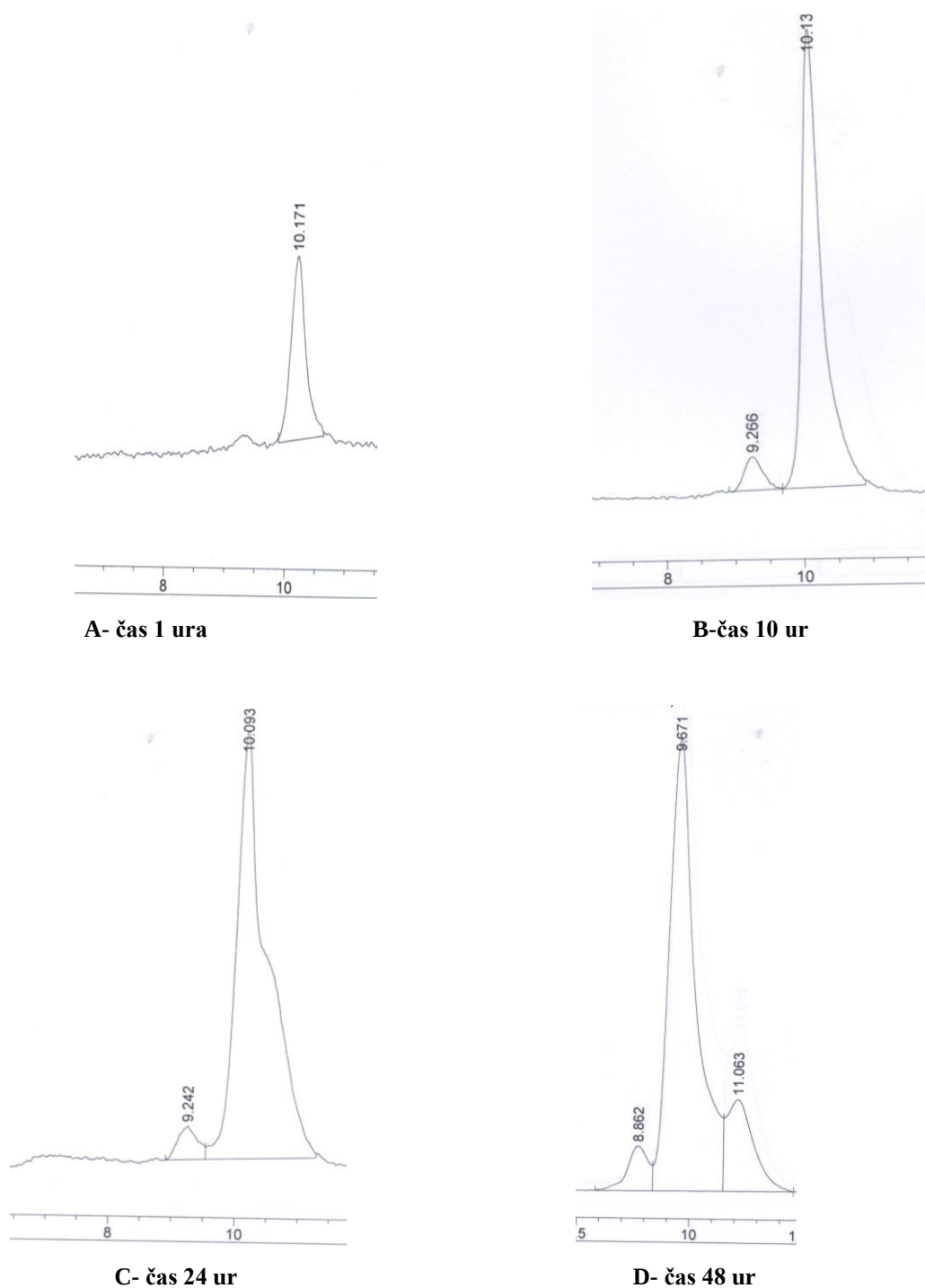
Kromatogrami, ki smo jih posneli s HPLC na odvzetih vzorcih, so imeli enega ali več vrhov z retencijskim časom okoli 10 min ter dodaten vrh z retencijskim časom pri 13 min (slika 26). Vemo, da je retencijski čas albumina okoli 10 min, zato smo se lotili ugotavljanja, kaj predstavljajo dodatni vrhovi.



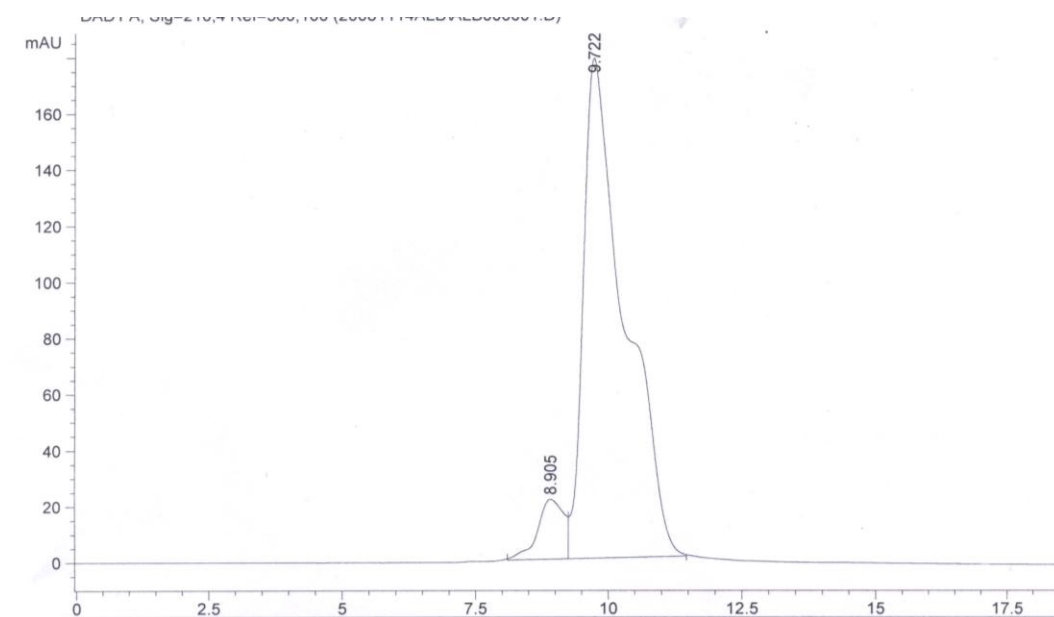
Slika 26: Tipičen kromatogram, ki smo ga posneli na vzorcu po 24 urah sproščanja .

