

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IVANA MIHAČEVIĆ

**VPLIV SESTAVE HIDROGELA ZA VLAŽNO CELJENJE RAN NA
SPROŠČANJE MODELNEGA PROTEINA**

COMPOSITION OF HYDROGEL FOR MOIST WOUND HEALING
INFLUENCING THE RELEASE OF MODEL PROTEIN

Ljubljana, 2010

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

Iskrena hvala

mentorici izr. prof. dr. Saši Baumgartner, mag.farm., za dragocene nasvete, strokovno pomoč, trud in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge;

Tatjani Hrovatič in Mojci Keržan za pomoč pri delu v laboratoriju;

diplomski komisiji za temeljit pregled diplomske naloge;

Marku, družini in prijateljem za skrb, razumevanje in vsestransko podporo.

Izjava:

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

Ljubljana, junij 2010

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag.farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Bojan Doljak, mag.farm.

VSEBINA

POVZETEK	I
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1. UVOD	-1-
1.1 Zgradba kože	-1-
1.2 Fiziologija celjenja ran	-3-
1.2.1 Obdobje vnetja	-5-
1.2.2 Obdobje proliferacije	-7-
1.2.3 Obdobje maturacije	-8-
1.3 Biokemijski dejavniki v ranah	-9-
1.3.1 Rastni dejavniki	-9-
1.3.2 Proteolitični encimi	-10-
1.3.2.1 Cisteinske proteaze in cistatini	-12-
1.4 Kronične rane in dejavniki, ki vplivajo na celjenje	-14-
1.4.1 Zdravljenje kroničnih ran	-16-
1.4.2 Materiali v sodobnih oblogah za rane	-18-
1.4.3 Sodobne obloge za vlažno celjenje ran	-19-
1.5 Dostava proteinskih učinkovin iz hidrogelov	-22-
1.5.1 Narava proteinskih molekul	-22-
1.5.2 Lastnosti hidrogelov	-23-
1.5.2.1 Hidroksietilceluloza (HEC)	-24-
1.5.3 Hidrogeli- dostavni sistemi za proteinske učinkovine	-25-
2. NAMEN DELA	-27-
3. EKSPERIMENTALNO DELO	-28-
3.1 Materiali	-28-
3.2 Naprave	-28-
3.3 Metode	-29-
3.3.1 Izdelava hidrogelov	-29-
3.3.1.1 Priprava fosfatnega pufra PBS	-29-
3.3.1.2 Izdelava hidrogelov	-29-
3.3.2 Test sproščanja jajčnega albumina iz HEC hidrogelov	-30-
3.3.3 HPLC analitika	-32-
3.3.3.1 Umeritvena premica za albumin	-32-
3.3.4 Vrednotenje stabilnosti albumina	-33-
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	-34-
4.1 Izbira konzervansa in koncentracij HEC za izdelavo hidrogelov	-34-
4.2 Optimizacija priprave vzorcev za HPLC	-35-
4.2.1 Vpliv filtracije vzorcev na HPLC določanje albumina	-35-
4.2.2 Postopek filtracije vzorcev	-42-
4.2.3 Izgube albumina pri filtraciji	-46-
4.3 Vrednotenje stabilnosti albumina	-47-
4.3.1 Določitev enačbe umeritvene premice	-47-

4.3.2 Stabilnost albumina	-49-
4.4 Test sproščanja albumina iz HEC hidrogelov	-52-
5. ZAKLJUČEK	-64-
6. LITERATURA	-66-

POVZETEK

Hiter biotehnološki razvoj omogoča proizvodnjo različnih peptidnih in proteinskih učinkovin, ki zbujajo čedalje več pozornosti v terapiji različnih bolezni. Mednje prištevamo tudi cistatine-inhibitorje cisteinskih proteaz, ki veliko obetajo pri zdravljenju kroničnih ran. Povečana proteolitična aktivnost je namreč poglavitna značilnost kroničnih ran in eden glavnih vzrokov za motnje v celjenju. Pomemben dosežek na področju celjenja ran predstavlja koncept vlažne oskrbe: sodobne obloge vzdržujejo vlažno mikrookolje v rani, omogočajo potek različnih biokemijskih procesov in ugodno vplivajo na celjenje. Ena od možnosti za vlažno celjenje ran so hidrogeli: zaradi visoke vsebnosti vode zagotavljajo optimalno vlažnost v rani in tako pospešujejo celjenje, hkrati pa predstavljajo primeren dostavni sistem za proteine, saj omogočajo ohranjanje njihove native strukture in aktivnosti.

V diplomskem delu smo se ukvarjali s študijem vpliva sestave hidrogela na sproščanje modelnega proteina. Izdelali smo hidrokele iz hidroksietilceluloze in fosfatnega pufru PBS ter vanje vgradili jajčni albumin, ki je predstavljal modelni protein za cistatin. Pri sestavi hidrogelov smo spreminjali odstotke hidroksietilceluloze in jajčnega albumina. Testirali smo stabilnost albumina v fosfatnem pufru kot tudi vgrajenega v hidrogel. Sproščanje albumina smo spremljali 96 ur, kolikor znaša okvirni čas zadrževanja obloge na rani. Pri delu smo uporabili HPLC analitiko. Ravno s slednjo smo se zelo veliko ukvarjali, saj smo med analitiko ugotovili, da na merjenje rezultatov sproščanja vpliva več dejavnikov: predvsem filtriranje vzorcev, vrsta filtrata in čas analize. Natančno smo proučili vpliv filtracije vzorcev na samo HPLC analitiko albumina. Ugotovili smo, da moramo vsak 2.5- mililitrski vzorec pred analitiko filtrirati skozi svež 0.20 μ m filter, ki je predhodno omočen z 2 ml PBS. Prve tri četrtine vsakega filtrata smo zavrgli ter za HPLC analizo obdržali samo zadnjo četrtino, s čimer smo se najbolj približali koncentraciji albumina v nefiltriranih standardnih raztopinah. Po določitvi optimalnih pogojev smo vrednotili sproščanje albumina iz pripravljenih hidrogelov.

S HPLC analizo smo potrdili stabilnost albumina po vgradnji v hidrogel. Retencijski čas in kromatogram albumina se po vgradnji nista spremenila, iz česar sklepamo, da hidrogel omogoča ohranjanje native strukture proteinov. Seveda bi to morali potrditi z vgradnjo

cistatina in ugotavljanjem njegove aktivnosti. Ugotovili smo tudi, da ročni način izdelave hidrogela omogoča homogeno porazdelitev proteina v hidrogelu.

Eksperimentalni podatki preskusov sproščanja so se najbolj prilegali Higuchijevemu modelu, kar pomeni, da je proces sproščanja albumina iz pripravljenih hidrogelov v veliki meri nadzorovan z difuzijo. Hitrost sproščanja je bila premo sorazmerna s koncentracijo proteina in obratno sorazmerna s koncentracijo hidroksietilceluloze. Kljub razlikam v masah sproščenega albumina pri različnih koncentracijah vgrajenega albumina (0.5-, 1- in 2 mg/ml) in HEC (1.5-, 3- in 4.5 m/m %), se deleži sproščenega albumina v odstotkih niso dosti razlikovali.

SEZNAM OKRAJŠAV

ECM zunajcelični matriks (extracellular matrix)

HEC hidroksietilceluloza

HPLC tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid
Chromatography)

IL-1 interleukin-1

PBS fosfatni pufer s pH 7 (phosphate buffered saline)

PDGF rastni dejavnik trombocitov (platelet- derived growth factor)

TGF- β transformirajoči rastni dejavnik β (transforming growth factor β)

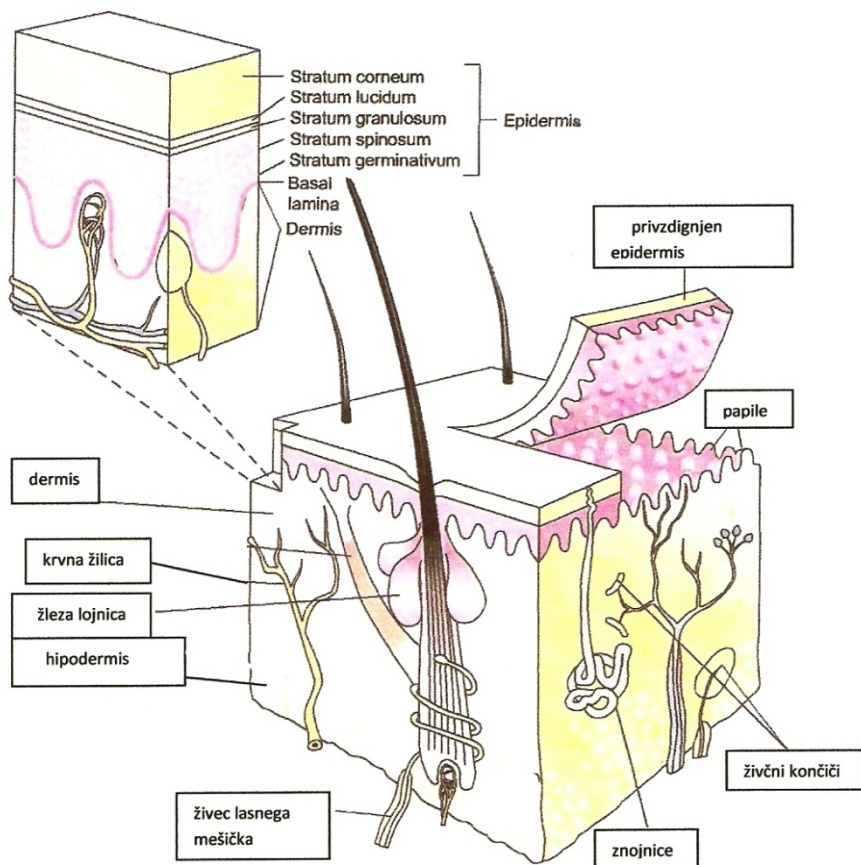
TNF- β dejavnik tumorske nekroze β (tumor necrosis factor β)

1. UVOD

Koža je največji organ v človeškem organizmu, ki opravlja vrsto pomembnih nalog: predstavlja prvo obrambno linijo pred vdorom tujkov v organizem; preko čutil omogoča sprejemanje informacij iz okolja; omogoča prenos impulzov; sodeluje pri termoregulaciji in homeostazi telesnih tekočin; tudi sinteza vitamina D se začne v koži. Lahko je tudi odraz stanja notranjih organov: spremembe na koži so namreč značilne za številne sistemske bolezni (1).

1.1 ZGRADBA KOŽE

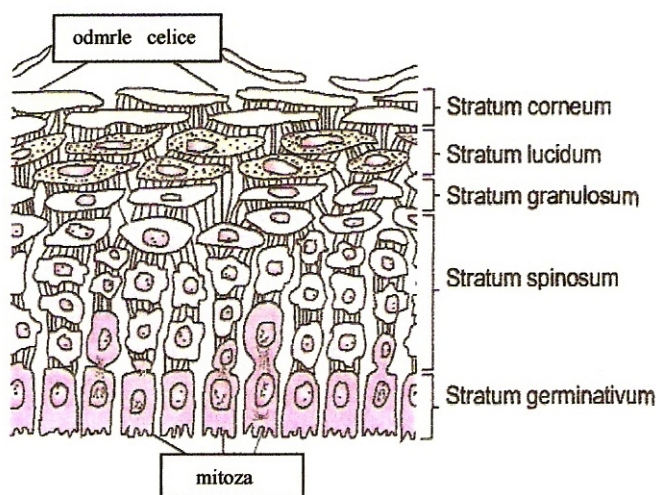
Koža je sestavljena iz treh osnovnih plasti, od katerih ima vsaka specifično vlogo (Slika 1):



Slika 1: Tridimenzijski prikaz strukture kože (1)

➤ epidermis (vrhnjica)

Epidermis je najbolj zunanja plast kože, v kateri ni veziva in žil. Sestavljen je iz večplastnega epitelijskega tkiva, v katerem večino celic predstavljajo keratinociti, ki proizvajajo fibrilarni protein keratin. Keratinociti se med procesom diferenciacije pretvarjajo iz proliferativnih nediferenciranih celic v visoko diferencirane celice, ki niso več sposobne delitve. Epidermis je glede na stopnjo razvoja keratinocitov razdeljen na več plasti (Slika 2).



Slika 2: Plasti epidermisa (1)

Keratinociti nastajajo v zarodni plasti (*Stratum germinativum*) in odmirajo v roženi plasti (*Stratum corneum*), kjer poteka zadnja stopnja diferenciacije - sprememba v korneocite. Rožena plast s svojo specifično zgradbo predstavlja bariero, zaradi katere je površina kože slabo prepustna za večino snovi. V epidermisu se nahajajo tudi nekatere druge celice: melanociti, ki vsebujejo zrnca pigmenta melanina; Mercklove celice, ki omogočajo senzorično zaznavanje informacij; ter Langerhansove celice, ki sodelujejo pri epidermalnem imunskem odzivu. Ravno tako so v epidermisu prisotna izvodila žlez znojnic in lojnic. Poglavitna naloga epidermisa je zaščita organizma pred dejavniki okolja (1, 2, 3, 4).

➤ dermis (usnjica)

Pod epidermisom leži debelejša plast dermis oziroma usnjica, ki je glavno ležišče krvožilnega obtoka v koži. Vrhnja plast dermisa sega v epidermis z bradavičastimi podaljški, imenovanimi papile, v katerih se razpletajo številne kapilare (Slika 1). V dermisu so pomembne celice fibroblasti, odgovorni za izgradnjo kolagenskih in elastičnih vlaken, ki zagotavljajo koži čvrsto oporo in hkrati prožnost. V tej plasti so številne žleze lojnice in znojnice, bolečinski in senzorični receptorji, živci, žile in lasni mešički. V dermisu so prisotne tudi imunske T celice, makrofagi in mastociti, ki skupaj z Langerhansovimi celicami epidermisa sodelujejo pri imunskem odzivu kože. Plast dermisa strukturno podpira epidermis in je poglavitni vir hranil (1, 2, 3, 4).

➤ hipodermis (podkožje)

Hipodermis, kjer potekajo debelejšje žile in živci, je v večini sestavljen iz maščevja, njegova količina in razporeditev pa sta odvisni od spola, starosti, prehrane, delovanja endokrinih žlez ipd. Podkožno maščevje varuje spodaj ležeče organe pred mehanskimi vplivi iz okolice. Ker je maščevje slab toplotni prevodnik, preprečuje čezmerno oddajanje telesne toplote (1, 2, 3, 4).

1.2 FIZIOLOGIJA CELJENJA RAN

Rana je odprta poškodba kože in globljega tkiva ali sluznic zaradi fizikalnih dejavnikov (5). Izguba celovitosti kože zaradi poškodbe ali bolezenskega stanja in posledičen izpad zaščitnih funkcij kože lahko predstavljajo resno grožnjo za organizem (1).

Tkiva telesnih struktur in organov lahko v grobem razdelimo na dve vrsti: parenhimska in stromalna tkiva. Parenhimska tkiva sestavljajo funkcionalne celice organov, kot so hepatociti, medtem ko so stromalna tkiva sestavljena iz opornega vezivnega tkiva, krvožilnega sistema in živčnih vlaken. Poškodovana tkiva se celijo bodisi z regeneracijo parenhimskih celic, kar pomeni nadomestitev celic v poškodovanem tkivu s parenhimskimi celicami enake vrste, ali z

obnovo vezivnega tkiva, pri kateri nastalo brazgotinsko tkivo nadomesti parenhimske celice okvarjenega tkiva. Glede na sposobnost regeneracije se delijo celice v tri skupine (1):

➤ labilne celice

Tovrstne celice, kot so epitelne celice kože in ustne votline, se v času življenja kontinuirano delijo in nadomeščajo poškodovane celice.

➤ stabilne celice

Po končani telesni rasti se nehajo deliti, vendar so ob stiku z določenim dražljajem sposobne delitve, ob pogoju, da je podporno stromalno tkivo celic funkcionalno.

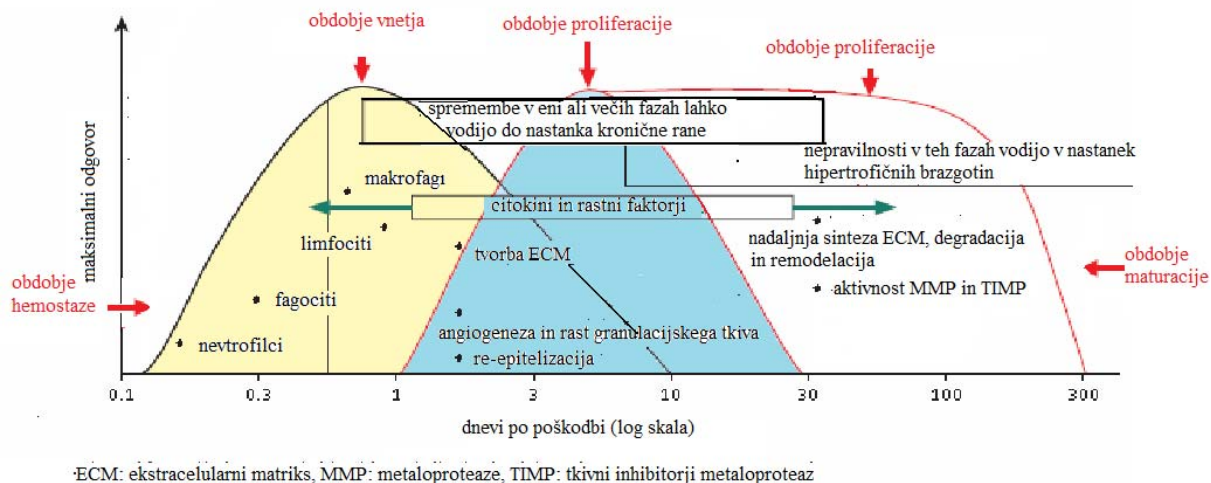
➤ permanentne celice

Permanentne celice, kot so živčne celice in celice srčne mišice, nimajo sposobnosti regeneracije, zato jih po poškodbi nadomesti fibrozno brazgotinsko tkivo brez funkcionalnih lastnosti.