Opazili smo, da se z večanjem koncentracije sproščenega albumina začne najprej spreminjati oblika osnovnega vrha albumina (rama-slika 27C), prav tako se formirata še dodatna vrhova ($R_t = 9.0$, $R_t = 11.0$ min), ki se držita osnovnega vrha, kar prikazuje slika 27 (A-D). Ko smo raztopili samo albumin v višji koncentraciji v PBS pufru in posneli spekter smo dobili enako obliko kromatograma (slika 28) kot v primeru sproščanja albumina (slika 27C) ali obliko vrha albumina v mobilni fazi (slika 19B). Za razjasnitev, kaj so ti trije kromatografski vrhovi ($R_t = 9.0$, 10.1 , 11.0 min), smo posneli UV spektre in ugotovili, da vsi kažejo enak absorpcijski spekter (slika 29 A-C). Zato smo sklepali, da vsi

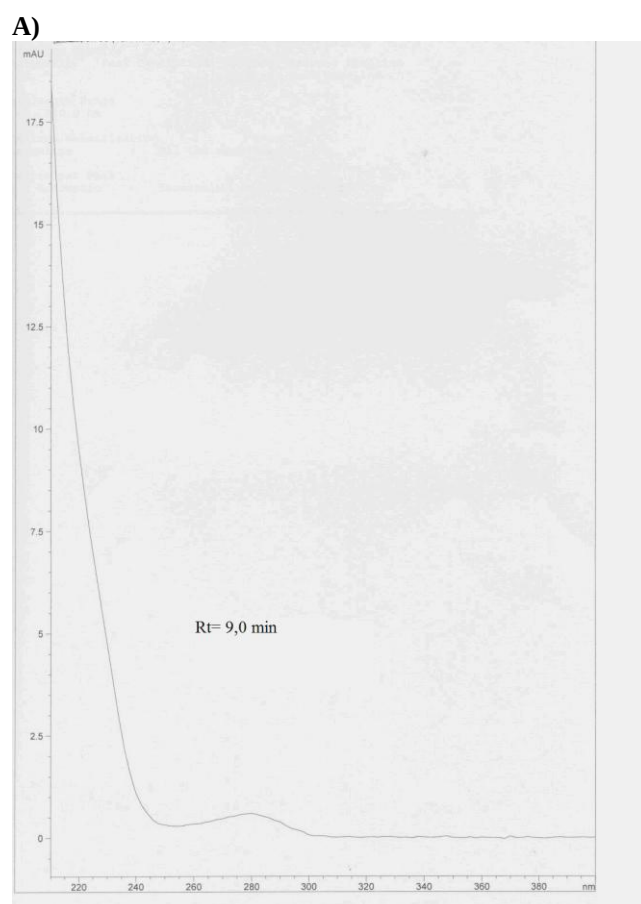
ti trije vrhovi pripadajo albuminu. Ker gre očitno že v osnovi za takšen vzorec, smo v primerih, ko je sistem bil zmožen detektirati ter kvantificirati te vrhove, pri vseh izračunih upoštevali vse vrhove. Ti vrhovi se pojavijo le pri višji koncentraciji sproščenega albumina, zato menimo, da so to nekoliko večje molekule albumina, ki difundirajo počasneje in se lahko sprostijo šele, ko se s površine že razplete nekaj polimernih verig HEC.



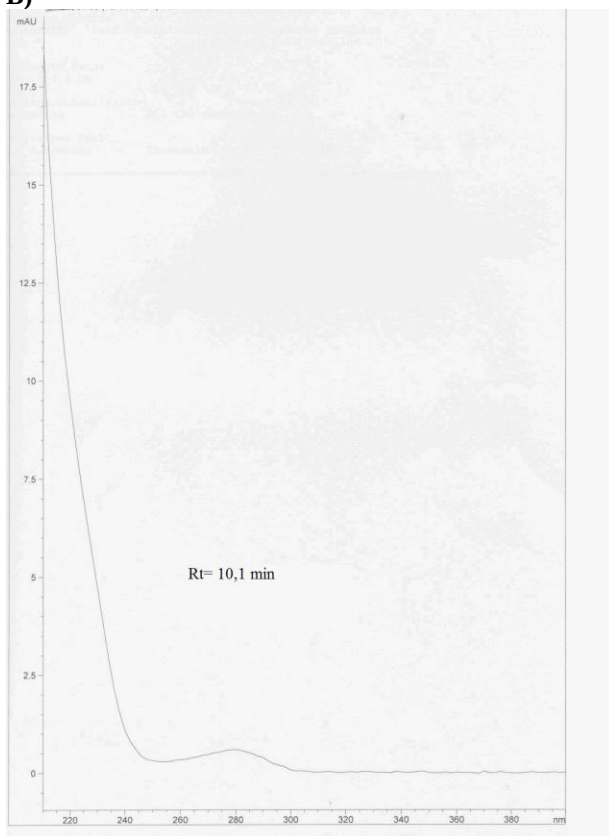
Slika 27: Spreminjanje oblike kromatografskega vrha za albumin po različnem času sproščanja