Namen celjenja ran je ponovno vzpostavljanje celičnih struktur in tkivnih plasti ter zagotavljanje strukturne kontinuitete. Ko regeneracija celic ni možna, vlogo zagotavljanja strukturne kontinuitete prevzame nadomeščanje celic z vezivnim brazgotinskim tkivom. Brazgotinsko tkivo sicer zapolni vrzel po poškodbi, vendar ne more nadomestiti funkcionalnih parenhimskih celic. Glede na to, da ima večina tkiv bolj ali manj omejene regenerativne zmožnosti, je v procesu celjenja običajno v določenem obsegu udeležena tudi obnova vezivnega tkiva (1).

Celjenje rane je zapleten proces, ki vključuje medsebojno sodelovanje številnih rastnih dejavnikov, citokinov in ostalih signalnih molekul, različnih populacij celic in zunajceličnega ogrodja v koži. Odvija se v več fazah, v katerih si posamezne aktivnosti na celični in molekularni ravni sledijo v določenem časovnem zaporedju in se navezujejo druga na drugo (Slika 3). Procese celjenja, med katere prištevamo kemotakso (gibanje organizma ali posamezne celice glede na smer koncentracijskega gradienta kemotaktičnega agensa), fagocitozo (proces, pri katerem celica zajame in prebavi delce trdne snovi), sintezo in razgradnjo kolagena, preoblikovanje kolagena, angiogenezo (razvoj krvnih žil), epitelizacijo

ter proizvodnjo novih glikozaminoglikanov in proteoglikanov, lahko v splošnem razdelimo na tri obdobja: obdobje hemostaze in vnetja, obdobje proliferacije in obdobje zorenja oziroma maturacije (1).



Slika 3: Faze celjenja rane (6): ECM- ekstracelularni matriks; MMP- metaloproteaze; TIMP- tkivni inhibitorji metaloproteaz

1.2.1 Obdobje vnetja

V času poškodbe se prične vnetno obdobje, med katerim potekajo ključni procesi, odgovorni za pripravo rane in okolice na celjenje. Obdobje je sestavljeno iz hemostaze ter vnetnega odziva na žilni in celični ravni (1).

Poškodbe tkiva ponavadi prizadenejo krvožilje, kar privede do krvavitve. Posledično se aktivirajo hemostatični procesi, katerih namen je ustavljanje krvavitve in obnova integritete krvožilja. Pri poškodbi žilnega tkiva se sproži nevrogeni aksonski refleks in povzroči vazokonstrikcijo, kar zmanjša velikost rane in jakost krvavitve. Produkt agregacije trombocitov in koagulacije je s fibrinom bogat strdek, ki ustavi krvavitev. Nastali fibrinski čep predstavlja zasnovo za nastajajoče ogrodje med procesom celjenja.

Poškodovana tkiva preko aktivacije fosfolipaze A₂ katalizirajo razgradnjo arahidonske kisline ter nastanek vazoaktivnih eikozanoidov prostaglandinov in tromboksanov, ki vplivajo na tvorbo trombocitnega čepa, žilno prepustnost in celično kemotakso. Sproščajo se tudi vazoaktivni amini, ki povečajo lokalni pretok krvi in prepustnost kapilar, kar povzroči obilen prestop plazme v intersticij. Začetni vazokonstrikciji sledi torej vazodilatacija in pojav klasičnih znakov vnetja: rdečine, otekline, toplote in bolečine. Rdečina in bolečina nastopita na mestu poškodbe zaradi povečane žilne prepustnosti in vzdraženja perifernih nociceptorjev, otekline in toplota pa sta posledica iztekanja plazemskih proteinov in tekočine (1).

Za vnetno obdobje so značilni katabolni procesi, katerih naloga je čiščenje rane, razgradnja in odstranjevanje mikroorganizmov ter priprava rane na obdobje proliferacije. Osnovne vrste celic, ki sodelujejo pri vnetju, so trombociti, nevtrofilci in monociti oziroma makrofagi. Aktivirani trombociti sproščajo poleg adhezivnih proteinov, ki olajšajo njihovo agregacijo, tudi kemotaktične dejavnike za levkocite ter številne rastne dejavnike za tvorbo novega tkiva. Trombociti so glavni vir rastnega dejavnika trombocitov (PDGF) in transformirajočega rastnega dejavnika β (TGF- β). Oba rastna dejavnika stimulirata vstop nevtrofilcev in monocitov v rano, PDGF pa deluje tudi mitogeno na fibroblaste. Nevtrofilci prispejo prvi na mesto poškodbe, kjer fagocitirajo bakterije, tujke, mrtve celice in poškodovane sestavine ogroджа. Sproščajo lizosomske encime in reaktivne kisikove spojine ter preko signalnih molekul aktivirajo makrofage. Ko opravijo svojo nalogo, so podvrženi apoptozi in razgradnji. Nevtrofilcem sledijo monociti, ki jih iz krvnega obtoka kemotaktično privabijo rastni dejavniki iz trombocitov in drugih celic. Monociti se na mestu poškodbe adherirajo na zunajcelični matriks in dozoriijo v makrofage. Makrofagi so večje in manj specifične fagocitne celice, ki nadaljujejo s fagocitozo in obenem sproščajo različne rastne dejavnike, potrebne za epitelizacijo, angiogenezo in privabljanje fibroblastov (TGF, IL-1, TNF, PDGF). Makrofagi so za razliko od nevtrofilcev ključnega pomena pri celjenju ran. Fagociti za opravljanje svojih procesov potrebujejo proste kisikove radikale, zato je v fazi vnetja nujna zadostna oskrba tkiva s kisikom (1, 7).

V vnetnem obdobju je izloček iz rane najobilnejši. Sestavljen je iz elektrolitov, proteinov in proteolitičnih encimov. Vsebuje številne komponente, kot so citokini (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- β , interferon α), levkociti, fibrinogen in fibrin. Izloček ima pomembne transportne lastnosti: v

rano prinaša pomembne sestavine za celjenje, kot so hranila in kisik, ter iz nje odplavlja mrtvo tkivo, tujke in mikroorganizme. Obenem zagotavlja vlažno okolje in pospešuje celjenje (1, 7, 8).

Vnetje ima zelo pomembno vlogo pri preprečevanju okužbe, odstranjevanju nečistoč in omogočanju proliferativnega obdobja celjenja, vendar lahko povzroči še večje poškodbe, če traja predolgo (1, 7, 8).

1.2.2 Obdobje proliferacije

Proliferativno obdobje se začne 2 do 3 dni po poškodbi in lahko traja več tednov. Nastop obdobja označuje vstop fibroblastov v rano, še preden se vnetna faza zaključi v celoti. Poglavitni cilj prevladujočih anabolnih procesov v tem obdobju je izgradnja novega tkiva, ki bo nadomestilo manjkajoče tkivo na mestu poškodbe. Najpomembnejše so celice vezivnega tkiva, fibroblasti, ki sintetizirajo in izločajo kolagen ter druge medcelične elemente, potrebne za celjenje rane. Fibroblasti sintetizirajo tudi družino rastnih dejavnikov, ki spodbujajo angiogenezo ter proliferacijo (razmnoževanje in rast celic) in migracijo endotelnih celic.

Angiogeneza in proliferacija fibroblastov nastopita sočasno z migracijo endotelnih celic proti mestu poškodbe. Ker so za aktivnost fibroblastov in epitelnih celic nujno potrebni kisik in hranila, je angiogeneza ključnega pomena za potek ostalih procesov celjenja. Zarodne celice endotelija, ki izvirajo iz nepoškodovanih krvnih žil, si utrejo pot skozi zunajcelični matriks (ECM) do rane, kjer sodelujejo pri tvorbi novih žilic. Migracijo endotelnih celic spodbujajo fibronektin v fibrinskem strdku, angiogeni dejavniki iz makrofagov in trombocitov ter hipoksija okolja. Pri migraciji sodelujejo tudi kolagenaze in aktivator plazminogena, saj prebavljajo fibrinska vlakna in dele ECM ter tako olajšajo prehod celic. Ko je tkivo ponovno ustrezno prekrvljeno, se zviša tudi raven kisika, kar inhibira nadaljnje sproščanje angiogenih dejavnikov iz makrofagov in drugih celic (1, 7, 8).

Z angiogenezo hkrati poteka koncentriranje fibroblastov v rani. V približno enem tednu po poškodbi so fibroblasti ključne celice v rani. Medtem ko se na začetku večinoma delijo in

migrirajo z obrobja rane, so kasneje odgovorni za polaganje tkivnega matriksa. Makrofagi namreč poleg vnetnih dejavnikov izločajo tudi rastne dejavnike, kot so PDGF, TGF- β in bFGF (rastni dejavnik fibroblastov), ki spodbujajo aktivnost fibroblastov. Fibroblasti začnejo v tem času sintetizirati glikozaminoglikane, proteoglikane in kolagen, ki so osnovni material za tvorbo granulacijskega tkiva. Granulacijsko tkivo je začasno mehko tkivo, ki bo v nadaljevanju predstavljalo podlago za nastanek brazgotine. Je zelo občutljivo, saj vsebuje številne nove kapilarne poganjke. Rast granulacijskega tkiva je odvisna od hitrosti vraščanja novonastalih kapilar in proliferativnih sposobnosti fibroblastov. Ob približno istem času se začnejo bazalni keratinociti na obrobju rane regenerirati in pomikati proti središču poškodbe, pri tem pa tvorijo novo površinsko plast, podobno tisti pred poškodbo. Migracija keratinocitov traja toliko časa, dokler ni mesto poškodbe pokrito v celoti. Hitra vzpostavitev epidermalne površine in njene barierne lastnosti preprečijo čezmerno izgubo vode in skrajšajo čas izpostavljenosti mikroorganizmom. Pogoj za epitelizacijo je gladka in vlažna površina.

V tem času kontinuirano poteka nalaganje kolagena, ki zveča čvrstost tkiva. Makrofagi in fibroblasti predstavljajo vir citokinov, potrebnih za stimulacijo fibroplazije in angiogeneze (1, 7, 8).

1.2.3 Obdobje maturacije

Za to obdobje, ki se prične približno 3 tedne po poškodbi in lahko traja tudi dve leti, je značilno preoblikovanje novonastalega tkiva, odvisno od ravnovesja med sintezo in razgradnjo kolagena. Razgradnjo kolagena v rani kontrolirajo številne kolagenaze v makrofagih, epidermalnih celicah in fibroblastih. Encimsko aktivnost proteaz strogo nadzorujejo specifični tkivni inhibitorji, prisotni v zadnji fazi celjenja rane. Med citokini, ki igrajo pomembno vlogo pri nadzoru ekspresije kolagenaz in tkivnih inhibitorjev, so IL-1, TGF- β in PDGF.

V nadaljevanju se ustavi rast kapilar, pride do zmanjšanja metabolne aktivnosti in aktivnosti fibroblastov ter upada števila makrofagov. Prvotno sintetiziran kolagen III, ki prevladuje med proliferacijo, nadomesti močnejši kolagen I. Kolagenska vlakna se preoblikujejo tako, da nudijo največjo trdnost v smeri največje sile. Fibroblasti se spremenijo v miofibroblaste, ki

podobno kot celice gladkega mišičja vsebujejo kontraktilni protein aktin. Tkivo na mestu rane se skrči in nastane brazgotinsko tkivo.

Namen strukturnega preoblikovanja tkiva je povečanje natezne moči rane. Kljub temu ni novonastalo tkivo nikoli tako čvrsto kot nepoškodovano in se nikoli popolnoma ne obnovi (1, 7, 8).

1.3 BIOKEMIJSKI DEJAVNIKI V RANAH

1.3.1 Rastni dejavniki

Za proces celjenja ran je značilna vrsta kompleksnih celičnih in molekulskih dogodkov, ki so medsebojno odvisni. Rastni dejavniki igrajo ključno vlogo pri celjenju s spodbujanjem kemotakse in celične proliferacije, z omogočanjem signalizacije med celicami, z nadzorom tvorbe ECM, angiogeneze in kontrakcije ter s ponovnim vzpostavljanjem tkivne celovitosti. So molekule, ki se vežejo na površinske receptorje celic in lahko delujejo na različne načine: endokrino (po sprostitvi v krvni obtok delujejo na oddaljene celice), jukstakrino (difundirajo na kratke razdalje), parakrino (delujejo na sosednje celice) in avtokrino (delujejo na celice, iz katerih se izločajo). Mnogi med njimi lahko vplivajo na različne celične populacije, nekateri pa so specifični za določeno vrsto celic (9).

Najpomembnejši rastni dejavniki v procesih celjenja so rastni dejavnik trombocitov (PDGF), rastni dejavnik fibroblastov (b-FGF), epidermalni rastni dejavnik (EGF), transformirajoči rastni dejavnik (TGF- β), inzulinu podoben rastni dejavnik (IGF-1) in žilni endotelni rastni dejavnik (VEGF) (6) (Tabela I).

Tabela I: Pomembni rastni dejavniki pri celjenju ran (6)

Rastni dejavnik	Glavni vir	Naloga pri celjenju ran
VEGF	Trombociti, nevtrofilci	• Stimulira angiogenezo in granulacijo tkiva • Stimulira formacijo kolateralnih žil pri periferni vaskularni bolezni
FGFs (b-FGF)	Fibroblasti, endotelne celice, gladke mišične celice, makrofagi	• Proliferacija fibroblastov in epitelnih celic; odlaganje matriksa; kontrakcija rane; angiogeneza • Pospešuje tvorbo granulacijskega tkiva
EGF	Trombociti, makrofagi, keratinociti	• Diferenciacija, proliferacija, migracija in adhezija keratinocitov • Tvorba granulacijskega tkiva
PDGF	Trombociti, fibroblasti, makrofagi, endotelne celice	• Mitogeno delovanje na gladke mišične celice, endotelne celice in fibroblaste • Kemotaktično za nevtrofilce in fibroblaste • Proliferacija fibroblastov in metabolizem kolagena
TGF- β	Trombociti, makrofagi, fibroblasti, nevtrofilci, keratinociti	• Mitogeno delovanje na fibroblaste in gladke mišične celice • Kemotaktično za makrofage • Indirektno stimulira angiogenezo in metabolizem kolagena
IGF-1	Fibroblasti, plazma, jetra	• Proliferacija fibroblastov • Stimulira sintezo sulfatiranih proteoglikanov in kolagena

Legenda: VEGF- žilni endotelni rastni dejavnik (vascular endothelial growth factor); b-FGF- rastni dejavnik fibroblastov (basic fibroblast growth factor); EGF- epidermalni rastni dejavnik (epidermal growth factor); PDGF- rastni dejavnik trombocitov (platelet- derived growth factor); TGF- β - transformirajoči rastni dejavnik (transforming growth factor); IGF-1- inzulinu podoben rastni dejavnik (insulin-like growth factor).

1.3.2 Proteolitični encimi

Proteolitični encimi ali proteaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidnih vezi. Omogočajo znotrajcelično in zunajcelično razgradnjo proteinov; regulirajo aktivacijo proencimov in prohormonov; sodelujejo pri predstavitvi antigenov in imunskem odzivu, pri preoblikovanju kostnega tkiva, razgradnji in preoblikovanju zunajceličnega matriksa; sodelujejo pri migraciji monocitov, kaskadi strjevanja krvi ter pri procesu programirane celične smrti ali apoptoze. Proteaze, prisotne v vseh izločkih ran, so zelo pomembne pri celjenju akutnih in kroničnih ran.

V ranah jih večinoma izločajo granulociti, keratinociti in fibroblasti. Ker sodelujejo pri vzpostavljanju ravnovesja med izgradnjo in razgradnjo tkiva, je v fizioloških pogojih njihova aktivnost natančno nadzorovana, in sicer na ravni ekspresije, izločanja in aktivacije proteaz ter razgradnje aktivnih proteaz oziroma inhibicije njihovega delovanja s specifičnimi inhibitorji. Neustrezno delovanje nadzornega mehanizma lahko vodi v povečanje proteolitične aktivnosti, kar je poglobljena značilnost kroničnih ran in eden glavnih vzrokov za motnje v celjenju ran. Iz tega razloga je glavni cilj pri zdravljenju dobro obvladovanje proteolitične aktivnosti (9, 10).

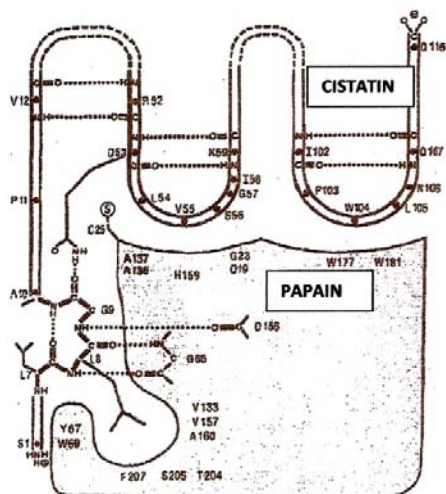
Čezmerno delovanje proteaz so dokazali pri številnih rakavih obolenjih, kardiovaskularnih in nevroloških boleznih, motnjah v strjevanju krvi, revmatoidnem artritisu in drugih vnetnih boleznih. V medicini predstavljajo potencialne tarče za terapijo zaradi regulatorne vloge ter udeležnosti pri patoloških procesih. V klinični rabi in različnih fazah testiranja so številni inhibitorji proteaz: inhibitorji proteaz virusa HIV; ACE inhibitorji in inhibitorji renina pri terapiji povišanega krvnega pritiska; inhibitorji serinskih proteaz- trombina, faktorja X- za zdravljenje tromboze; inhibitorji dipeptidil peptidaze IV (DPPIV) za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2; inhibitorji katepsina K za zdravljenje osteoporoze ter inhibitorji metaloproteaz za zdravljenje rozaceae, aken, periodontalnih bolezni in raka. Obenem predstavljajo proteaze velik potencial kot diagnostični in prognostični dejavniki pri številnih boleznih (9, 10).

Proteaze so selektivno delujoči encimi, saj cepijo polipeptidno verigo glede na specifično zaporedje aminokislin in pod določenimi pogoji okolja. Po mehanizmu delovanja jih uvrščamo v razred hidrolaz. Glede na mesto cepitve polipeptidne verige se delijo na endopeptidaze, ki cepijo peptidne vezi med neterminalnimi aminokislinami polipeptidne verige, in eksopeptidaze, ki cepijo terminalne peptidne vezi. Eksopeptidaze so razdeljene glede na mesto delovanja (C- oz. N-konec polipeptidne verige) ter velikost odcepljenih fragmentov. Endopeptidaze delimo glede na kemijsko naravo katalitske skupine v aktivnem mestu na cisteinske, aspartatne, serinske proteaze, metaloproteaze in proteaze z neznanim mehanizmom delovanja (9, 10).