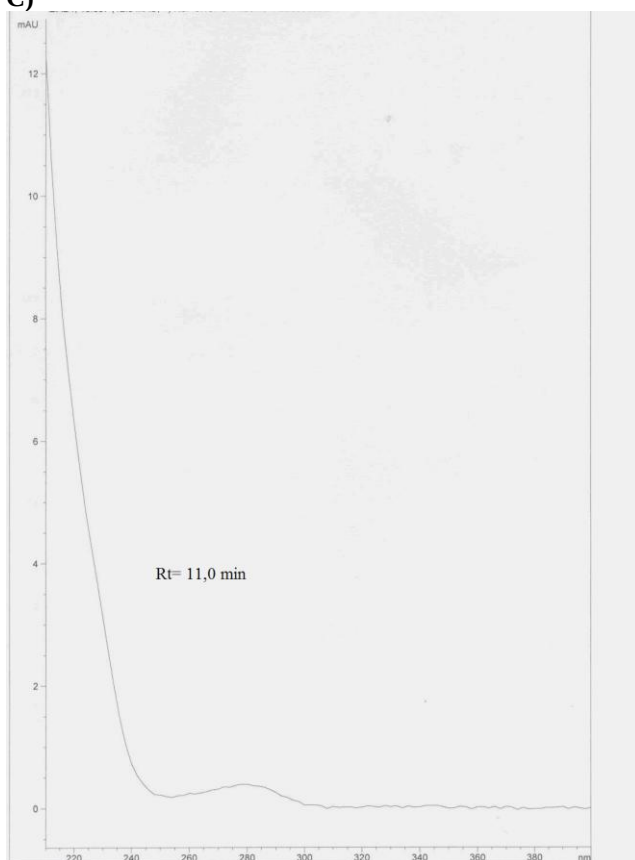
Slika 28: Kromatogram 1mg/ml raztopine jajčnega albumina v PBS



B)



C)



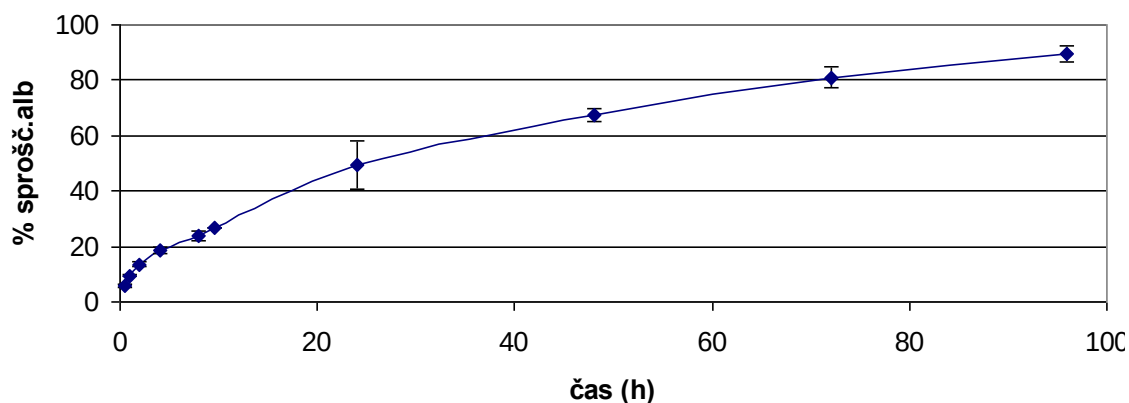
Slika 29: UV absorpcijski spektri kromatografskih vrhov s retencijskim časom 9.0 (A), 10.1 (B) in 11.0 min (C)

Razjasniti smo morali še vrh pri $R_t = 13$ min. Z analizo vzorcev praznih hidrogelov smo ugotovili, da ta vrh pripada HEC. Med samim sproščanjem se je namreč nekaj polimernih verig HEC razpletlo, le te so se raztopile, posledica tega pa je detekcija HEC na kromatogramu. Tudi za ta vrh smo posneli UV spekter, ki se je bistveno razlikoval od UV spektra albumina. S tem smo potrdili da kljub temu, da ima HEC veliko $-OH$ skupin, le te ne vežejo albumina tudi po daljšem času.

Ko smo razrešili identitete vseh kromatografskih vrhov, smo začeli z večdnevni preskusom sproščanja albumina iz hidrogelov. Vse hidrokele smo pripravili s teoretično koncentracijo albumina 1mg/ml. Že prej smo ugotovili, da lahko v hidrogelu določimo praktično ves vgrajen albumin. Zdaj smo vsebnost preverjali med vzorci tako, da smo po koncu preskusa preostali hidrogel raztopili v PBS in ga analizirali na preostanek albumina. Pri izračunu odstotka sproščenega albumina smo te računali glede na dejansko vsebnost.

Najprej smo izvedli dvodnevno sproščanje, da bi ugotovili ali do difuzije albumina iz hidrogela sploh pride oziroma, ali se le ta ne sprostí takoj. Iz tega preliminarnega preskusa smo ugotovili, da sproščanje albumina na začetku poteka nekoliko hitreje, po desetih urah pa sledi sproščanje približno s kinetiko ničtega reda, kar pomeni, da se albumin sprošča časovno enakomerno. V dveh dneh se sprostí približno 30% vgrajenega proteina. Zaradi teh ugodnih rezultatov smo sproščanje podaljšali, da bi ugotovili, kdaj in kako se sprostí še preostali albumin. Pri štiridnevnem sproščanju smo v vseh paralelkah potrdili dvofazno kinetiko sproščanja. Sproščanje najverjetneje poteka kot enostavna difuzija, kateri se kasneje priključi še površinska erozija hidrogela. Iz standardnih odklonov (slika 30) je razvidno, da je tudi ponovljivost sproščanja iz pripravljenih vzorcev zelo dobra.

Zaključimo lahko, da je 3% HEC hidrogel primeren kot dostavni sistem za nadzorovano sproščanje proteina. Ker je sproščanje neodvisno od časa, nam to potrjuje tudi, da nam je s postavljenim sistemom uspelo zagotoviti »sink« pogoje.



Slika 30: Profil sproščanja jajčnega albumina s iz 3% HEC hidrogela po 96-ih urah.

6.5.2. Vrednotenje hidrogelov po liofilizaciji

Hidrogeli zaradi velike vsebnosti vode predstavljajo ugoden medij za razvoj mikroorganizmov in imajo posledično zaradi tega omejen rok uporabnosti. Četudi smo hidrokele po izdelavi shranjevali v hladilniku, je po približno dveh tednih prišlo do vidne razrasti mikroorganizmov in gel ni bil več uporaben. V hidrogel smo sicer vgradili konzervans, vendar pa je bilo tega očitno premalo, da bi omogočil zadostno protimikrobno zaščito med shranjevanjem. Študije o mikrobiološki obstojnosti bi lahko preučevali v nadaljnjem delu.

Zavedamo se tudi tega, da bi vzorce morali predhodno sterilizirati in jih aseptično pripraviti, saj morajo biti izdelki, ki jih apliciramo na odprte rane, praviloma sterilni. Sterilnost pa bi izdelek, ki bi se dejansko uporabljal za vlažno celjenje ran, ohranjal le do prvega odprtja ovojnine.

Za povečanje mikrobiološke stabilnosti hidrogelov smo se odločili, da bomo vzorce posušili z liofilizacijo. Liofilizirani sistemi imajo namreč odstranjeno vodo in s tem osnovni pogoj za rast mikroorganizmov, posledično se njihov rok uporabnosti podaljša. Ideja celotnega procesa je, da bi se vzorci shranjevali kot suhi sistemi, pred aplikacijo bi izvedli rehidracijo ter nastali hidrogel nanesli na rano.

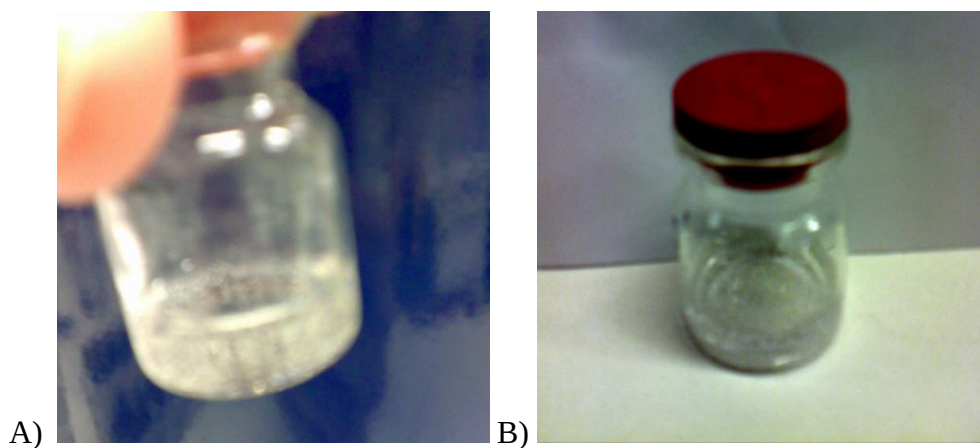
Naš cilj je bil ugotoviti, ali lahko kljub takšnemu posegu v dostavni sistem še vedno zagotovimo njegove prvotne lastnosti. Zanimalo nas je torej, ali liofilizacija vpliva na sproščanje in strukturo albumina ter ali na to dvojje vplivajo različni načini zamrzovanja.

Vzorci smo zamrznili v liofilizatorju, zmrzovalniku ter tekočem dušiku in izvedli liofilizacijo (Eksperimentalni del 5.3.6). V vseh primerih smo dobili bel material, ki je bil na otip nekoliko lepljiv (slika 31). Ker smo z liofilizacijo odtegnili vodo, v vzorcu ostane glicerol, ki daje snovi lepljiv otip.



Slika 31: Liofilizirani vzorci albumina vgrajenega v 3% HEC

Rehidracija je potekala spontano in enostavno, suhi vzorci so sprejeli vso dodano vodo v 24 urah, dobili smo hidrokele, ki so na pogled izgledali enako kot pred liofilizacijo (slika 32).





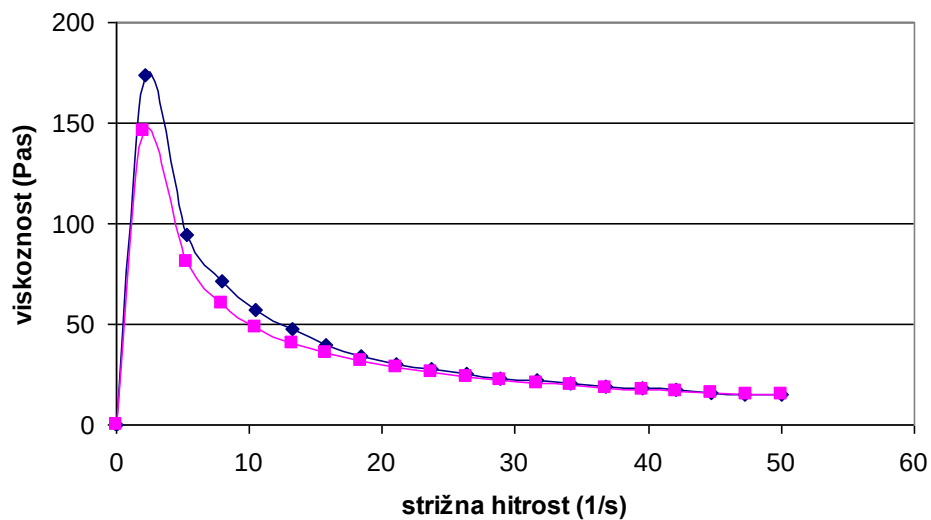
Slika 32: Liofilizirani vzorci po rehidraciji, ki smo jih zamrznili v A) zmrzovalniku B) liofilizatorju in C) tekočem dušiku

Na rehidriranih hidrogelih smo ponovili sproščanje ter izvedli merjenje viskoznosti z rotacijsko reometrijo. Rezultati viskoznosti so podani v preglednici III.