1.3.2.1 Cisteinske proteaze in cistatini

Cisteinske proteaze so široko zastopane, saj so jih zasledili v virusih, glivah, rastlinah, živalih in celo nekaterih bakterijah. Največja med cisteinskimi družinami je papainska družina, ki jo sestavljajo papain (encim, prisoten v sadežu papaje) in njemu podobne proteaze. Cisteinske proteaze so sestavljene iz dveh domen, med katerima je reža z aktivnim mestom. Za proteolitično aktivnost encimov je zaslužna prisotnost aminokislin cisteina in histidina v aktivnem mestu. Najbolj znane človeške cisteinske proteaze so katepsini. V aktivirani obliki se najpogosteje nahajajo v lizosomih in so vključeni v številne fiziološke procese, kot so razgradnja proteinov v lizosomih, predstavitev antigenov pri imunskem odzivu, proteolitična aktivacija proencimov in prohormonov, reprodukcija in celična proliferacija, diferenciacija keratinocitov, resorpcija kosti in apoptoza (11). Vlogo cisteinskih proteaz so potrdili v številnih patoloških stanjih, in sicer pri več vrstah rakavih obolenj, pri mišični distrofiji, Alzheimerjevi bolezni in multipli sklerozi (12). Ravno tako so ugotovili korelacijo med povečano ekspresijo cisteinskih proteaz in vnetnimi bolezenskimi stanji, kot so vnetne miopatije, revmatoidni artritis in periodontitis. Aktivnost cisteinskih proteaz kontrolirajo njihovi endogeni inhibitorji, med katerimi so najbolj znani cistatini, tiropini in α 2-makroglobulin.

Cistatini so reverzibilni inhibitorji cisteinskih proteaz. Ne vežejo se direktno na aktivno mesto encima, ampak z vezavo v bližini aktivnega mesta sterično ovirajo interakcijo encima z njegovim substratom (Slika 4).



Slika 4: Primer inhibicije cisteinske proteaze papaina s piščančjim cistatinom (12)

Naddružino cistatinov lahko razdelimo v tri družine inhibitorjev: stefine, cistatine in kininogene (12).

Stefini so močni reverzibilni inhibitorji cisteinskih proteaz. So enoverižni proteini z molekulsko maso okrog 11 kDa, brez ogljikovih hidratov in disulfidnih vezi. So toplotno stabilni in ohranjajo nativno strukturo v nevtralnem in bazičnem okolju. Večinoma se nahajajo znotraj celic.

Cistatini so bolj kompleksni proteini z molekulsko maso okrog 13 kDa. V bližini karboksilnega konca imajo dve disulfidni vezi. Proteini so prisotni v relativno visokih koncentracijah v številnih telesnih tekočinah. Najbolj znan predstavnik cistatinov je piščančji cistatin, najbolj raziskan pa človeški cistatin C.

Kininogeni so visokomolekularni enoverižni proteini. Nahajajo se zunaj celic. Poleg inhibicije cisteinskih proteaz opravljajo številne funkcije: so prekursorji vazoaktivnih kininov in sodelujejo pri koagulaciji, imunskem odzivu akutne faze in vnetju.

Novejše študije so potrdile udeležnost cisteinske proteaze, katepsina S, v angiogenezi, ki je eden od pomembnih procesov celjenja ran. Izsledki študij kažejo, da je katepsin S ena izmed proteaz, ki sodelujejo pri razgradnji zunajceličnega matriksa in tako omogočajo penetracijo endotelnih celic iz nepoškodovanih krvnih žil do rane, kjer sodelujejo pri tvorbi novega krvožilja. Ravno tako so ugotovili, da je v primerjavi z zdravim tkivom, ekspresija katepsina S v poškodovanem kožnem tkivu povečana (13). Iz omenjenega sledi, da bi lahko z uporabo cistatinov omilili čezmerno aktivnost proteaz v kroničnih ranah in tako pospešili njihovo celjenje.

1.4 KRONIČNE RANE IN DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA CELJENJE

Akutne rane se celijo rutinsko v procesih vnetja, tvorbe tkiva in remodelacije, ki potekajo v običajnih časovnih okvirih. Daljša zamuda katerega koli od obnovljanih procesov lahko vodi v nastanek kronične rane. Pri kroničnih ranah je normalen proces celjenja moten na eni ali več stopnjah celjenja. Najpogosteje se celjenje ustavi v vnetni fazi, med katero makrofagi izločajo vnetne citokine, ki stimulirajo produkcijo proteaz ter zavirajo sintezo proteaznih inhibitorjev in rastnih dejavnikov. V kronični rani prevladujejo katabolni procesi zaradi porušenega ravnovesja med delovanjem rastnih dejavnikov in proteolitično aktivnostjo. Posledično pride do sprememb na molekulski in celični ravni, kar vpliva na mikrookolje rane, vključno s sestavinami izločkov in celičnimi komponentami na mestu poškodbe. Stanje dodatno poslabšajo oksidativne poškodbe z reaktivnimi kisikovimi spojinami, kopičenje nekroznega tkiva in kolonizacija bakterij. Omenjeno neravnovesje prizadene celične populacije in procese, katerih ustrezno delovanje je ključno za uspešno celjenje. Med drugim epitelne celice ne morejo migrirati z obrobja rane in posledica je nezmožnost epitelizacije rane, ki je najbolj opazen klinični znak kroničnih ran. Najpogostejše kronične rane so venske razjede, preležanine in diabetično stopalo. Njihove skupne značilnosti so ponavljajoče se poškodbe, ishemija in dolgotrajno vnetje (1, 9).

Kronične rane so pogosto povezane s predhodnim patološkim stanjem, ki prispeva k okvari celjenja. Veliko lokalnih in sistemskih dejavnikov lahko vpliva na normalen potek celjenja

ran. Sem prištevamo podhranjenost, oviran krvni pretok in nezadostno oksigenacijo tkiva, neustrezno delovanje vnetnih in imunskih odzivov, starost, anatomsko lego in velikost rane ter prisotnost infekcij in tujkov v rani (8).

Uspešno celjenje ran je deloma odvisno od telesnih zalog proteinov, ogljikovih hidratov, maščob, vitaminov in mineralov. Znano je, da lahko podhranjenost upočasni proces celjenja. Pomanjkanje proteinov podaljša vnetno fazo in vpliva na proliferacijo fibroblastov, sintezo kolagena, angiogenezo in remodelacijo rane. Ogljikovi hidrati kot vir energije preprečujejo izčrpavanje proteinskih zalog. Maščobe so med drugim esencialni gradniki celičnih membran, potrebne so za sintezo novih celic in delujejo kot prekursorji za sintezo vnetnih mediatorjev eikozanoidov. Vitamini so pomembni kofaktorji pri najrazličnejših procesih v organizmu, nekateri med njimi pa so tudi neposredno vključeni v proces celjenja: vitamin C je nujen za sintezo kolagena, vitamin A pa spodbuja epitelizacijo, tvorbo kapilar in sintezo kolagena (1).

Zadostna prekrvljenost tkiva je bistvenega pomena pri celjenju, saj omogoča pritok kisika in hranil v tkivo ter odstranjevanje odpadnih produktov, lokalnih toksinov in bakterij. Kisik je nujno potreben pri sintezi kolagena: znano je, da lahko že začasen primanjkljaj kisika povzroči sintezo manj stabilnega kolagena. Ravno tako ga potrebujejo nevtrofilci in makrofagi za razgradnjo bakterij. Zmanjšan krvni pretok je lahko posledica stanja v rani, na primer otekline, ali pa predhodno prisotne bolezni.

Vnetni in imunski odzivi igrajo pomembno vlogo pri celjenju, saj je vnetje začetna faza obnavljalnih procesov, medtem ko je ustrezen imunski odziv pomemben pri preprečevanju infekcij, ki upočasnijo celjenje. Med dejavniki, ki lahko vplivajo na vnetje in imunski odziv, so različna bolezenska stanja, kot je sladkorna bolezen, ter uporaba določenih zdravil s protivnetnim in imunosupresivnim delovanjem (kortikosteroidi) (1, 9).

Celjenje kroničnih ran lahko med drugim izboljšamo s ponovnim vzpostavljanjem ravnovesja med rastnimi dejavniki in proteazami, in sicer z dodatkom bodisi rastnih dejavnikov ali inhibitorjev proteaz.

1.4.1 Zdravljenje kroničnih ran

Kronične rane predstavljajo breme za bolnike, zdravstveno osebje in zdravstveni sistem držav, saj bistveno poslabšajo kakovost življenja bolnikov, zdravljenje pa je ponavadi dolgotrajno in povezano z visokimi finančnimi stroški.

Oskrba kronične rane lahko obsega več metod: odstranjevanje nekroznega tkiva, uporabo oblog za vlažno celjenje, metodo stalnega podtlaka (vacuum sealing), lasersko terapijo ter dodatek rastnih dejavnikov in/ali inhibitorjev proteaz, kot je cistatin. Pogoj za začetek celjenja je čista rana z ustrezno oskrbljenim ležiščem, zadostno vlažnostjo in preskrbo s krvjo. Takšna rana omogoča tudi naslednje faze celjenja, proliferacijo, epitelizacijo in maturacijo (7, 9).

➤ **Klasična oskrba rane**

V preteklosti je prevladovalo mnenje, da je tvorba kraste na vsaki rani koristna, saj predstavlja zaščito pred zunanjimi vplivi, združuje robove rane, preprečuje izgubo proteinov in tekočine ter omogoča hitrejše celjenje. Klasična oskrba ran temelji na prekrivanju rane z gazo, ki je suha ali prepojena s fiziološko raztopino in včasih tudi z antiseptiki. Čeprav je klasična oskrba ran še vedno v uporabi, ima številne pomanjkljivosti, ki dostikrat upočasnijo celjenje ran. Gaza se namreč posuši in prilepi na rano, nastajajoče granulacijsko tkivo pa se začne vraščati v nitke gaze. Posledično je prevezovanje rane boleče in ponovno poškoduje tkivo, v rani pa ostajajo nitke in drobcji prevezovalnega materiala, ki povzročajo vnetje. Zaradi prepustnosti gaze za pline, tekočine in bakterije je velika verjetnost nadaljnje okužbe. Pretirana uporaba lokalnih anestetikov prav tako ovira proces celjenja, saj le-ti delujejo citotoksično na celice, ki se delijo, med drugim tudi na fibroblaste (7).

➤ **Sodobna oskrba rane**

Poškodovana tkiva ne smejo biti ne suha ne mokra, temveč morajo biti primerno vlažna. Izsušitev rane onemogoča delovanje rastnih dejavnikov in encimov, upočasnjuje celjenje in poveča verjetnost infekcije. Nasprotno pretirana vlažnost povzroči maceracijo oziroma razmehčanje tkiva. Ravno tako je etiologija nekaterih kroničnih ran, kot so venske razjede, povezana s preveliko količino izločka (9).

Pomemben dosežek na področju celjenja ran predstavlja koncept vlažne oskrbe, ki temelji na izsledkih študij v letih 1962 in 1963. Takrat so prvič dokazali hitrejšo celjenje ran v vlažnem okolju in boljšo ohranitev kožnega tkiva (7). Vzdrževanje vlažnega mikrookolja rane je postalo temelj sodobnih pristopov k celjenju ran. Prednosti, ki jih prinaša vlažno okolje, so številne. Vlaga ustrezno hidratira tkivo in je potrebna za preskrbo tkiva s kisikom in hranili. Pomembni dejavniki celjenja, kot so encimi, rastni dejavniki in različne populacije celic, potrebujejo vlažen medij za delovanje. Vlažno okolje olajša avtolitične procese čiščenja in razkrajanja nekroz ter s tem omogoči ustrezno oskrbo ležišča rane in nadaljnje faze celjenja. Tudi draženje prostih živčnih končičev je v vlažnem okolju zmanjšano, kar omili občutek bolečine. Nasprotno izsušitev rane upočasni procese celjenja, poglobi rano in poveča verjetnost infekcije (7). Tvorba kraste na nenevarnih ranah, kot so manjše odrgnine, kljub temu ni škodljiva, saj se takšne ranice v večini primerov hitro zacelijo.

Celjenje ran z oblogami je od poznega 20.stoletja precej napredovalo: od uporabe naravnih materialov, ki so le prekrivali rano, do materialov, ki vzdržujejo optimalno vlažnost tkiva. Še naprednejšo stopnjo predstavljajo obloge, ki omogočajo interakcijo z biokemijskim okoljem rane in tako aktivno sodelujejo pri procesih celjenja. Biokemijski dejavniki, ki so neposredno ali posredno povezani s slabim celjenjem kroničnih ran, so lokalne ravni proteolitičnih encimov, citokinov in rastnih dejavnikov, dolgotrajnejša tkivna hipoksija, prosti radikali in infekcije. Z aktivno delujočimi oblogami je možno nadzorovati prisotnost in koncentracijo proteolitičnih encimov, prostih radikalov, rastnih dejavnikov in drugih signalnih molekul, ter vplivati na samo stanje v rani, kot je hipoksija ali bakterijska okužba (14).

1.4.2 Materiali v sodobnih oblogah za rane

Materiali za izdelavo sodobnih oblog so najpogostejše polimeri, ki so lahko naravnega izvora (celuloza, bombaž, viskoza, alginat, pektin, hitosan, kolagen...) ali sinteznega oziroma polysinteznega izvora (poliamidi, poliestri, poliuretani, polipropileni, celulozni acetati, polivinilkloridi, akrilati, silikoni...). Glede na kemijske in fizikalne lastnosti so sposobni različno vezati vodo oziroma izloček iz rane. Njihovo delovanje na rani je odvisno od stopnje hidratacije polimera med izdelavo obloge. Sposobnost vezanja vode imajo hidrofilni polimeri, pri čemer nabrekajo in tvorijo gel. Stopnja nabrekanja hidrogela v vodi je odvisna od termodinamske kompatibilnosti polimera in vode ter elastične sile polimernih verig, ki nabrekanju nasprotujejo. Končna količina vode v hidrogelu je tako odvisna od hidrofilnosti polimera in stopnje premreženja. Bolj ko polimer nabrekne, večja je njegova vpojnost v oblogah za rane (7).

Lastnosti optimalnega polimera za izdelavo oblog so zasnovane na izsledkih raziskav s področja novih materialov. Optimalen polimer naj bi tako imel (15):

- hidrofilen značaj in 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 mrtvo tkivo.
- hidroksilne (-OH), karboksilne (-COOH) in druge funkcionalne skupine, dovzetne za radikalske reakcije:

V vnetnih reakcijah nastaja veliko prostih radikalov in reaktivnih kisikovih spojin. Omenjene funkcionalne skupine so sposobne loviti radikale in s tem zmanjšati njihov škodljiv učinek, omogočajo pa tudi kompleksiranje kovinskih ionov, ki katalizirajo oksidativne reakcije in poškodbe celičnih komponent.

- sposobnost tvorbe vodikovih vezi in elektrostatskih interakcij z encimi:

Materiali, sposobni tovrstnih interakcij, delujejo inhibitorno na določene proteolitične encime (metaloproteaze). Sam mehanizem inhibicije še ni pojasnjen, vendar domnevajo, da so interakcije vzrok za spremembo native konformacije aktivnega mesta encimov. Funkcionalne skupine, ki naj bi vstopale v interakcije z encimi, so

hidroksilna (-OH), karboksilna (-COOH), karbonilna (-CO) ter formilna (-CHO) skupina. Pri inaktivaciji le- teh z zaščitnimi skupinami so namreč ugotovili oslabljen inhibitorni učinek na encime.

- prisotne fibrilarne molekule:

Fibrilarne molekule omogočajo pravilno nalaganje in orientacijo novonastalih kolagenskih vlaken ter dajejo oporo tudi drugim celičnim elementom, kar omogoča hitrejše celjenje.

- sposobnost sterilizacije:

Da bi se izognili dodatnim infekcijam, mora biti obloga ob aplikaciji na odprto rano sterilna. Zaradi učinkovitosti in varnosti je metoda izbire sterilizacija z vodno paro. Tako imajo pri izbiri sestavin prednost tisti materiali, pri katerih po končanem avtoklaviranju ne pride do signifikantnih sprememb v lastnostih.

- po geliranju ustrezno viskoznost gela:

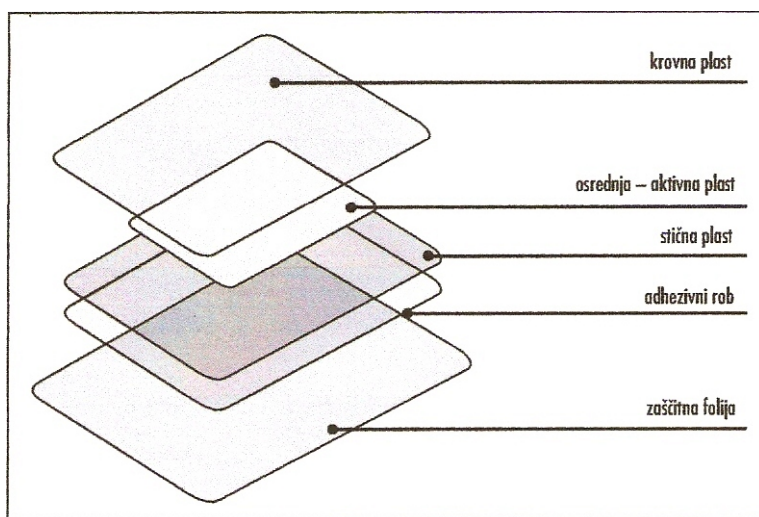
Ustrezna viskoznost je pomembna tako iz tehnološkega kot tudi terapevtskega stališča.

Sodobni materiali so sicer dražji od klasičnih, vendar so celokupni stroški zdravljenja znižani, saj sta previjanje ran in možnost okužb zmanjšana na minimum.