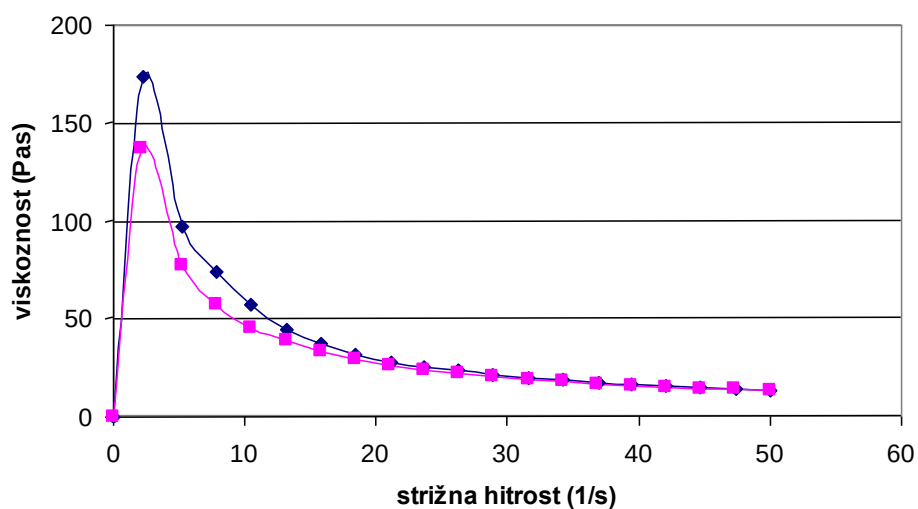
Iz oblike viskoznostnih reogramov (slike 33, 34, 35), ki se ohranja pri vseh temperaturah, lahko sklepamo, da so se po rehidraciji povrnila tiksotropna lastnosti hidrogela. Rezultate meritev viskoznosti smo skušali korelirati s hitrostjo in temperaturo zamrzovanja in posledičnim vplivom na strukturo. Hitrosti zamrzovanja namreč lahko vplivajo na velikost liofiliziranih delcev in njihovo polidisperznost (28). Hitreje ko vzorci zamrznejo, večja je možnost, da se bo ohranila struktura snovi, saj so tudi kristali vode, ki nastanejo, manjši. To se lahko odraža tudi na drugačni strukturi rehidriranega kserogela. Ugotovili smo, da se je ne glede na hitrost zamrzovanja viskoznost rehidriranih vzorcev nekoliko povečala, in da med vzorci ni signifikantnih razlik. Viskoznost rehidriranih vzorcev je nato s povišanjem temperature povečini padla, tako kot pri neliofiliziranem HEC hidrogelu. Ne glede na način zamrzovanja pa so vse viskoznosti še vedno v intervalu, ki smo ga postavili na začetku.

Preglednica III: Viskoznost 3% HEC pred liofilizacijo in rehidriranih liofiliziranih vzorcev glede na različne načine zamrzovanja

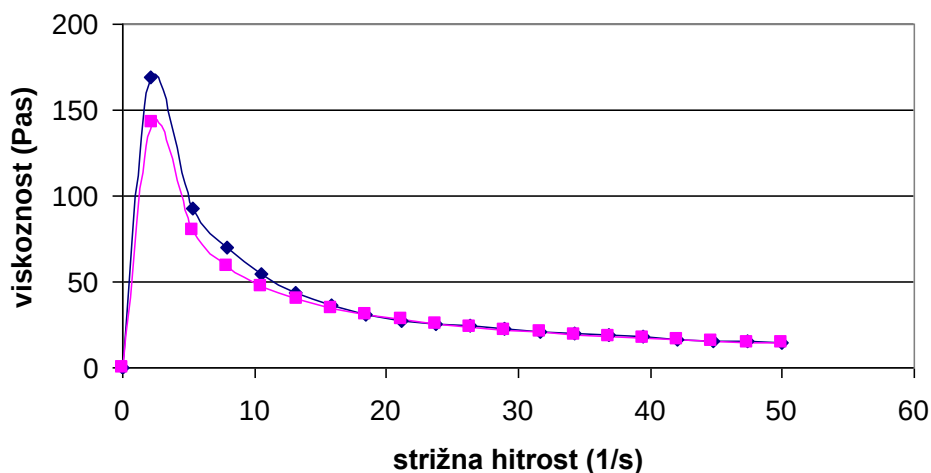
POLIMER	Viskoznost pri 25°C	Viskoznost pri 32°C	Viskoznost pri 37°C
HEC 3%	$145 \pm 3,46$ Pas	$143,7 \pm 7,55$ Pas	$129 \pm 7,51$ Pas
Liofilizacija zmrzovalnik	$180 \pm 13,4$ Pas	$173,7 \pm 4,51$ Pas	$174 \pm 8,37$ Pas
Liofilizacija liofilizator	$202,3 \pm 4,16$ Pas	$173,3 \pm 16,25$ Pas	$180 \pm 2,00$ Pas
Liofilizacija dušik	$195 \pm 16,29$ Pas	$168,7 \pm 9,45$ Pas	$149 \pm 7,07$ Pas



Slika 33: Viskoznostni reogram rehidriranega hidrogela, ki smo ga zamrznili v zmrzovalniku. Viskoznost vzorca smo merili pri 32°C, modra krivulja predstavlja naraščajočo strižno hitrost od 0-50, padajočo od 50-0 pa roza krivulja. Oblike krivulj so enake tudi pri 25 in 37°C.



Slika 34: Viskoznostni reogram rehidriranega hidrogela, ki smo ga zamrznili v liofilizatorju. Viskoznost vzorca smo merili pri 32°C, modra krivulja predstavlja naraščajočo strižno hitrost od 0-50, padajočo od 50-0 pa roza krivulja. Oblike krivulj so enake tudi pri 25 in 37°C.



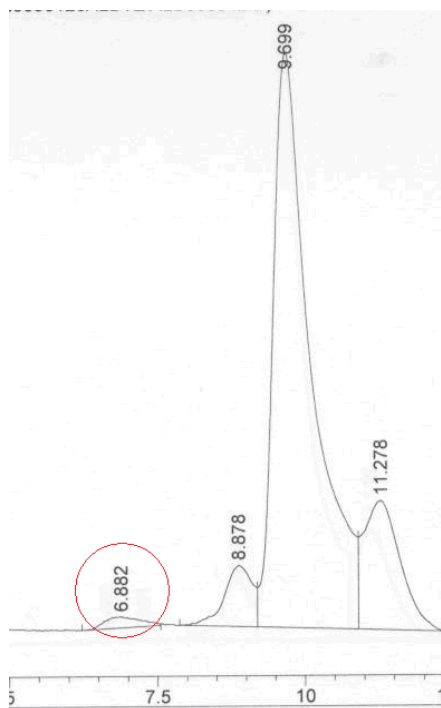
Slika 35: Viskoznostni reogram rehidriranega hidrogela, ki smo ga zamrznili v dušiku. Viskoznost vzorca smo merili pri 32°C, modra krivulja predstavlja naraščajočo strižno hitrost od 0-50, padajočo od 50-0 pa roza krivulja. Oblike krivulj so enake tudi pri 25 in 37°C.