1.4.3 Sodobne obloge za vlažno celjenje ran

Sodobne obloge predstavljajo nadomestek manjkajočega tkiva, ustrezno pripravijo ležišče rane, vpijajo izločke in toksine, ščitijo pred sekundarno infekcijo, previjanje ran pa je manj pogosto in manj boleče, kar zviša kakovost življenja bolnikov. Poleg naštetega omogočajo sodobne obloge hidratiranje in dihanje rane, so gladkih površin, biokompatibilne in estetsko bolj privlačne. Izbira obloge za vlažno celjenje ran je odvisna od značilnosti rane: velikosti, količine izločka, prisotnosti infekcije in lastnosti okoliške kože. Posebej je pomembna ustrezna količina izločka: pomanjkanje izločka, kot že omenjeno, zavira aktivnost rastnih dejavnikov in proteolitičnih encimov, medtem ko lahko presežek izločka povzroči neželjeno maceracijo tkiva (7, 9).

Obloge so lahko enoplastne ali sestavljene iz več plasti, od katerih vsaka opravlja določeno funkcijo (7) (Slika 5).



Slika 5: Sestava večplastne obloge za rane (7)

Zaščitna folija varuje oblogo in zagotavlja njeno sterilnost do aplikacije. Adhezivni rob omogoča, da se obloga prilepi na kožo in obdrži na mestu. Stična plast je v neposrednem stiku z rano in ščiti njeno ležišče, vendar se z njo ne zlepi. Osrednjo plast sestavljajo polimeri, ki so aktivno vključeni v proces celjenja rane. Krovna plast prekriva in ščiti novonastali epitelij, njene bistvene lastnosti pa so prepustnost za pline in vlago ter neprepustnost za vodo in mikroorganizme.

Glede na sposobnost zdrževanja vlažnosti na rani se delijo obloge v tri skupine: obloge, ki vpijajo izloček; obloge, ki ohranjajo vlažnost; in obloge, ki hidratirajo rano.

➤ Obloge, ki vpijajo izloček iz rane

Tovrstne obloge so primerne za rane z zmernim do močnim izločanjem, saj imajo veliko kapaciteto vezave in zadrževanja vode. Med tovrstnimi oblogami so najpogostejše alginatne obloge in poliuretanske pene. Alginatne obloge so soli alginske kisline z eno- ali dvovalentnimi kovinskimi ioni, pri katerih je sposobnost vezave vode odvisna od razmerja med alginsko kislino in ioni. Obloge so največkrat sestavljene iz mešanice natrijevih in kalcijevih soli, ob stiku z izločkom pa nabreknejo in tvorijo gel. Prednost alginatov je njihova biokompatibilnost in biorazgradljivost ter dokazana hemostatska aktivnost, ki pospeši celjenje. Poliuretanske pene so izdelane iz hidrofobnih poliuretanskih materialov. Med izdelavo pen se sprošča ogljikov dioksid, ki ustvari pore različnih velikosti. Zaradi svoje poroznosti imajo pene veliko sposobnost vezave vode.

➤ Obloge, ki vzdržujejo vlažnost rane

V obdobju nastajanja granulacijskega tkiva je izločka znatno manj kot v vnetnem obdobju. Absorptivna sposobnost obloge je zato manj pomembna, saj lahko pripelje do izsušitve rane in predhodno omenjenih negativnih posledic za celjenje. V teh primerih je primernejša uporaba oblog, ki vzdržujejo vlažnost in so dostopne v obliki hidrokolidov, hidrovlačen in filmov. Hidrokoloide sestavljajo hidrofilni polimeri, kot so želatina, kolagen, pektini, ksantani, derivati celuloze in drugi. Polimeri so v oblogi prisotni v povsem nehidratiranem oziroma delno hidratiranem stanju, ob stiku z rano pa hidratirajo in tvorijo gel. Hidrovlačna so tudi sestavljena iz hidrofilnih polimerov, ki so oblikovani v mrežasto prepleteno oblogo. Tvorijo mehak in prilagodljiv gel ter omogočajo enostavno in neboleče odstranjevanje. Za razliko od hidrokolidov in hidrovlačen filmi nimajo vpojne sposobnosti. Zaradi tega jih ne uporabljamo pri ranah z izločanjem, ampak so namenjeni oskrbi površinskih ran, ki že epitelizirajo. Izdelani so iz poliuretana v obliki tankih neporoznih membran.

➤ Obloge, ki hidratirajo rano

V primeru zasušениh ran, ki vsebujejo odmrlo tkivo in fibrinske obloge, je potrebno dodatno vlaženje rane. Hidratacija namreč izboljša mehanske lastnosti tkiva in spodbudi čiščenje rane ter odstranjevanje nekroz. Hidrogeli so glavna skupina oblog za hidratiranje. Sestavljajo jih hidrofilni polimeri in vsebujejo visok delež vode. Lahko so v obliki oblog, nanosenih na membranski nosilec, ali past, ki po nanosu zahtevajo še sekundarno oblogo za zaščito pred zunanjimi dejavniki (7).

1.5 DOSTAVA PROTEINSKIH UČINKOVIN IZ HIDROGELOV

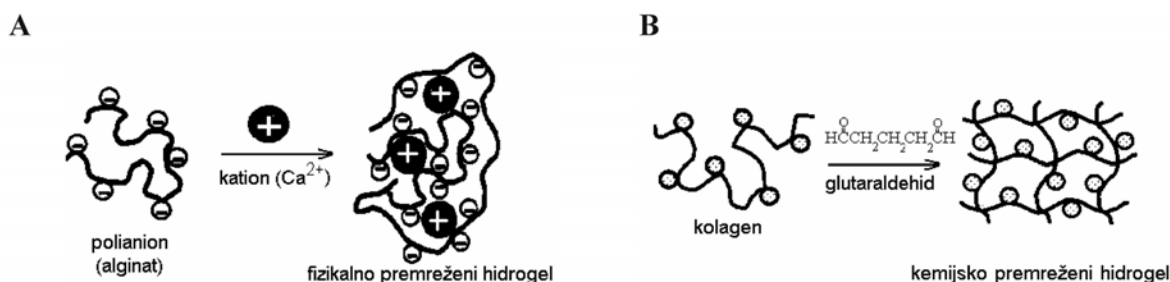
1.5.1 Narava proteinskih molekul

Proteini in druge biomakromolekule so kot zdravilne učinkovine deležni čedalje več pozornosti. Hiter biotehnološki razvoj omogoča proizvodnjo različnih peptidnih in proteinskih učinkovin za terapevtske namene. Med drugim lahko z njimi aktivno posegamo v procese celjenja ran z dostavo inhibitorjev proteaz, kot je cistatin. Omenjene molekule so s stališča formulacije izjemno kompleksne in predstavljajo izziv pri razvoju dostavnih sistemov (16). Proteini so namreč občutljive molekule, katerih terapevtsko delovanje je odvisno od ustreznega zvitja aminokislinske verige ter stabilizacije le- te s šibkimi fizikalnimi interakcijami in disulfidnimi vezmi. Občutljivi so na visoke in nizke temperature, ekstremne pH vrednosti, prisotnost organskih topil, mehanske sile, odtegnitev vode in podobno. Pri neustreznih pogojih pride do denaturacije proteina oziroma porušanja terciarne strukture, kar večinoma povzroči tudi izgubo aktivnosti proteina. Strukturna sprememba proteina prav tako poveča verjetnost stranskih učinkov, kot je imunogenost. Učinkovitost dostavnega sistema za proteine je tako odvisna predvsem od sposobnosti ohranjanja nativne strukture in aktivnosti proteinov, ne samo med pripravo in aplikacijo na mesto delovanja, temveč tudi med transportom in shranjevanjem (16).

1.5.2 Lastnosti hidrogelov

Veliko pozornosti se posveča premagovanju ovir, ki so posledica nestabilnosti proteinskih molekul. Eden izmed možnih pristopov pri ohranitvi njihove aktivnosti med dostavo je uporaba polimernih matrikov za doseganje lokalnega ali sistemskega nadzorovanega sproščanja skozi daljše časovno obdobje. Med tovrstnimi matriksi veliko obetajo hidrogeli (16, 17, 18).

Hidrogeli so tridimenzionalne premrežene strukture, sestavljene iz hidrofilnih polimerov, ki lahko sprejmejo večje količine vode. Polimeri so lahko naravnega ali sinteznega oziroma polysinteznega izvora. Poleg polimera in vode vsebujejo ponavadi še vlažilec in konzervans. Polimer v vodi nabreka, ne da bi se raztapljal. Netopnost in fizikalna integriteta sta posledica prisotnih kemijskih ali fizikalnih premreženj med polimernimi verigami. Pri kemijsko premreženih polimernih verigah so prisotne kovalentne vezi, medtem ko fizikalno premreženje omogočajo šibke van der Waalsove vezi, vodikove vezi in hidrofobne interakcije (Slika 6).



Slika 6: Primer tvorbe interakcij pri fizikalnem premreženju (A) in kovalentnem premreženju (B) (7)

Voda v hidrogelu je lahko vezana ali prosta. Na začetku hidratacije polimera pride najprej do vezave vode na polimer zaradi močnih interakcij med molekulami vode in hidrofilnimi deli polimera. Hidrogel nato zaradi osmotske sile, ki jo povzroča vgrajena učinkovina, vsrka dodatno vodo, ki ni vezana, zapolni vmesne prostore med polimernimi verigami ter omogoča raztapljanje snovi in difundiranje molekul. Kot že omenjeno (poglavje 1.4.2 Materiali v sodobnih oblogah za rane), je končna količina vode v hidrogelu odvisna od hidrofilnosti

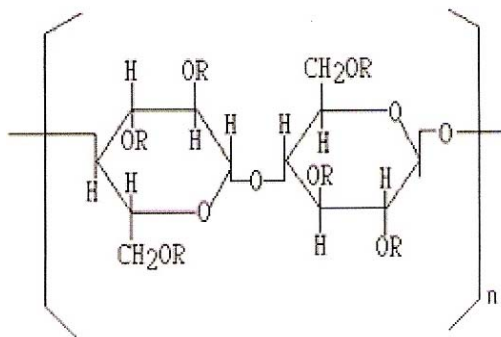
polimera in stopnje premreženja. Večja ko je sposobnost nabrekanja polimera, večja je njegova vpojnost v oblogah za rane.

Na splošno so za sproščanje iz polimernih matrikov značilni trije glavni mehanizmi (16, 17, 18):

- difuzijsko nadzorovano sproščanje
Tovrsten mehanizem sproščanja je prisoten pri učinkovinah, ki so homogeno dispergirane v polimernem nosilcu: učinkovina prosto difundira iz nosilca v akceptorski medij. Gonilna sila je koncentracijski gradient.
- kemijsko nadzorovano sproščanje
Pri tej vrsti sproščanja pride do razgradnje polimera in erozije nosilca, kar omogoči sproščanje učinkovine.
- sproščanje, nadzorovano z nabrekanjem polimera
Tovrstno sproščanje nastopi zaradi osmotskega efekta in nabrekanja polimera.

1.5.2.1 Hidroksietilceluloza (HEC)

HEC je delno substituiran polihidroksietilni eter celuloze. Komercialno je dostopna v več razredih, ki se med seboj razlikujejo po stopnji substitucije in viskoznosti 1- ali 2% vodne raztopine polimera pri 25 °C (Slika 7). HEC je široko zastopana pomožna snov v farmacevtski industriji: uporablja se pri oblaganju tablet in izdelavi suspenzij, kot vezivo v tabletah in za povečevanje viskoznosti raztopin.



Slika 7: Strukturna formula HEC: n - število monomernih enot; $R=H$ ali $-(CH_2CH_2O)_mH$ (15)

HEC je neionski vodotopen polimer. Topna je v hladni in topli vodi, pri raztapljanju pa tvori prozorne homogene raztopine. Pri dovolj veliki koncentraciji tvori fizikalno premrežene hidrogelne, ki so primerni za uporabo kot sodobne obloge za vlažno celjenje ran. V obliki praška je kljub higroskopnosti stabilna. Viskoznost vodnih raztopin pada z višanjem temperature. Možna je encimska razgradnja HEC z encimi bakterij in gliv iz okolja, zato je pri dolgotrajnejšem shranjevanju vodnih raztopin nujna uporaba konzervansov. Vodne raztopine HEC je možno sterilizirati z avtoklaviranjem (15, 19, 20, 21).

1.5.3 Hidrogeli- dostavni sistemi za proteinske učinkovine

Farmacevtske oblike za dostavo peptidnih in proteinskih učinkovin morajo predvsem zagotavljati stabilnost le- teh, strukturno integriteto in z njo tesno povezano funkcionalnost.

Željene lastnosti hidrogelov za dostavo proteinov so (17):

- zagotavljanje integritete proteina
- visoka kapaciteta vgradnje proteina
- omogoča fizikalno-kemijsko stabilnost skozi daljše časovno obdobje
- omogoča željen profil sproščanja
- možnost uporabe kakovostnih, dostopnih in cenovno ugodnih materialov
- biokompatibilnost (odsotnost draženja tkiva; brez dolgoročnih histoloških, morfoloških ali sistemskih toksičnih učinkov; ni genotoksičen, kancerogen, pirogen in imunogen)
- biorazgradljivost z varnimi razpadnimi produkti (pomembno pri dostavnih sistemih, ki se injicirajo oziroma vsadijo; ni nujno pri oblogah za rane).

Vodno okolje hidrogelov je podobno fiziološkemu okolju proteinov v organizmu, zaradi česar so med najprimernejšimi dostavnimi sistemi za ohranjanje njihove stabilnosti in biološke aktivnosti. Zaradi mehke in prilagodljive konsistence se dobro prilegajo na aplicirane površine in ne dražijo tkiva. Možno je vplivati na njihovo afiniteto do vodnega okolja, v katerem nabrekajo. Z različnimi modifikacijami (encimskimi, kemijskimi) je možno oblikovati biorazgradljive hidrokele, kadar je to potrebno. Medfazna napetost med hidrogeli in okoliško tekočino je razmeroma nizka, kar otežuje adsorpcijo proteinov iz telesnih tekočin na površino hidrogela. S tem je zmanjšana verjetnost zavrtnitvene reakcije organizma. Ravno tako je možno podaljšanje časa sproščanja proteinov iz hidrogelov, in sicer z ojačanjem interakcij med hidrogelom in vgrajenim proteinom (fizikalno, kovalentno) ali z upočasnitvijo difuzije z modifikacijo mikrostrukture hidrogela. Slednje dosežejo z uporabo interpenetrirajoče polimerne mreže; s površinsko modifikacijo in tvorbo filma z zmanjšano prepustnostjo na površini hidrogela; ter s kompozitnimi hidrogeli, ki so kombinacija hidrogelov in dostavnih sistemov z delci, kot so na primer mikrosfere (18). Hidrogeli omogočajo dostavo širokega spektra učinkovin z različno hidrofilnostjo in molekulsko maso.

V zadnjih letih so se hidrogeli razvili od najbolj enostavnih do t.i. pametnih hidrogelov, ki se lahko odzivajo na različne pogoje v organizmu, kot sta na primer pH in temperatura, in tako samonadzorujejo sproščanje učinkovin. Zaradi svojih pozitivnih lastnosti in številnih možnosti tehnološke izboljšave predstavljajo hidrogeli primeren dostavni sistem za peptidne in proteinske učinkovine.

2. NAMEN DELA

Uporaba sodobnih oblog za vlažno celjenje ran omogoča vzdrževanje vlažnega mikrookolja v rani, kar prinaša številne prednosti pred klasično oskrbo, predvsem pa pospeši celjenje. To je zelo pomembno pri kroničnih ranah, ki se zaradi porušenega biokemijskega ravnovesja celijo počasi in neučinkovito. Z uporabo hidrogelov kot sodobnih oblog je mogoče zagotoviti optimalno vlažnost rane in hkrati aktivno poseči v proces celjenja z dostavo biokemijskih dejavnikov, ki so ključnega pomena za uspešno celjenje ran.

Namen diplomske naloge bo izdelati hidrokele, ki bodo primeren dostavni sistem za proteine in bodo omogočali nadzorovano sproščanje le- teh. Vanje bomo vgradili jajčni albumin, ki bo modelni protein za inhibitor cisteinskih proteaz cistatin. Takšni hidrogeli, ki omogočajo interakcijo z biokemijskim okoljem rane, lahko izboljšajo celjenje kroničnih ran: zaradi visoke vsebnosti vode vlažijo rano, proteazni inhibitorji pa omilijo čezmerno proteolitično aktivnost, ki je glavna značilnost kroničnih ran.

Izdelali bomo hidrokele s hidroksietilcelulozo, v katere bomo vgradili jajčni albumin. Najprej bomo preverili stabilnost albumina v fosfatnem pufru PBS, ki bo predstavljal vodni medij hidrogelov, kot tudi stabilnost vgrajenega albumina. Nadalje bomo raziskali vpliv sestave hidrogela na sproščanje proteina, in sicer tako, da bomo izvedli test sproščanja albumina iz hidrogelov, pripravljenih z različnimi koncentracijami hidroksietilceluloze in albumina. Ovrednotili bomo homogenost porazdelitve jajčnega albumina v hidrogelu. Pri delu bomo uporabili HPLC analitiko. Kakovost rezultatov analizne metode bomo izboljšali predvsem z razvojem postopka predhodne priprave vzorcev.

3. EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 MATERIALI

- Materiali za izdelavo hidrogelov
 - brezvodni glicerol ($\geq 99.5\%$), Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
 - hidroksietilceluloza Natrosol[®] Pharm, tip 250 HHX- Pharm, Lot: X- 0107, ZDA
 - jajčni albumin (Albumin from chicken egg white, Grade V), min. 98 %, (agarozna gelska elektroforeza, kristaliziran in liofiliziran, brez prisotnosti soli, videz: belkasti kosmiči); Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
 - metilparaben, Ilirija
 - bidestilirana voda
- Reagenti za pripravo fosfatnega pufra in mobilne faze za HPLC analizo
 - kalijev klorid ($> 99.5\%$), Merck KGaA, Nemčija
 - kalijev dihidrogenfosfat ($> 99.5\%$), Merck KGaA, Nemčija
 - dinatrijev hidrogenfosfat ($> 99.5\%$), Merck KGaA, Nemčija
 - dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat (99.0- 102.0 %), Merck KGaA, Nemčija
 - natrijev klorid ($> 99.5\%$), Merck KGaA, Nemčija
 - klorovodikova kislina 37 %, Merck KGaA, Nemčija
 - natrijev hidroksid ($\geq 99.0\%$), Merck KGaA, Nemčija
 - bidestilirana voda

3.2 NAPRAVE

- avtomatske pipete BIOHIT (100- 5000 μL), Finska
- analitska tehtnica AG 245, Mettler Toledo, Švica
- pH meter MA 234, Mettler Toledo, Švica
- magnetno mešalo, IKA, Nemčija
- ultrazvočna kad Sonis 4, Iskra, Slovenija
- filtri Minisart hidrofilni, (0.20 μm), Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija

- sistem za visokotlačno tekočinsko kromatografijo HPLC, Agilent Series 1100, Agilent Technologies, Nemčija; kolona Zorbax GF- 250 z velikostjo delcev 4 μ m, notranjim premerom 9.4 mm in dolžino 250 mm

3.3 METODE

3.3.1 Izdelava hidrogelov

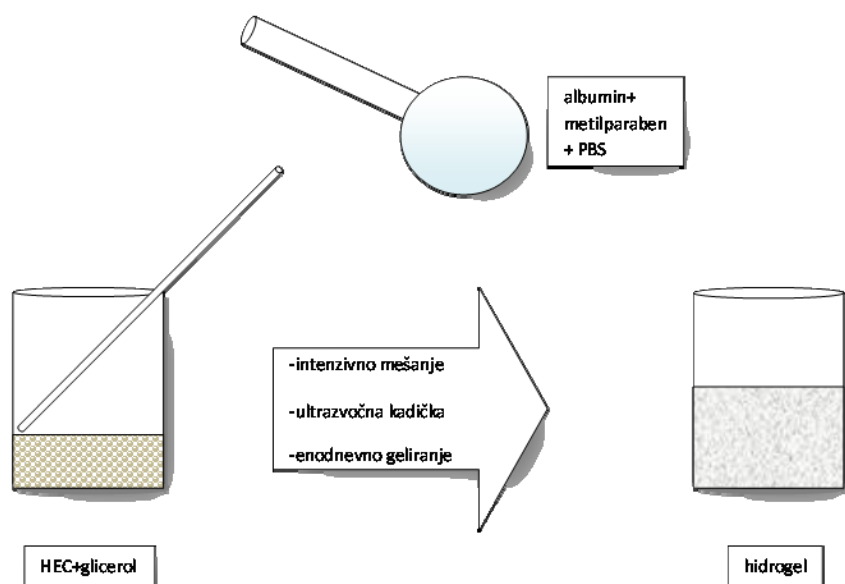
3.3.1.1 Priprava fosfatnega pufra PBS

Fosfatni pufer PBS predstavlja fiziološko okolje za albumin, v katerem je zagotovljena njegova stabilnost. Zato smo se odločili, da bomo uporabili PBS kot vodno fazo pri izdelavi hidrogelov. Na tehtnici smo natehtali 0.2 g KCl, 0.24 g KH_2PO_4 , 1.44 g Na_2HPO_4 ter 8.0 g NaCl. Soli smo kvantitativno prenesli v litrsko bučo in dodali toliko bidestilirane vode, da je gladina segala malo pod oznako na buči. Ko so se soli raztopile, smo z 1M HCl umerili pH raztopine na vrednost 7.0 ± 0.05 , nato pa bučo dopolnili z bidestilirano vodo do oznake. Pripravljeni pufer je pri opisani sestavi izotoničen, pH 7 pa smo izbrali na podlagi analitike, ki je bila do neke mere že prej postavljena, in tudi glede na priporočila proizvajalca kromatografske kolone.

3.3.1.2 Izdelava hidrogelov

Izdelali smo hidrokele z 1.5-, 3.0- in 4.5 m/m % koncentracijo HEC. Vsakega od izdelanih gelov smo pripravili s tremi različnimi koncentracijami albumina glede na fosfatni pufer (približno 0.5; 1.0; 2.0 mg/ml). Za pripravo 50- gramskih hidrogelov smo natehtali ustrezne količine HEC (0.75 g; 1.5 g; 2.25 g) in 5.0 g brezvodnega glicerola ter ju zmešali v čaši (Slika 8). V drugi čaši smo v 43.4 ml pripravljenega PBS dodali 0.1 g metilparabena in toliko albumina, da smo dobili raztopino željene koncentracije. Vsebinsko čaše smo mešali na magnetnem mešalu, dokler se ni metilparaben raztopil. Nato smo raztopino albumina in metilparabena v PBS ob palčki dodali k zmesi HEC in glicerola. Pri tem smo morali

intenzivno mešati, da smo razbili večje polimerne skupke. Po združitvi vsebin smo čaše postavili še za približno 5 minut v ultrazvočno kadičko, kar je pripomoglo k boljši homogenizaciji in hkrati omogočilo hitrejšo permeacijo zračnih mehurčkov iz hidrogelov. Zračni mehurčki v hidrogelu bi namreč lahko vplivali na sproščanje albumina. Po enodnevnem geliranju pri sobni temperaturi so nastali hidrogeli homogenega videza. Na enak način smo izdelali tudi hidrokele brez albumina, ki so predstavljali slepe vzorce.

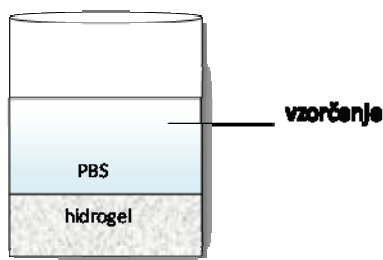


Slika 8: Prikaz priprave hidrogelov

3.3.2 Test sproščanja jajčnega albumina iz HEC hidrogelov

Najbolj uveljavljen model sproščanja farmacevtskih oblik za dermalno aplikacijo so Franzove celice, ki so sestavljene iz dveh polovic, ločenih z vmesno membrano: učinkovina prehaja skozi membrano iz donorskega v akceptorski prostor, v katerem vzorčimo. Glede na to, da je pri kroničnih ranah oslABLJENA zaščitna vloga kože, le- ta ne predstavlja mehanske ovire pri prehodu učinkovin: protein lahko iz hidrogela neovirano difundira na mesto delovanja. Franzove celice v tem primeru ne bi najboljše posnemale realnega stanja, zato smo model

sproščanja povzeli po predhodnem diplomskem delu s podobno temo (15). V 50- mililitrske čaše smo natančno natehtali približno 5 g hidrogela, ki je predstavljal donorski prostor, ter kot akceptorski medij dolili 10 ml PBS (Slika 9). V omenjenem diplomskem delu so potrdili ustreznost opisanega modela sproščanja: plasti hidrogela in medija sta ostali ločeni v času 96 ur, odvzem vzorcev iz medija pa je bil možen, ne da bi pri tem posegali v plast hidrogela. Čaše, ki so stale pri sobni temperaturi in zaščitene pred svetlobo, smo pokrili s parafilmom. Vzorce (2.5ml) smo jemali s sredine medija ob časih 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 24, 48, 72 in 96 ur ter jih nadomeščali z enakim volumnom svežega pufra, da bi se izognili nasičenju pufra z albuminom. Odvzete vzorce smo filtrirali skozi 0.20 μm filter in jih zamrznili do analize. Test sproščanja smo izvedli tudi na hidrogelih brez vgrajenega albumina, ki so predstavljali slepe vzorce. Vsako sproščanje je potekalo v treh paralelkah. Zaostankom po sproščanju smo dodali še 30 ml PBS in tako hidrokele z mešanjem na magnetnem mešalu raztopili v vsega skupaj 40 ml PBS. Na ta način smo določili dejanske mase vgrajenega albumina v hidrogelih in s primerjavo le- teh znotraj paralelk ovrednotili homogenost porazdelitve albumina v izdelanih 50- gramskih hidrogelih.



Slika 9: Shematski prikaz modela za sproščanje albumina iz hidrogela

3.3.3 HPLC analitika

Postopek za določanje količine albumina je bil povzet po diplomskem delu (15). Uporabili smo HPLC analitiko. Mobilno fazo smo po navodilih proizvajalca kromatografske kolone pripravili tako, da smo 7.6 g NaCl in 7.2 g Na₂HPO₄*12H₂O raztopili v približno 1900 ml bidestilirane vode in po umerjanju pH z 1M HCl na vrednost 7.0 ± 0.05 dopolnili do 2000 ml.

- kromatografska kolona

Uporabili smo kolono ZORBAX GF- 250 z dolžino 250 mm, notranjim premerom 9.4 mm in velikostjo delcev 4 µm. Primerna je za vodotopne makromolekule z molekulsko maso 4 - 400 kDa. Ločevanje poteka na osnovi gelske izključitvene filtracije (glede na velikost molekul).

- volumen avtomatsko injiciranega vzorca: 10 µl
- pretok mobilne faze: 1 ml/min
- termostat 23 °C; temperatura vzorcev 20 °C
- UV detekcija pri valovni dolžini 210 nm
- čas analize smo podaljšali z 20 min na 45 min (razlaga v poglavju 4.2 Optimizacija priprave vzorcev za HPLC)

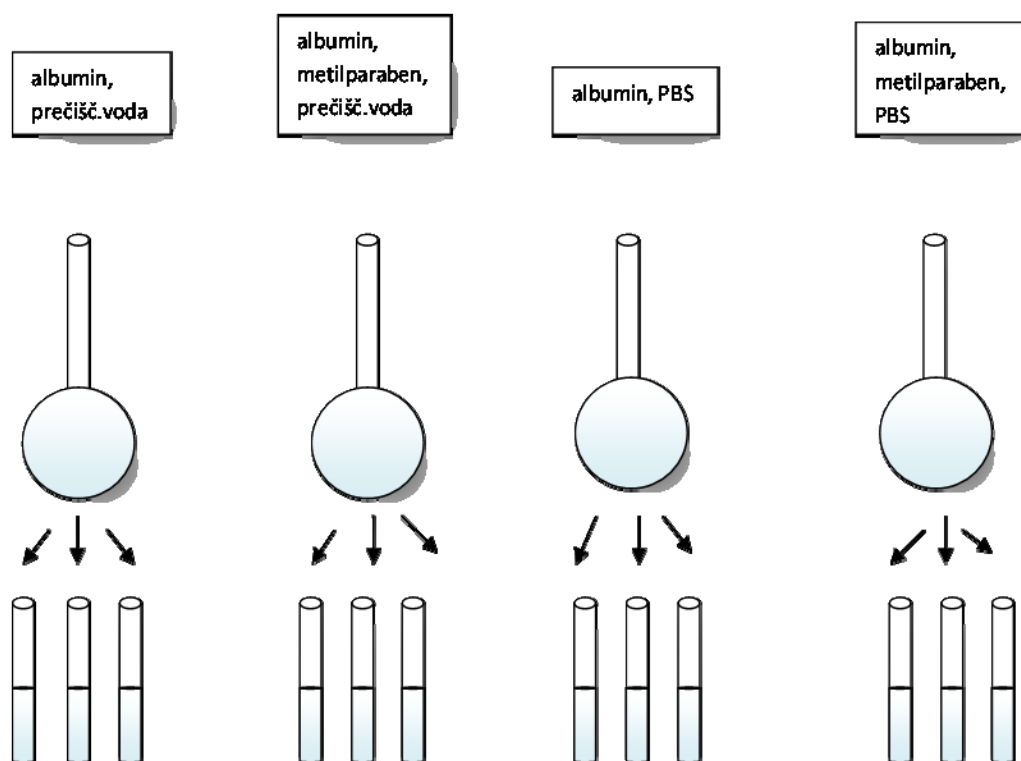
3.3.3.1 Umeritvena premica za albumin

Po vzorčenju smo vse odvzete vzorce pri testu sproščanja najprej filtrirali skozi 0.20 µm filter. Zaradi večjega števila vzorcev nismo imeli možnosti sprotne HPLC analize, zato smo jih po odvzemu zamrznili pri -22 °C. Če bi vzorci stali dalj časa pri sobni temperaturi, bi lahko prišlo do razpada albumina. Umeritveno premico smo določili na osnovi petih različnih koncentracij albumina v mobilni fazi (0.05; 0.12; 0.50; 1.04; 2.05 mg/ml): najnižjo koncentracijo albumina smo izbrali glede na ustreznost odzivov HPLC sistema. Za vsak standard posebej smo na tehtnici natehtali ustrezno maso jajčnega albumina, ga kvantitativno prenesli v 10- mililitrsko bučko in po dodatku 0.33 g glicerola (krioprotektant) dopolnili z mobilno fazo do oznake. Z namenom, da bi čimbolj enako obravnavali tako vzorce kot standardne raztopine, smo vsako standardno raztopino filtrirali skozi 0.20 µm filter in nato do HPLC analize zamrznili.

3.3.4 Vrednotenje stabilnosti albumina

Nujni pogoj za kontrolirano sproščanje albumina iz hidrogelov je stabilnost albumina v takšnem okolju. Pripravili smo raztopini albumina v prečiščeni vodi s koncentracijo 1 mg/ml, brez in z dodatkom 0.1 % metilparabena, ter raztopini albumina v PBS s koncentracijo 1 mg/ml, brez in z dodatkom metilparabena. Tako pripravljene raztopine smo razdelili v plastične epruvete, ki so bile shranjene pri sobni temperaturi, in za test stabilnosti jemali vzorce ob časih 0, 10, 24, 48, 72 in 96 ur. Testiranje smo izvedli v treh paralelkah in z vzorci postopali enako kot pri določanju umeritvene premice (poglavje 3.3.3.1) (Slika 10).

Prav tako smo izdelane hidrogelne z vgrajenim albuminom več tednov organoleptično spremljali in opazovali morebitne spremembe videza in vonja.



Slika 10: Prikaz testiranja stabilnosti jajčnega albumina

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZBIRA KONZERVANSA IN KONCENTRACIJ HEC ZA IZDELAVO HIDROGELOV

Ustrezna viskoznost hidrogelov kot sodobnih oblog za vlažno celjenje ran je bistvenega pomena za učinkovito aplikacijo na mesto delovanja in zagotavljanje tesnega stika s kožo, za primernost izdelave v proizvodnji in tudi zaradi samega odvzema iz vsebnika (15). V omenjenem literaturnem viru so med drugim proučevali viskoznost treh komercialno dostopnih hidrogelov pri treh različnih temperaturah (25°, 32° in 37°C) ter na podlagi rezultatov postavili širok okvirni interval primernih viskoznosti, ki je znašal 50 - 225 Pa*s.

Nadalje so ugotovili, da je viskoznost izdelanega 3% HEC hidrogela znotraj tega intervala, saj so bile dobljene vrednosti 145 ± 3.46 Pa*s pri 25°C, 143.7 ± 7.55 Pa*s pri 32°C in 129.3 ± 7.51 Pa*s pri 37°C. Nasprotno so bile vrednosti za 1.5% in 4.5% HEC hidrogel prenizke oziroma previsoke: najvišja viskoznost 1.5% HEC hidrogela je znašala 21.7 ± 1.65 Pa*s (pri 25°C), najnižja viskoznost 4.5% HEC hidrogela pa je bila 390.2 ± 8.97 Pa*s (pri 37°C). Iz reogramov pa je bilo jasno, da viskoznost vseh hidrogelov ob aplikaciji strižne sile hitro pade in se približa viskoznosti HEC hidrogela s koncentracijo 1.5% (15), kar omogoča njihov enostaven nanos bodisi na kožo ali rano. Ker nas je zanimal vpliv sestave HEC hidrogela na sproščanje jajčnega albumina, smo izdelali hidrokele v 1.5-, 3- in 4.5% koncentraciji HEC.

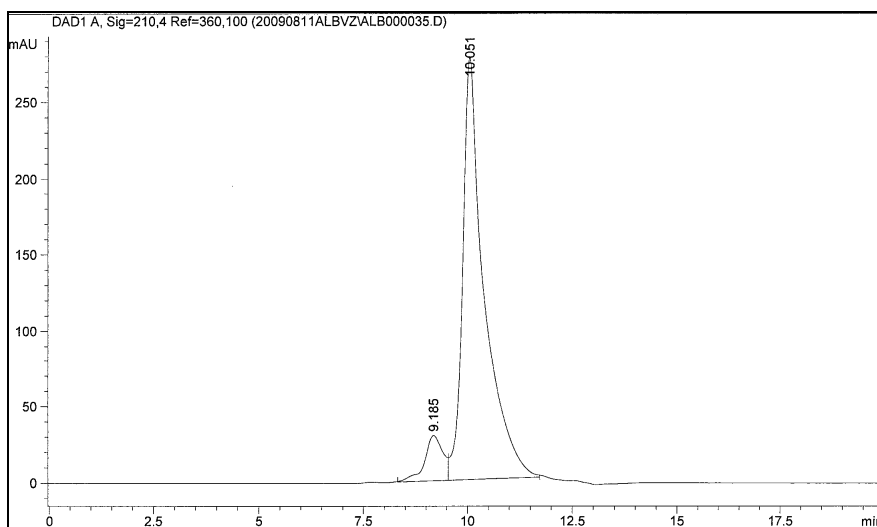
V literaturnih virih smo za pripravo dermalnih izdelkov zasledili uporabo konzervansa metilparabena. Odločili smo se, da bomo v hidrogelih predhodno uporabljen konzervans dinatrijev tetraborat zamenjali zaradi neprimernosti uporabe, še posebej na poškodovani koži. Metilparaben je v vodi zelo težko topen, njegova topnost je 1g/1000- 10000 ml. Pred izdelavo hidrogelov smo morali zato dalj časa mešati raztopino metilparabena v PBS, da se je zadovoljivo raztopil. Menimo, da bi bila v prihodnje bolj primerna uporaba natrijeve soli metilparabena.