Na rehidriranih hidrogelih smo ponovili sproščanje albumina ter po končanem štiridnevnem preskusu ostali hidrogel raztopili v pufru ter ga analizirali s HPLC-jem. Tudi tukaj nas je namreč zanimalo, ali je ves tisti albumin, ki smo ga vgradili, dejansko tudi na voljo za sproščanje. Kumulativna vsota odvzetih vzorcev in albumina, ki je zaostal v gelu, je bila v vseh primerih zamrzovanja 100- odstotna glede na teoretično vrednost vgrajenega albumina (1mg/ml). Iz tega lahko sklepamo, da je bil za sproščanje na voljo ves albumin ter da med procesom liofilizacije ni prišlo do novo nastalih močnih interakcij med proteinom in HEC polimerom, ki bi sproščanje preprečile.

Tipični kromatogram analiziranih vzorcev po sproščanju iz rehidriranih liofiliziranih vzorcev je imel enake vrhove kot kromatogrami pred liofilizacijo, iz česar sklepamo, da je struktura albumina ostala nepoškodovana. To lahko razložimo na sledeč način. Glicerol, ki ima v hidrogelu prvotno vlogo vlažilca, je hkrati tudi krioprotektant. Polioli namreč obdajo molekule proteinov, jih s tem zaščitijo ter omogočajo ohranitev njihove native strukture in, če gre za encim, lahko tudi aktivnosti.

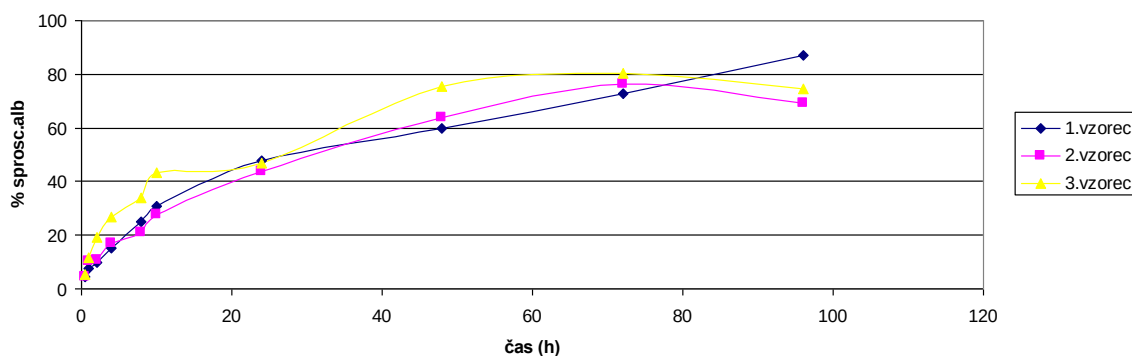
Če smo liofilizirane vzorce direktno raztopili v pufru, brez da bi prej izvedli rehidracijo, smo dobili na kromatogramu nov širok vrh z $R_t = 6,9$ min (slika 36), ki je imel enak UV spekter kot albumin. Ostali vrhovi so nespremenjeni. Trdimo lahko, da gre najverjetneje za aglomerat albumina. Celotna količina aglomeriranega albumina v tem primeru je približno 14 % glede na vgrajeno količino, o njegovi strukturi pa ne moremo ničesar povedati.

Pravzaprav več informacij o tem niti ne potrebujemo, saj se ta vrh v primerih sproščanja iz rehidriranih hidrogelov pojavlja le pri zadnjih treh odvzetih vzorcih, ko se hidrogel že dovolj razredči in HEC odplete. Celotna količina aglomeriranega albumina je približno 3% glede na celotno vgrajeno količino, delež pa je bil enak ne glede na način zamrzovanja. Manjši odstotek pri rehidriranih hidrogelih nakazuje na to, da se ti aglomerati med rehidracijo razgradijo nazaj na posamezne albuminske molekule. Menimo pa, da bi se večji delež aglomeriranega albumina lahko pojavil v primeru, če ne bi zagotovili dovolj časa za rehidracijo. Posledično pa bi to lahko pomenilo spremembo native strukture in s tem vpliv na aktivnost realnih proteinov- inhibitorjev cisteinskih proteaz.

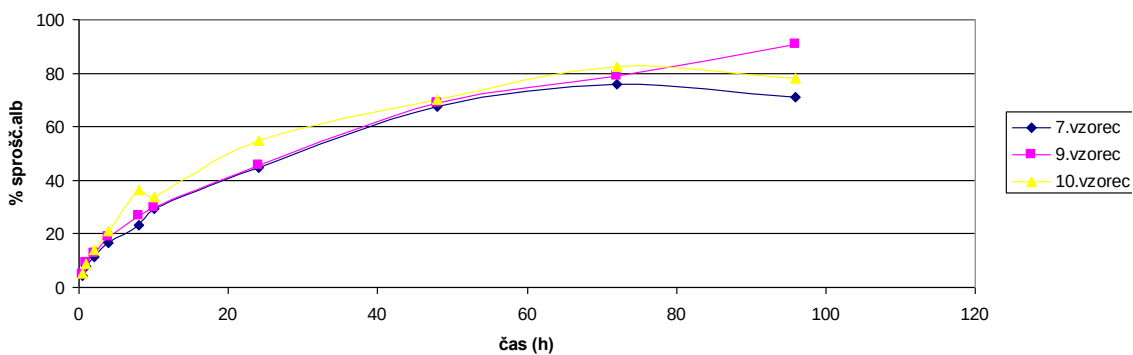


Slika 36 : Pojav dodatnega vrha pri 6,9 min, kar kaže na prisotnost aglomeratov albumina, ki se tvorijo po liofilizaciji hidrogelov.