4.2 OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCEV ZA HPLC ANALIZO

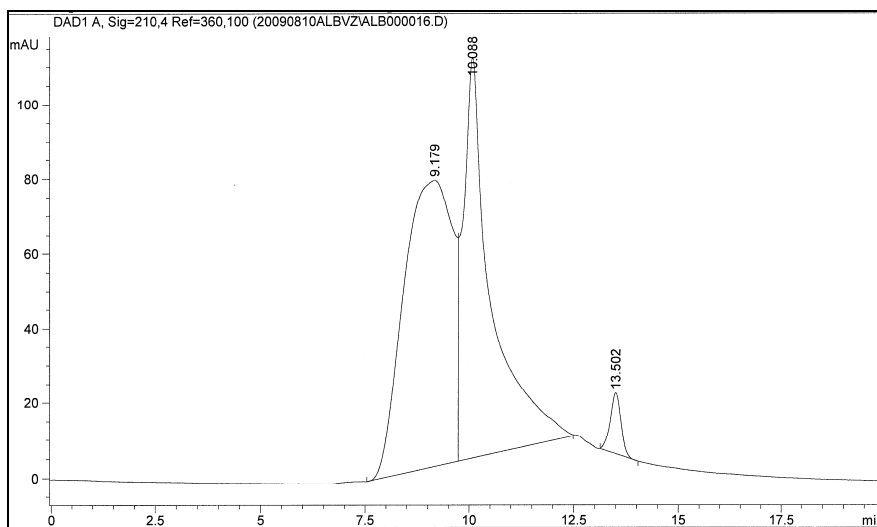
4.2.1 Vpliv filtracije vzorcev na HPLC določanje albumina

Začetno sproščanje jajčnega albumina iz HEC hidrogelov smo izvedli tako, da smo v penicilinke z ravnim dnom natančno natehtali približno 1 g hidrogela ter dolili 2 ml PBS. V določenih časovnih intervalih smo jemali 0.5- mililitrske vzorce, ki smo jih brez filtriranja takoj po odvzemu zamrznili. Odvzete vzorce smo nadomeščali z enakim volumnom svežega PBS. Pri HPLC analizi vzorcev pa smo naleteli na težave, saj so bili dobljeni kromatogrami neuporabni: ni prišlo do popolne ločbe vrhov na bazni liniji, zaradi česar nismo mogli izračunati ustreznih koncentracij sproščenega albumina (Slika 11B).

A)

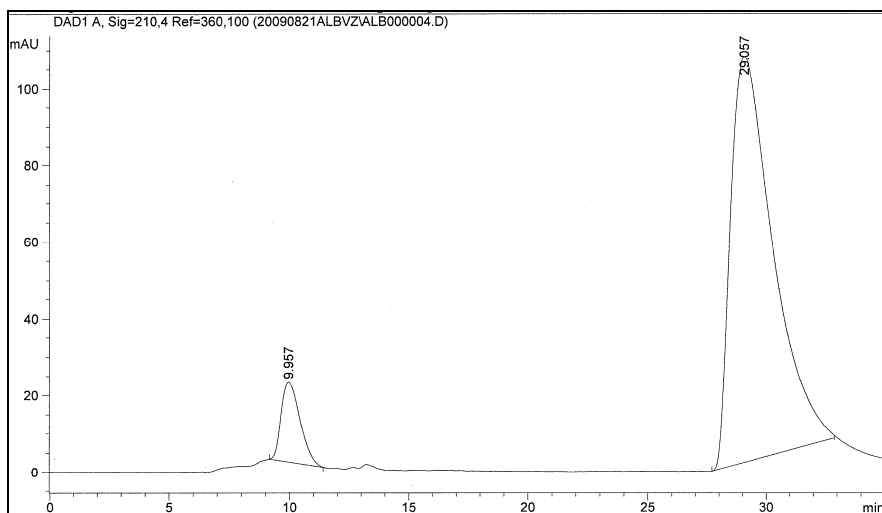


B)



Slika 11: Primer ustreznega kromatograma albumina iz standardne raztopine albumina v PBS; kromatografska vrhova z retencijskim časom $t_R \approx 9.2$ min in $t_R \approx 10$ min pripadata albuminu (A) in primer neustreznega kromatograma vzorca po sproščanju albumina iz HEC hidrogela z neločenimi vrhovi na bazni liniji; vrh s $t_R \approx 13.5$ min pripada erodiranemu HEC polimeru (B)

Predvidevali smo, da se iz vzorcev poleg albumina eluira tudi neznana spojina z daljšim retencijskim časom, kot ga ima albumin pri danih pogojih (okrog 10 minut). Če bi bil retencijski čas neznane spojine daljši od 20 minut, kolikor je prvotno znašal čas analize vzorcev, bi se zaostala spojina iz predhodnega vzorca eluirala v približno enakem času kot albumin v naslednjem vzorcu, kar bi vplivalo na kromatografski vrh albumina. Da bi raziskali to predpostavko, smo pri nekaj vzorcih sproščanja podaljšali čas analize z 20 na 45 minut: velik kromatografski vrh pri 30 minutah je potrdil našo domnevo (Slika 12).



Slika 12: Kromatografski vrh albumina z retencijskim časom $t_R \approx 10$ min in neznane spojine z retencijskim časom $t_R \approx 30$ min

Neznana spojina je imela retencijski čas okrog 30 minut: ker je bil čas analize vzorcev za približno 10 minut prekratek, da bi se spojina eluirala pred analizo naslednjega vzorca, je do elucije prišlo pri naslednjem vzorcu, in to ravno v času 10 minut, ko je potekala elucija albumina. Zaradi tega so bili vrhovi albumina delno prekriti z vrhovi neznane spojine in kot takšni neuporabni za izračun koncentracij albumina v vzorcih. Zavedali smo se, da bi omenjeno težavo enostavno rešili z ustreznim podaljšanjem časa analize vzorcev, vendar bi analiza zaradi velikega števila vzorcev pri posameznem sproščanju trajala predolgo. Neznano spojino z retencijskim časom 30 min smo zato želeli odfiltrirati pred HPLC analizo. Tako smo izvedli 24-urni test sproščanja albumina iz 3% HEC hidrogela s koncentracijo vgrajenega albumina 1 mg/ml ter ugotavljali, kako se razlikujejo kromatogrami filtriranih in nefiltriranih vzorcev. V čaše smo natančno natehtali približno 3 g pripravljenega hidrogela, dolili 6 ml PBS ter v rednih časovnih intervalih jemali 1.5- mililitrske vzorce, ki smo jih nadomeščali s svežim PBS. Test sproščanja smo izvedli v dveh paralelkah: vzorce ene paralelke ($a_1 - a_4$) smo filtrirali skozi 0.20 μm filter, vzorce druge paralelke ($b_1 - b_4$) smo analizirali nefiltrirane, HPLC analize pa smo opravili pri dveh različnih časih analize - 20 in 45 minut (Tabela II).

Tabela II: Prikaz priprave vzorcev

zaporedna št. vzorca	vrsta vzorca	filtracija	čas analize vzorca (min)
1	a ₁	+	20
2	b ₁	-	20
3	a ₂	+	20
4	b ₂	-	20
5	a ₃	+	45
6	b ₃	-	45
7	a ₄	+	45
8	b ₄	-	45

Legenda: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8- zaporedje vzorcev pri HPLC analizi; a, b,- oznake vzorcev; 1, 2, 3, 4- čas odvzema vzorca od začetka sproščanja (1- po 4h; 2- po 8h; 3- po 10h; 4- po 24h); +- filtriran vzorec; - - nefiltriran vzorec

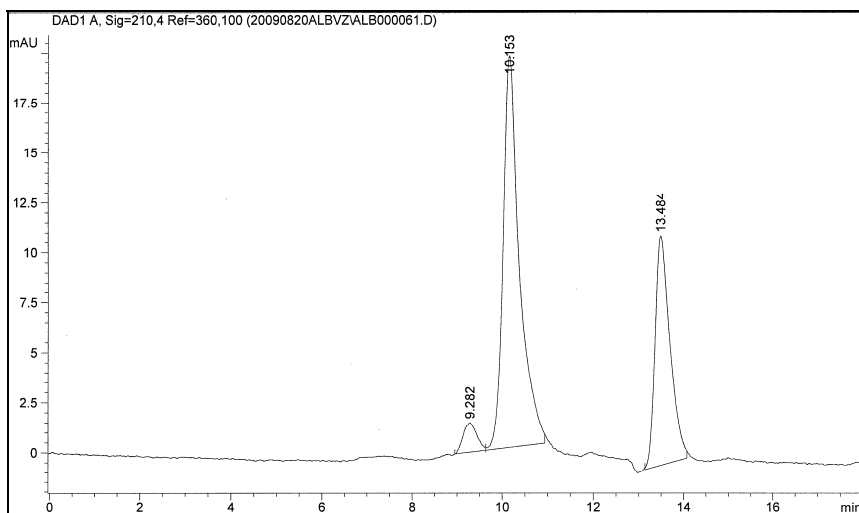
S HPLC analizo prvih štirih vzorcev pri 20- minutnem času analize smo ugotovili naslednje:

- kromatogram prvega filtriranega vzorca a₁ je bil ustrezen; tudi vrh za albumin je bil ločen od drugega vrha (Slika 13A); dodatni vrh s $t_R = 13.5$ min pripada HEC
- kromatograma obeh nefiltriranih vzorcev b₁ in b₂, ki sta sledila filtriranima vzorcema a₁ oziroma a₂, sta bila prav tako ustrezna in vrh albumina znova ločen od drugih vrhov (Slika 13A)
- kromatogram filtriranega vzorca a₂, ki je na HPLC aparatu sledil nefiltriranemu vzorcu b₁, pa je bil drugačen od ostalih (Slika 13B).

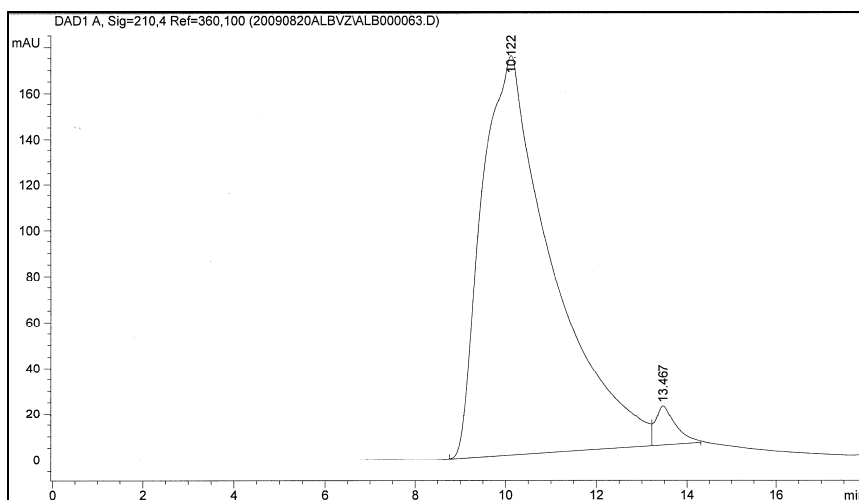
Razlog za drugačen kromatogram vzorca a₂, ki je imel razširjen in večji kromatografski vrh albumina, je v tem, da je bil pred vzorcem a₂ analiziran nefiltrirani vzorec b₁. Zakasnjena

elucija neznane spojine iz nefiltriranega vzorca je vplivala na kromatogram naslednjega vzorca, filtriranega vzorca a₂.

A)



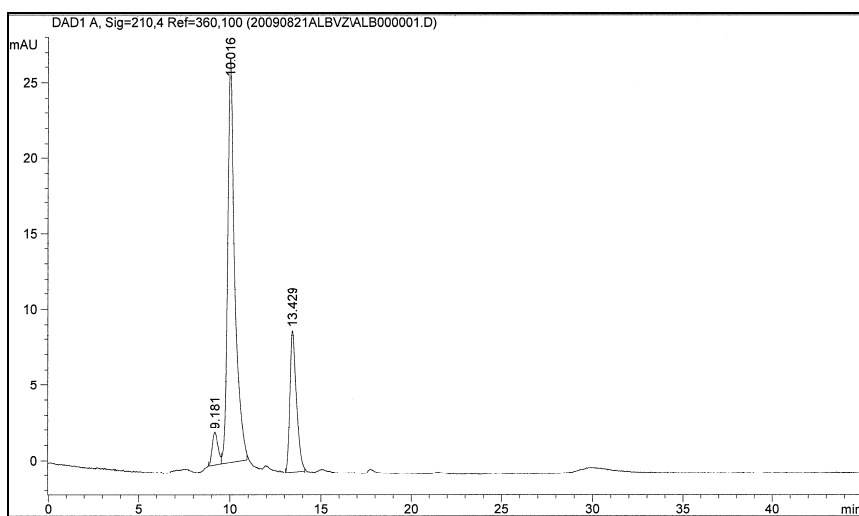
B)



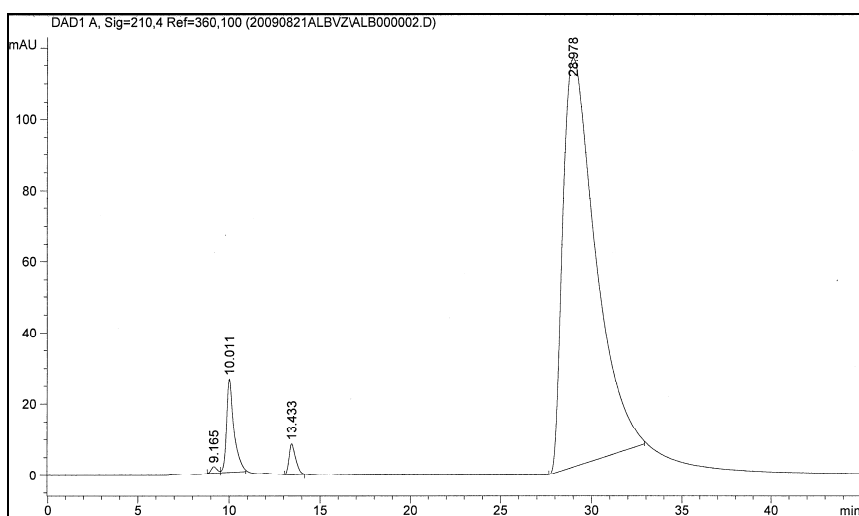
Slika 13: Reprezentativni kromatogram vzorcev a₁, b₁, b₂ z jasno ločenim kromatografskim vrhom albumina (A) in kromatogram vzorca a₂ s spremenjenim vrhom za albumin (B)

S HPLC analizo zadnjih štirih vzorcev, pri kateri smo podaljšali čas analize na 45 minut, smo ugotovili, da na kromatogramih filtriranih vzorcev a_3 in a_4 ni bil prisoten kromatografski vrh pri 30 minutah (Slika 14A). Nasprotno smo pri nefiltriranih vzorcih b_3 in b_4 zaradi velikega vrha pri 30 minutah sklepali na prisotnost neznane spojine z daljšim retencijskim časom (Slika 14B).

A)



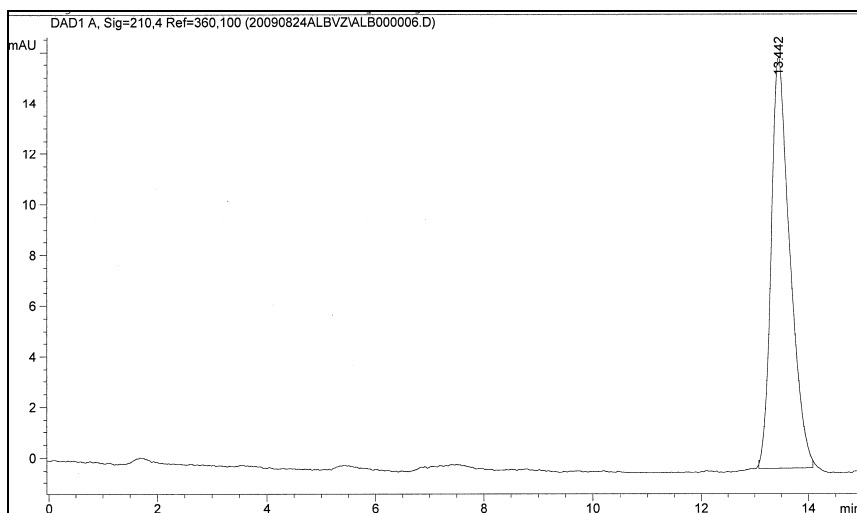
B)



Slika 14: Reprezentativna kromatograma filtriranih (A) in nefiltriranih vzorcev (B)

Iz navedenega smo sklepali, da bi lahko s filtracijo odvzetih vzorcev skozi 0.20 μm filter odstranili neznano spojino z retencijskim časom $t_R \approx 30$ min in tako preprečili, da bi se le-ta eluirala pri naslednjem vzorcu skupaj z albuminom. Tako bi lahko skrajšali potek analize, saj bi že pri 20-minutnem času analize vzorcev dobili ustrezne kromatograme. Kot se je pri kasnejših analizah vzorcev, odvzetih med testi sproščanja, izkazalo, je bila naša domneva napačna, saj kljub filtraciji vseh vzorcev, pri nekaterih vzorcih v 20-minutah ni prišlo do popolne ločbe kromatografskih vrhov, kar pomeni, da s filtracijo neznane spojine nismo v celoti odfiltrirali. Razlog je verjetno v številu vzorcev za analizo. Pri posameznem sproščanju namreč odvezamo veliko število vzorcev, približno 100, ki jih HPLC aparatura analizira drugega za drugim. Možno je, da smo s filtracijo sicer odstranili del neznane spojine v vzorcih, vendar se je preostali del zadrževal v koloni in se v času HPLC analize, ki je običajno trajala nekaj dni, večkrat eluiral in takrat prekril kromatografske vrhove albumina. Zato smo se odločili, da čas za posamezno analizo vzorcev podaljšamo na 45 minut. Kljub temu smo zaradi zaščite same kromatografske kolone nadaljevali s filtriranjem odvzetih vzorcev.

Test sproščanja smo vedno izvedli tudi na HEC hidrogelih, ki niso vsebovali jajčnega albumina. Tako pri hidrogelih, ki so vsebovali albumin, kot pri hidrogelih brez albumina smo detektirali kromatografski vrh pri približno 13 minutah, iz česar smo zaključili, da vrh ne pripada albuminu (Slika 15). Vrh ravno tako ne more pripadati metilparabenu, saj smo ga detektirali tudi pri vzorcih prvega testa sproščanja iz HEC hidrogelov, ki niso vsebovali metilparabena, temveč predhodno uporabljen konzervans dinatrijev tetraborat. Iz navedenega sklepamo, da kromatografski vrh pri 13 minutah pripada HEC. Pri sproščanju namreč poleg difuzije albumina v pufer poteka tudi površinska erozija polimera, pri čemer pride do delnega razpletanja hidroksietilceluloznih verig in njihovega raztapljanja v PBS.