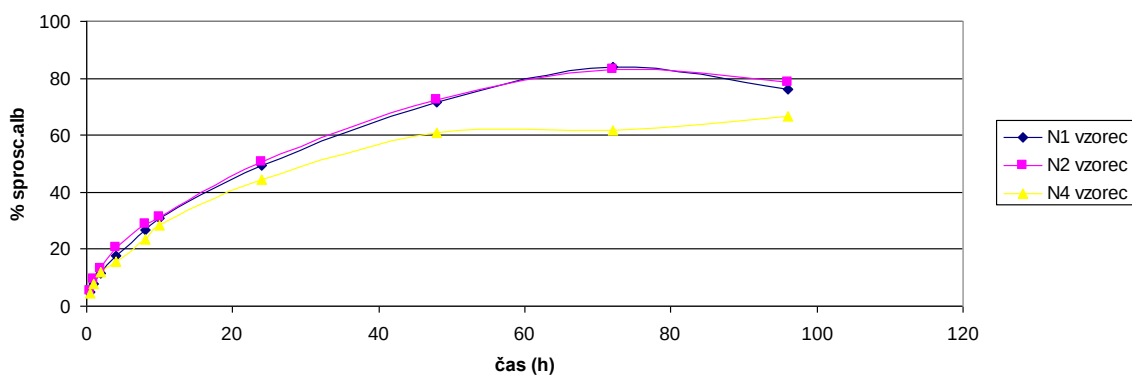
Profili sproščanja albumina iz rehidriranih hidrogelov so podani na spodnjih grafih.



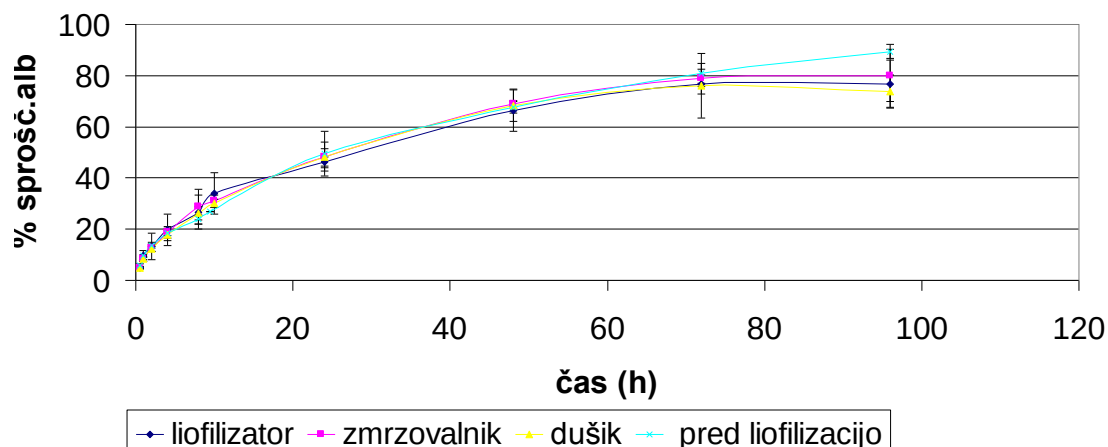
Slika 37: Profil sproščanja albumina iz vzorcev 3% HEC, ki so bili po liofilizaciji rehidrirani. Vzorce smo zamrznili na polici liofilizatorja.



Slika 38: Profil sproščanja albumina iz vzorcev 3% HEC, ki so bili po liofilizaciji rehidrirani. Vzorce smo zamrznili v zmrzovalniku pri -22°C.



Slika 39: Profil sproščanja albumina iz vzorcev 3% HEC, ki so bili po liofilizaciji rehidrirani. Vzorce smo zamrznili v tekočem dušiku.



Slika 40: Primerjava profilov sproščanja albumina iz 3% HEC hidrogela pred liofilizacijo in iz različno zamrznjenih vzorcev po rehidraciji liofilizata.

S slik 37-40 je razvidno, da so si profili sproščanja, ne glede na način zamrzovanja, med seboj podobni. Različni načini zamrzovanja torej na profile sproščanja ne vplivajo. Prav tako so ti profili podobni tudi profilu prvotnega sproščanja, s čimer je bil naš cilj dosežen. Povišanje viskoznosti hidrogelov po liofilizaciji in rehidraciji očitno ni bilo tako znatno, da bi dodatno upočasnil sproščanje. Končni odstotek sproščenega albumina je v povprečju za 10% nižji kot pri sproščanju pred liofilizacijo. Opazimo, da se začne po 72 urah sproščanja pri liofiliziranih vzorcih formirati plato, kaže da se albumin ne sprošča več. Možno je, da se tvori več agregatov, kot smo jih dejansko določili med sproščanjem, ter da je njihova masa tako velika, da se mora raztopiti celoten hidrogel preden bi ji določili s HPLC analizo. Hkrati pa nas primerjava vseh profilov sproščanja napelje na dejstvo, da je sproščanje do 72 ur povsem ponovljivo in primerljivo z vzorcem pred liofilizacijo, kasneje pa se kaže vpliv agregatov.

Prišli smo do ugotovitve, da lahko tudi po liofilizaciji in rehidraciji še zagotovimo dostavni sistem, ki bo nadzorovano sproščal nepoškodovano strukturo proteina, vsaj 72 ur. Seveda pa so potrebne še nadaljnje izboljšave, ki vključujejo: menjavo konzervansa, izdelavo hidrogela v aseptični komori, vgraditev cistatina in vrednotenje njegove aktivnosti po vgradnji v hidrogel in med sproščanjem ter nenazadnje, preskusi učinkovitosti *in vivo*.

7. SKLEP

V diplomski nalogi smo proučevali hidrogеле kot sodobne obloge za vlažno celjenje ran, v katere smo kot modelni protein vgradili jajčni albumin. Naše raziskovalno delo je potekalo vse od razvoja hidrogela do liofilizacije, preskuse sproščanja pa smo izvajali na modelu, ki smo ga delno povzeli po literaturi, delno pa ga razvili sami.

Hidrogela, ki imata viskoznost znotraj referenčnih vrednosti od 50 do 225 Pas, določenih na osnovi preskusov hidrogelov s tržišča, hkrati pa jih tvorita polimera z optimalnimi lastnostmi za sodobne obloge, sta 3% hidrogel iz hidroksietilceluloze (HEC) ter 6% hidrogel iz ksantana z višjo molekulsko maso. Zaradi lažje izdelave, boljše mikrobiološke stabilnosti, manjšega vpliva ionske moči, pH in temperature na strukturo, smo nadaljnje raziskovalno delo izvajali le na HEC hidrogelu, ki poleg polimera in vode vsebuje še glicerol in natrijev tetraborat kot konzervans.