Slika 15: Kromatogram slepega vzorca hidrogela brez vgrajenega jajčnega albumina s prisotnim kromatografskim vrhom za HEC

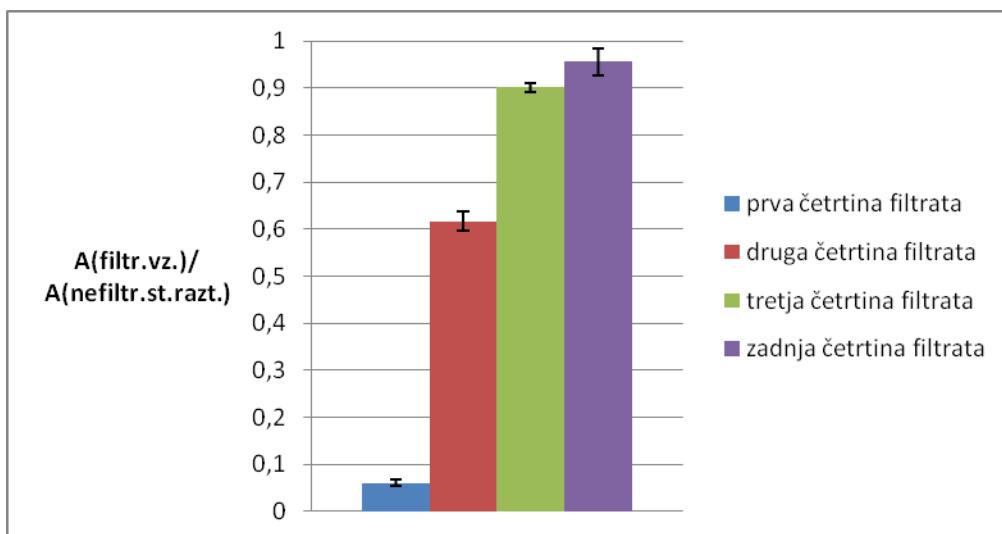
Glede na to, da se je neznana spojina eluirala iz kolone v času 30 minut, bi lahko šlo za fragmente HEC polimera z manjšo molekulsko maso, saj je distribucija molekulskih mas polimera lahko široka. Z UV spektrom neznane spojine, posnetim pri 210 nm, tega nismo mogli potrditi, kajti nismo ugotovili podobnosti med spektroma HEC polimera in neznane spojine. Zanesljivo pa lahko trdimo, da kromatografski vrh pri 30 minutah ne pripada albuminu, saj smo pri 45- minutnem času analize ugotovili njegovo prisotnost tudi na kromatogramih slepih vzorcev, ki niso vsebovali albumina. V vseh vzorcih, tudi slepih, je bil prisoten metilparaben. Gre za relativno lipofilen konzervans, ki bi lahko v določenih pogojih tvoril agregate in se nato v času 30 minut eluiral, kar bi zaznali kot kromatografski vrh. Ker tega eksperimentalno nismo potrdili, bomo v nalogi govorili o vrhu neznane spojine.

4.2.2 Postopek filtracije vzorcev

Po dokončni odločitvi, da bomo vse odvzete vzorce filtrirali skozi 0.20 μm filtre ter analizirali pri času analize 45 minut, nas je zanimalo, ali s filtracijo odstranjujemo tudi že sproščeni albumin. Pri predhodno opisanem proučevanju vpliva filtracije smo namreč opazili, da so bili

filtrati praviloma bolj koncentrirani kot nefiltrirani vzorci. To je bilo sprva ravno nasprotno od pričakovanega, saj smo menili, da se bo del albumina izgubil pri filtraciji in bo koncentracija albumina v filtratu posledično nekoliko nižja. Razlog za nepričakovano višje koncentracije filtriranih vzorcev je bil v tem, da smo vzorce filtrirali skozi suhe filtre, pri čemer nismo upoštevali mrtvega volumna filtrov. To pomeni, da je del PBS zaradi kapilarnih sil zaostajal v filterih, filtrirani vzorci pa so bili posledično bolj koncentrirani.

Za potrditev te domneve smo pripravili 4 različne postopke filtriranja, in sicer smo filtrirali 2.5 ml standardne raztopine albumina v PBS s koncentracijo 0.5 mg/ml. Da bi se izognili koncentriranju filtratov, smo vsak filter predhodno omočili z 2 ml PBS. V prvem postopku filtriranja smo skozi filter potisnili $\frac{1}{4}$ vzorca, preostanek zavrgli in filtrat analizirali. V drugem postopku filtriranja smo prvo četrtno filtrata zavrgli, drugo četrtno pa smo shranili za HPLC analizo. V tretjem postopku filtracije smo zavrgli prvi dve četrtini filtrata in obdržali tretjo četrtno, v četrtem postopku pa smo analizirali zadnjo četrtno filtrata. Test smo izvedli v treh paralelkah, kar pomeni, da smo analizirali 12 vzorcev. Površine kromatografskih vrhov filtriranih vzorcev smo nato primerjali s površino vrha nefiltrirane standardne raztopine albumina v PBS s koncentracijo 0.5 mg/ml (Slika 16).



Slika 16: Razmerje površin kromatografskih vrhov albumina filtriranih vzorcev ($A(\text{filtr.vz.})$) in nefiltrirane standardne raztopine ($A(\text{nefiltr.st.razt.})$) glede na različen način odvzema filtrata

Iz primerjave površin kromatografskih vrhov filtriranih vzorcev ter nefiltrirane standardne raztopine smo ugotovili velike razlike v koncentraciji albumina filtriranih in nefiltriranih vzorcev. Ko smo analizirali prvo četrtino filtrata, smo opazili, da je koncentracija albumina v filtriranem vzorcu bistveno nižja kot koncentracija nefiltrirane raztopine, kar pomeni, da albumin zaostaja v filtru. Pri analizi vsake naslednje četrtine filtrata opazimo, da se manj albumina veže na filter, torej, da ga lahko več detektiramo, ter da se z odvzemom zadnje četrtine filtrata približamo koncentraciji nefiltriranih vzorcev. Zato smo se odločili, da bomo pri filtraciji vsakega vzorca skozi s pufrom predhodno omočen filter prve tri četrtine filtrata zavrgli in za analizo shranili samo zadnjo četrtino filtrata.

Nadalje smo preverjali, ali bi lahko posamezen filter večkrat uporabili in dobili realne rezultate. Kot smo že omenili, je bilo število vzorcev pri vsakem sproščanju zelo veliko. Če bi lahko z večkratno uporabo filtrov dosegli enake rezultate, bi bila enkratna uporaba posameznega filtra tako s finančnega kot tudi časovnega vidika neutemeljena. Filtriranje vzorcev je bilo namreč zelo zamudno: zaradi majhnega premera por pri uporabljenih filterih smo morali filtrirati zelo počasi, sicer je pritisk znotraj injekcijske brizge preveč narasel ter potisnil filter z brizge, pri čemer je prišlo do razlitja vzorcev. K že tako zamudnemu filtriranju je dodatno prispevalo predhodno omočenje vsakega uporabljenega filtra, zato bi lahko z večkratno uporabo filtrov vsaj nekoliko časovno privarčevali. S tem namenom smo izvedli 4-urni test sproščanja albumina iz 3% HEC hidrogelov. Test sproščanja smo izvedli v štirih paralelkah. V štiri 50- mililitrske čaše smo natančno natehtali približno 5 g hidrogela ter dolili 10 ml PBS. Vzorčili smo v običajnih časovnih intervalih ter odvzete vzorce nadomeščali z enakim volumnom PBS. Čas posamezne analize smo nastavili na 45 minut. Vzorce paralelk a in b smo filtrirali vsakega skozi svež filter, medtem ko smo za preostale vzorce uporabili po en filter za c in en filter za d paralelko (Tabela III).

Tabela III: Retencijski časi in površine kromatografskih vrhov pri enkratni/ večkratni uporabi filtrov

	vzorci		t_R (min)	A (mAU*s)
enkratna uporaba filtrov	a	a ₁	10.0; 13.5	53.0; 162.9
		a ₂	10.0; 13.5	231.9; 213.5
		a ₃	10.0; 13.5	285.6; 231.5
		a ₄	10.0; 13.5	377.3; 258.5
	b	b ₁	10.0; 13.5	64.0; 140.2
		b ₂	10.0; 13.5	176.1; 195.7
		b ₃	10.0; 13.5	297.6; 245.8
		b ₄	10.0; 13.5	299.0; 266.9
večkratna uporaba filtrov	c	c ₁	10.0; 13.5	62.7; 161.5
		c ₂	10.0; 13.5; 32.1	116.7; 157.1; 1128.9
		c ₃	10.0; 13.5; 32.1	219.2; 205.3; 3652.4
		c ₄	10.0; 13.5; 32.1	308.3; 234.9; 5588.8
	d	d ₁	10.0; 13.5	59.7; 163.0
		d ₂	10.0; 13.5; 32.1	107.9; 166.5; 1384.7
		d ₃	10.0; 13.5; 32.1	209.3; 198.9; 3263.9
		d ₄	10.0; 13.5; 32.1	319.9; 242.0; 5188.7

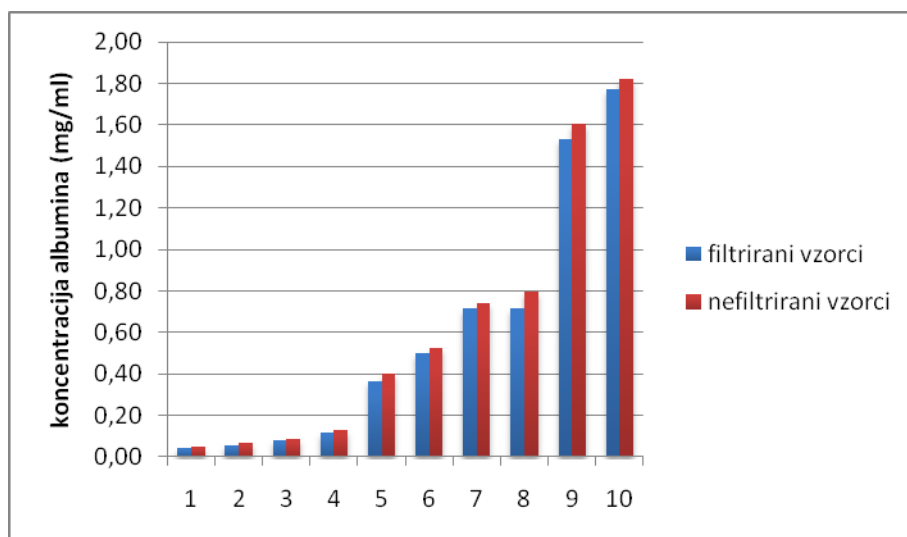
*Legenda: a, b, c, d- oznaka paralelk; 1, 2, 3, 4- čas odvzema od začetka sproščanja (1- po 0.5h; 2- po 1h; 3- po 2h; 4- po 4h); t_R (min)- retencijski časi kromatografskih vrhov; A (mAU*s)- površine kromatografskih vrhov*

Kromatogrami vzorcev, ki smo jih filtrirali vedno skozi sveže filtre, so izkazovali dva kromatografska vrhova, in sicer pri 10 minutah (albumin) ter približno 13 minutah (HEC). Neznana spojina z retencijskim časom 32 minut ni bila prisotna v vzorcih. Nasprotno pa so kromatogrami vzorcev, ki smo jih filtrirali skozi večkrat uporabljene filtre (c₂- c₄; d₂- d₄), vsebovali dodaten kromatografski vrh pri približno 32 minutah. Sodeč po navedenem smo sklepali, da z večkratno uporabo posameznih filtrov presežemo njihovo kapaciteto in povzročimo odpuščanje spojin, ki smo jih predhodno uspešno odfiltrirali. Menili smo, da bi se lahko tudi albumin v določeni meri zadrževal v filtrih ter se po presežku filtrirne kapacitete

naključno odpuščal v vzorce. Posledično bi bila koncentracija albumina v vzorcih vprašljiva, saj ne bi vedeli, ali se je detektirani albumin sprostil iz hidrogela ali pa morda iz filtra. Glede na vse to smo se odločili za enkratno uporabo filtrov.

4.2.3 Izgube albumina pri filtraciji

Za oceno izgub albumina pri filtraciji vzorcev smo uporabili 10 standardnih raztopin albumina v mobilni fazi različnih koncentracij. Iz vsake standardne raztopine smo odvzeli po dva vzorca, od katerih smo samo enega filtrirali skozi predhodno omočen 0.20 μm filter. Preostale polovice odvzetih vzorcev nismo filtrirali. Iz površin kromatografskih vrhov smo izračunali ustrezne koncentracije albumina (Slika 17).



Slika 17: Primerjava koncentracij albumina filtriranih in nefiltriranih standardnih raztopin

Izračunane koncentracije filtriranih standardnih raztopin so bile v povprečju nižje za 7.27 odstotkov, vendar je bilo sipanje rezultatov precejšnje.

4.3 VREDNOTENJE STABILNOSTI ALBUMINA

4.3.1 Določitev enačbe umeritvene premice

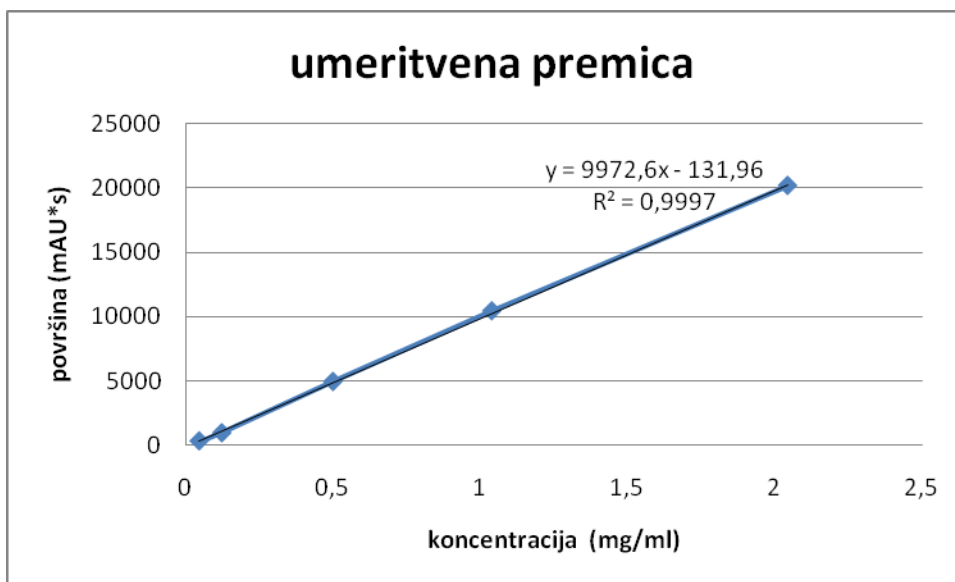
Pripravili smo standardne raztopine različnih koncentracij jajčnega albumina v mobilni fazi ter jih ovrednotili s HPLC metodo. Pogoji HPLC metode so navedeni v poglavju HPLC analitika (3.3.3). Čas analize smo nastavili na 45 minut. Glede na to, da smo vse odvzete vzorce pri testih sproščanja in stabilnosti zamrznili do HPLC analize, smo menili, da bi morali enako ravnati tudi s standardnimi raztopinami. Predvidevali smo, da bodo koncentracije albumina v vzorcih bolj natančno določene, če bomo tudi standardne raztopine zamrznili. Vsak standard smo posebej pripravili, in sicer tako, da smo v 10- mililitrsko bučko natančno natehtali določeno maso albumina, dodali 0.33 g brezvodnega glicerola (krioprotektant) ter z mobilno fazo dopolnili do oznake. Pripravljene raztopine smo filtrirali skozi 0.20 µm filter, predhodno omočen s PBS: prve tri četrtine filtrata smo zavrgli, zadnjo četrtino pa zamrznili do analize.

Na kromatogramih je prisoten večji kromatografski vrh pri približno 10 minutah, ki pripada albuminu, kar smo potrdili tudi z referenčnimi spektri proizvajalca kolone. Opazili smo, da se pri višjih koncentracijah albumina pojavi dodaten manjši vrh z retencijskim časom $t_R \approx 9$ minut (Slika 19). Za identifikacijo smo pri valovni dolžini 210 nm posneli UV spektre obeh vrhov ter ugotovili, da so absorpcijski spektri enaki. Iz tega smo sklepali, da tudi manjši vrh pripada albuminu, ki je najverjetneje prisoten v nekoliko drugačni konformacijski obliki. Slednjega smo, kjer je bilo možno, tudi upoštevali pri izračunih koncentracij. Z linearno regresijo smo določili enačbo umeritvene premice, ki se je najbolj prilegala eksperimentalnim točkam (Slika 18):

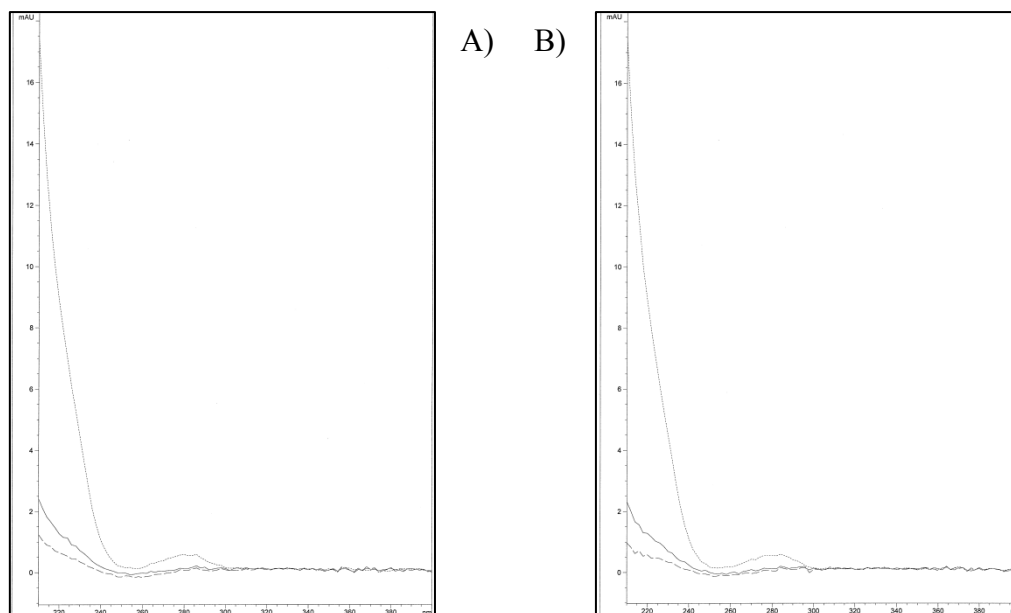
$$y = 9972.6 \cdot x - 131.96 \rightarrow c \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{A + 131.96}{9972.6} \quad \text{enačba 1}$$

A...vsota površin kromatografskih vrhov albumina ($t_R \approx 9$ min in $t_R \approx 10$ min)

c...koncentracija albumina $\left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]$



Slika 18: Odvisnost površin kromatografskih vrhov albumina od koncentracije albumina v mobilni fazi



Slika 19: UV spektra manjšega kromatografskega vrha s $t_R \approx 9$ min (A) in vrha albumina pri $t_R \approx 10$ min (B)

Po pregledu kromatogramov smo ugotovili še nekaj: površine kromatografskih vrhov albumina zamrznjenih standardnih raztopin so bile za približno 70 odstotkov večje kot pri svežih standardnih raztopinah enakih koncentracij. Retencijski čas albumina je bil pri svežih kot pri zamrznjenih standardnih raztopinah enak, kar kaže, da med zamrzovanjem ni prišlo do sprememb v sami strukturi albumina. Morebitno tvorbo agregatov bi namreč zaznali kot kromatografski vrh pri nižjem retencijskem času, saj bi se agregati zaradi velikosti prej eluirali iz kolone. Tudi oblike kromatografskih vrhov albumina so bile pri svežih in zamrznjenih standardnih raztopinah enake. Vzroka za omenjeni pojav nismo ugotovili, zato bo za razjasnitev le- tega potrebno nadaljnje delo.