Dokazali smo, da je jajčni albumin v HEC hidrogelu, stabilen, saj se ohrani njegova začetna koncentracija ter najverjetneje tudi nativna struktura.

Ročen proces izdelave 3% HEC hidrogela smo optimizirali do te meje, da je vanj vgrajen albumin, enakomerno homogeno porazdeljen po celotnem hidrogelu, ne da bi pri tem prišlo do lokalnega kopičenja in poškodovanja native strukture proteina.

Sproščanje albumina iz HEC hidrogela opisuje dvofazna kinetika z nekoliko hitrejšim sproščanjem do 10. ure, nato pa sledi počasno sproščanje po kinetiki ničtega reda. V 4 dneh se sprostí okoli 90-odstotkov vgrajenega proteina.

Liofilizacija omogoča pridobitev suhega vzorca. Rehidracija nazaj do hidrogela poteče spontano po dodatku tolikšne količine vode, kot je je bilo odstranjene med liofilizacijo, struktura hidrogela se povrne. Povrnejo se reološke lastnosti, liofilizacija pa ne vpliva niti na profil sproščanja ne glede na različne načine zamrzovanja vzorcev pred liofilizacijo.

Kljub temu, da smo delali in vitro z modelnim proteinom, trdimo, da so rezultati dober pokazatelj realnega obnašanja. S razvojem modela za sproščanje albumina smo ves čas poskušali čim bolj posnemati fiziološke pogoje. Za modelni protein, ki je bil vgrajen v hidrogel, je bil izbran jajčni albumin, ki je po molekulski masi podoben cistatinu, hkrati pa je tudi cenovno bistveno dostopnejši. Proteazni inhibitor cistatinu bi namreč s svojo prisotnostjo v oblogah dejansko lahko povrnil ravnovesje med premalo izraženimi rastnimi faktorji in prekomerno aktivnimi proteazami v kroničnih ranah. Naslednja stopnja raziskovalnega dela bi bila vgradnja cistatina in proučevanja sproščanja, vendar pa je poleg sproščanja potrebno dodatno preverit, ali cistatin ohrani svojo aktivnost.

Zaključimo lahko, da hidrogeli z vgrajenim proteinom, ki aktivno posega v celjenje rane, predstavljajo napredek pri zdravljenju kroničnih ran.

8. LITERATURA

1. Slovenski medicinski slovar, 2002
2. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery*, 2005; 23(2): 37-42
3. Anselme B, Perilleux E, Richard D. Biologija človeka: anatomija, fiziologija, zdravje. DZS, Ljubljana, 1999; 265-272
4. Smrko V. Biologija celjenja prekinjenega tkiva. *Sledi*, 1995: 36-49
5. Schmidt R. Topical delivery of α -Antichymotrypsin for wound healing, Doktorsko delo, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians- Universität München, München, 2005
6. Kiritsy CP, Lynch SE. Role of growth factors in cutaneous wound healing. *Critical reviews in oral biology and medicine*, 1993, 4(5): 729-760
7. Premzl A. Vpliv monoklonskih protiteles proti katepsinu B in proteaznih inhibitorjev na proliferacijo, invazijo in angiogenezo tumorskih celic in vitro, Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2001; 1-8
8. Cegnar M, Baumgartner S, Kristl J. Vlažna oskrba rane s sodobnimi oblogami. *Medicinski razgledi*, 2007; 46 (3): 235-247
9. Cegnar M. Načrtovanje in oblikovanje nanodelcev z vgrajenim proteinom, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2001; 27-29
10. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases, 1991; 285 (2): 213-219
11. Parač Z, Alikadič A, Smrke D. Uporaba sodobnih oblog pri oskrbi kirurške rane. 3.strokovni seminar Okužbe kirurških ran. Zbornik predavanj, Velenje 20.-21.11.2003, 91-98
12. Bouwstra JA, Junginger HE. Hydrogels. In: Swarbrick J, Boylan JC. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York: Marcel Dekker, 1993: 441-465.
13. Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov Today*, 2002; 7: 569-78.
14. Matthews KH, Stevens HNE, Auffret AD, Humphrey MJ, Eccleston GM. Lyophilised wafers as a drug delivery system for wound healing containing methylcellulose as a viscosity modifier. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005; 289 :51-62

15. Rayment E, Dargaville T, Shooter G, George G, Upton Z. Attenuation of protease activity in chronic wound fluid with bisphosphonate- functionalised hydrogels. *Biomaterials*, 2008; 29 (12): 1785-1795
16. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 4th Ed. American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press 2003; 330-334
17. Rozman B. Proučevanje interakcij ksantana in semenske sluzi rožičevca v vodnih sistemih, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2004; 12-16
18. Zupančič Valant A. Uvod v reologijo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2007, 7-29, 35-42, 81-89
19. Črnič A. Proučevanje sproščanja amoksicilna iz dvoplastnih plavajočih tablet na osnovi ksantana, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008; 16-18
20. Koželj R. Izdelava in vrednotenje tablet s podaljšanim sproščanjem na osnovi ksantana in hitosana, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008; 8-11
21. Kristl J, Kočevar J, Šmid-Korbar J, Mlekuž S, Gašperlin M. Ocenitev viskoelastičnih lastnosti hidrogelov želatine z oscilacijsko metodo. *Farmacevtski vestnik*, 1993; 44 (4): 171- 183
22. Vaje iz fizikalne farmacije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2006, 39-52
23. www.eur-lex.com
24. Aulton ME. *Pharmaceutics: The science of dosage form design*, 2nd Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002
25. Hiemstra C, Zhong Z, van Steenberg MJ, Hennink WE, Feijen J. Release of model proteins and basic fibroblast growth factors from in situ forming degradable dextran hydrogels. *Journal of controlled release*, 2007; 122: 71-78
26. Rupprecht H. Basic physico-chemical principles of freeze- drying –lyophilization. *Farmacevtski vestnik*, 1993; 44 (4): 193-213
27. Ahlin GP. Navodila za deli in čiščenje instrumenta Liofilizator BETA 1-8K, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko tehnologijo, šifra dokumenta: 1/2000, 8.7.2000

28. Bildstein L et al. Freeze-drying of squalenoylated nucleoside analogue nanoparticles. *Int. J. Pharm.*(2009), doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.04.002