Tako smo vse HPLC analize izvajali pri že navedenih pogojih:

- mobilna faza: 7.6 g NaCl, 7.2 g Na₂HPO₄*12H₂O, bidestilirana voda do 2000 ml
- kolona Zorbax GF- 250 z dolžino 250 mm, notranjim premerom 9.4 mm in velikostjo delcev 4 µm
- volumen avtomatsko injiciranega vzorca: 10 µl
- pretok mobilne faze: 1 ml/min
- termostat 23 °C; temperatura vzorcev 20 °C
- UV detekcija pri valovni dolžini 210 nm
- čas analize posameznega vzorca je znašal 45 min
- vzorci so bili pred analizo filtrirani skozi 0.20 µm filter, predhodno omočen z 2 ml PBS, in nato zamrznjeni do analize.

4.3.2 Stabilnost albumina

Stabilnost albumina smo spremljali 96 ur. Pripravili smo štiri osnovne raztopine albumina s koncentracijo 1 mg/ml: albumin v prečiščeni vodi, brez in z dodatkom metilparabena, in albumin v PBS, brez in z dodatkom metilparabena. Metilparaben smo uporabili v 0.1- odstotni koncentraciji. Vsako raztopino smo razdelili po 10 ml v tri plastične epruvete ter jemali 0.5- mililitrske vzorce v časih 0, 10, 24, 48, 72 in 96 ur. Odvzetih vzorcev nismo nadomeščali s

svežim medijem. Maso detektiranega albumina po vsakem vzorčenju smo izračunali z naslednjo enačbo:

$$m_n = c_n \times (10 - (n-1) \times 0.5) + \sum c_{n-1} \times 0.5 \quad \text{enačba 2}$$

kjer je

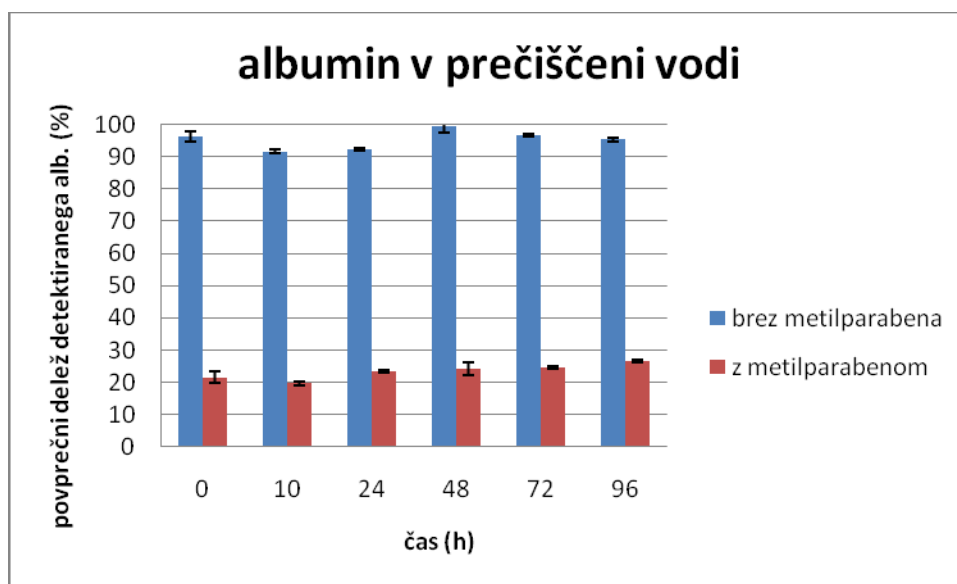
n ...zaporedna številka vzorčenja ($n=1$ v času $t=0$ h; $n=2$ v času $t=10$ h...),

m_n ...masa detektiranega albumina v raztopini po posameznem vzorčenju,

c_n ...koncentracija albumina v odvzetem vzorcu, izračunana iz umeritvene premice,

$(10 - (n-1) \times 0.5)$...volumen raztopine, ki je pri vsakem naslednjem vzorčenju za 0.5 ml manjši.

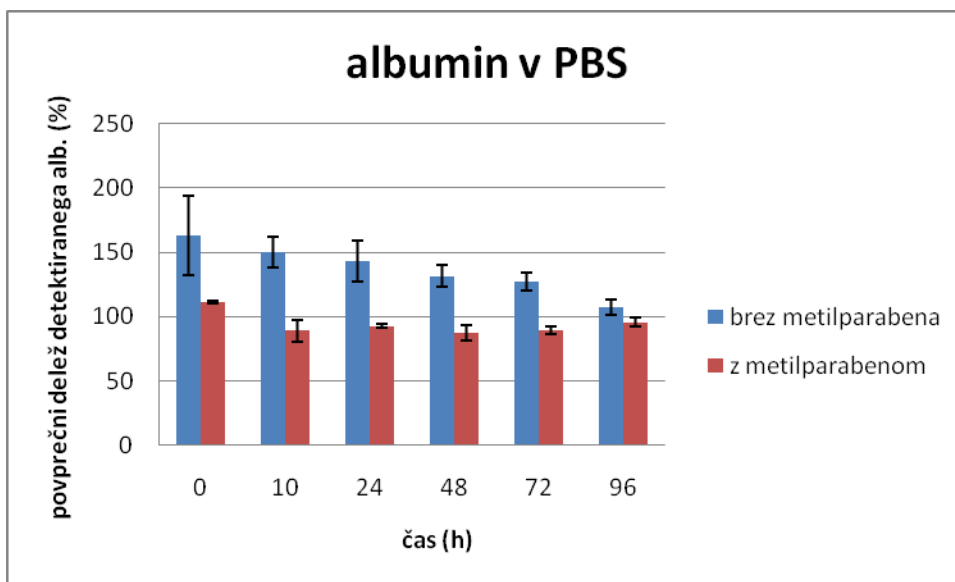
Za raztopine albumina v prečiščeni vodi smo ugotovili, da je bil delež detektiranega albumina višji v raztopinah brez metilparabena (Slika 20).



Slika 20: Odstotek detektiranega albumina v prečiščeni vodi v odvisnosti od časa; odstotek smo izračunali iz razmerja med eksperimentalno določeno maso in natehtano maso albumina

V prisotnosti metilparabena lahko po razvitem postopku določimo z izračunom iz umeritvene premice le približno 23 odstotkov albumina v vodi. Na dobljenih kromatogramih albumina nismo opazili sprememb v obliki kromatografskih vrhov ali v retencijskem času albumina. Glede na nizek odstotek detektiranega albumina lahko sklepamo, da v določeni meri pride do interakcij med metilparabenom in albuminom, ki bi lahko vplivale na detekcijo albumina. V tem primeru bi detektirali manj prostega albumina pri retencijskem času 10 minut. Kljub temu opazimo, da se odstotki detektiranega albumina v prečiščeni vodi, brez in z dodatkom metilparabena, ohranijo skozi vseh 96 ur.

Bolj kot detekcija albumina v vodi nas je zanimala detekcija albumina v PBS, saj je le- ta predstavljal vodno fazo pri izdelavi hidrogelov. Rezultati testa stabilnosti so bili podobni kot v prečiščeni vodi, in sicer v tem, da so bili odstotki detektiranega albumina višji v raztopinah brez metilparabena. Ponovno smo opazili precejšnje razlike brez in v prisotnosti metilparabena, le da so bili tokrat odstotki albumina brez konzervansa previsoki ($>100\%$). Eden od vzrokov je lahko v pripravi osnovnih raztopin. Pripravili smo namreč štiri osnovne raztopine albumina s koncentracijo 1 mg/ml: albumin v prečiščeni vodi, brez in z dodatkom metilparabena, ter albumin v PBS, brez in z dodatkom metilparabena (Slika 10). Osnovne raztopine smo pripravili v 50- mililitrskih bučkah in nato iz vsake odmerili po 10 ml v tri 10- mililitrske epruvete. V kolikor je prišlo do napake pri tehtanju albumina za pripravo osnovnih raztopin, bi se le- ta prenesla na vse tri paralelke posamezne raztopine. Ker so bile natehtane mase albumina relativno majhne (50 mg), bi morebitno nihanje tehtnice bolj prispevalo k napaki kot sicer. Vseeno pa opazimo, da se je koncentracija albumina v PBS v prisotnosti konzervansa s časom ohranjala (Slika 21).



Slika 21: Odstotek detektiranega albumina v PBS v odvisnosti od časa; odstotek smo izračunali iz razmerja med eksperimentalno določeno maso in natehtano maso albumina

Menimo, da se v času 96 ur stabilnost albumina ne spreminja, saj se odstotki detektiranega albumina v pripravljenih raztopinah ohranijo, spreminja pa se odziv albumina v različnih medijih. Kasneje smo ponovno dokazali (poglavje 4.4 Test sproščanja albumina iz HEC hidrogelov), da je stabilnost albumina v PBS zadostna v testiranem časovnem obdobju.

4.4 TEST SPROŠČANJA ALBUMINA IZ HEC HIDROGELOV

Želeli smo ugotoviti, kakšni so vplivi razlik v sestavi hidrogela na profile sproščanja in odstotek sproščenega jajčnega albumina. S tem namenom smo pripravili 50- gramske hidrogelne z 1.5-, 3- in 4.5- odstotno HEC po že opisanem postopku (poglavje 3.3.1.2 Izdelava hidrogelov). Vsakega od hidrogelov smo pripravili s tremi teoretičnimi koncentracijami albumina (0.5-, 1- in 2 mg/ml) (Slika 22) in nato v 50- mililitrske čaše natančno natehtali približno 5 g hidrogela ter dolili 10 ml PBS. Test sproščanja, ki je potekal v treh paralelkah, smo izvajali 96 ur, kar sovпада s časom uporabe sodobnih oblog za vlažno celjenje ran. Odvzete vzorce, ki so bili filtrirani in zamrznjeni do analize, smo analizirali s HPLC metodo.

Zaostanke hidrogelov po sproščanju smo raztopili v 40 ml PBS in tako določili dejansko maso vgrajenega albumina v hidrogelih, ki smo jo uporabili za izračun odstotkov sproščenega albumina. Pri izračunih smo uporabili naslednje enačbe:

- za maso sproščenega albumina: $m_n = c_n \times V + \sum c_{n-1} \times 2.5$ enačba 3
- za dejansko maso albumina v hidrogelu: $m_{dej} = c_n \times 40 + \sum c_{n-1} \times 2.5$ enačba 4
- za odstotek sproščenega albumina: $\%(\text{alb}) = (m_n/m_{dej}) \times 100$ enačba 5

kjer je

m_n ...masa albumina v PBS [mg]

c_n ...koncentracija albumina v PBS [mg/ml]

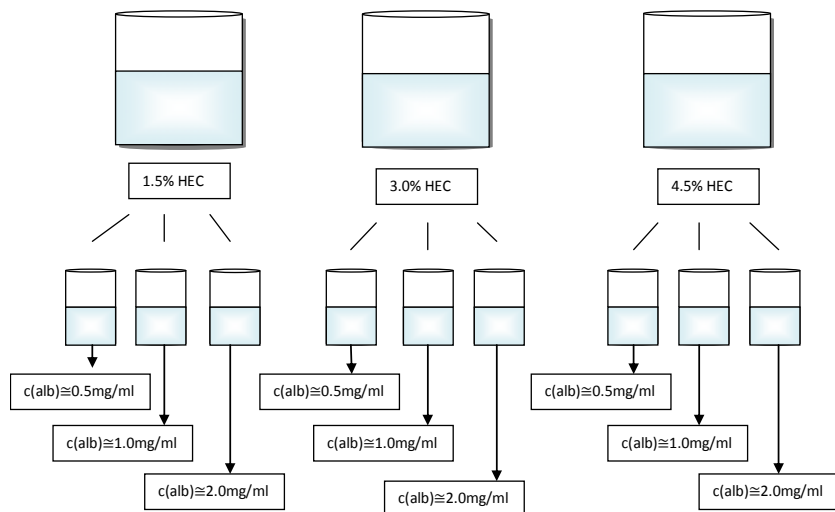
m_{dej} ...dejanska masa albumina v hidrogelu [mg]

V ...volumen PBS, iz katerega smo vzorčili (10 ml)

$\sum c_{n-1} \times 2.5$...vsota mas albumina v odvzetih vzorcih

$\%(\text{alb})$...odstotek sproščenega albumina

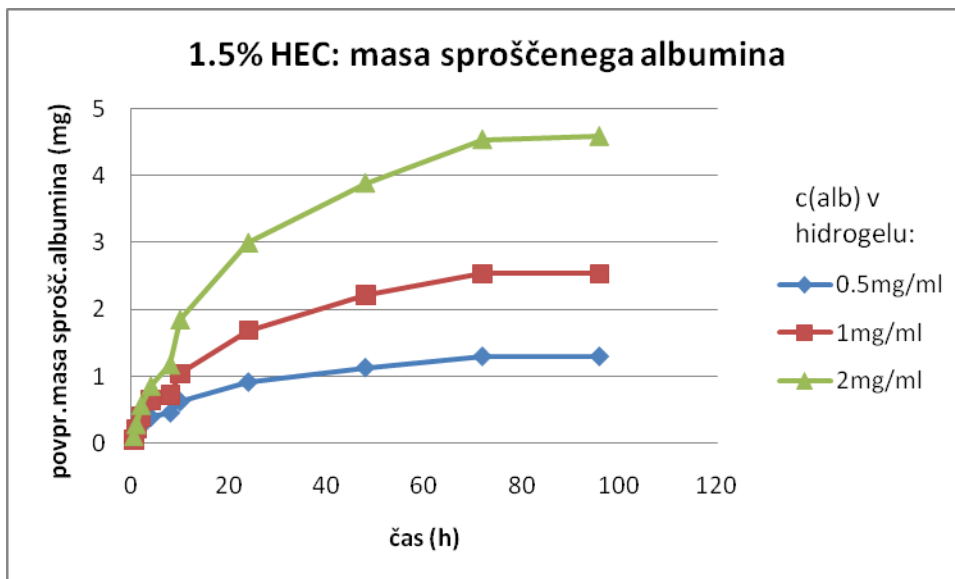
m_n/m_{dej} ...razmerje med maso sproščenega albumina in dejansko maso vgrajenega albumina v hidrogelu.



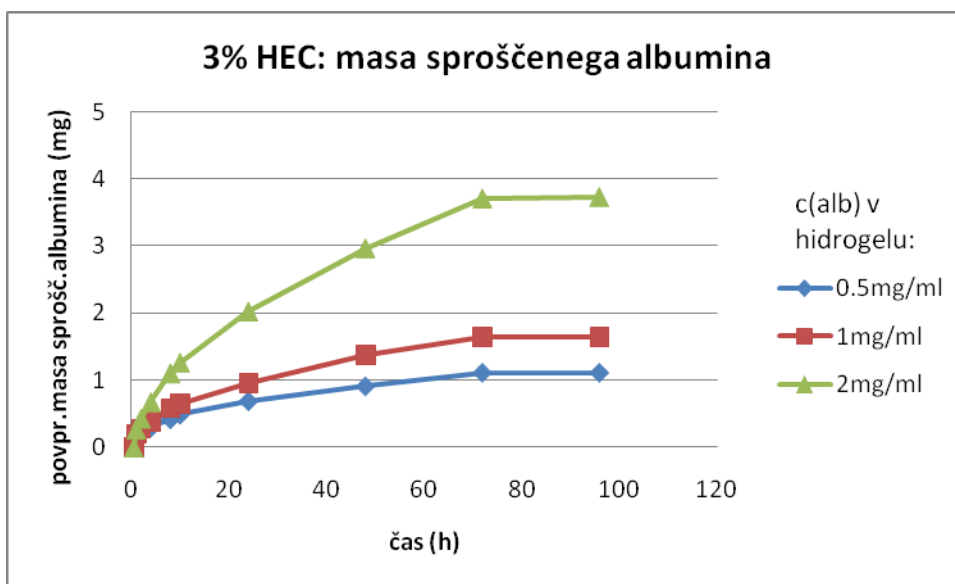
Slika 22: Prikaz pripravljenih hidrogelov za test sproščanja jajčnega albumina

Iz primerjave mas sproščenega albumina smo ugotovili, da so le- te najvišje v hidrogelih s koncentracijo albumina 2.0 mg/ml, kar je bilo pričakovano: večja ko je vsebnost albumina v hidrogelu, več se ga seveda lahko sprosti (Slika 23). To velja za vse tri koncentracije polimera. Opazili smo tudi, da se pri hidrogelih z enako koncentracijo albumina največ albumina sprosti iz 1.5- odstotnega HEC in najmanj iz 4.5- odstotnega HEC hidrogela. Če vzamemo za primer hidrogel s koncentracijo albumina 2.0 mg/ml: pri 1.5- odstotni HEC se po 72 urah sprosti okrog 4.5 mg albumina, pri 3- in 4.5- odstotni HEC pa v enakem časovnem obdobju le 3.7 mg oziroma 3.2 mg (Slika 23A, B, C). To pomeni, da višja koncentracija polimera predstavlja večjo oviro za difuzijo albumina iz hidrogela, saj so v tem primeru pore hidrogela manjše. Posledično je sproščanje albumina počasnejše.

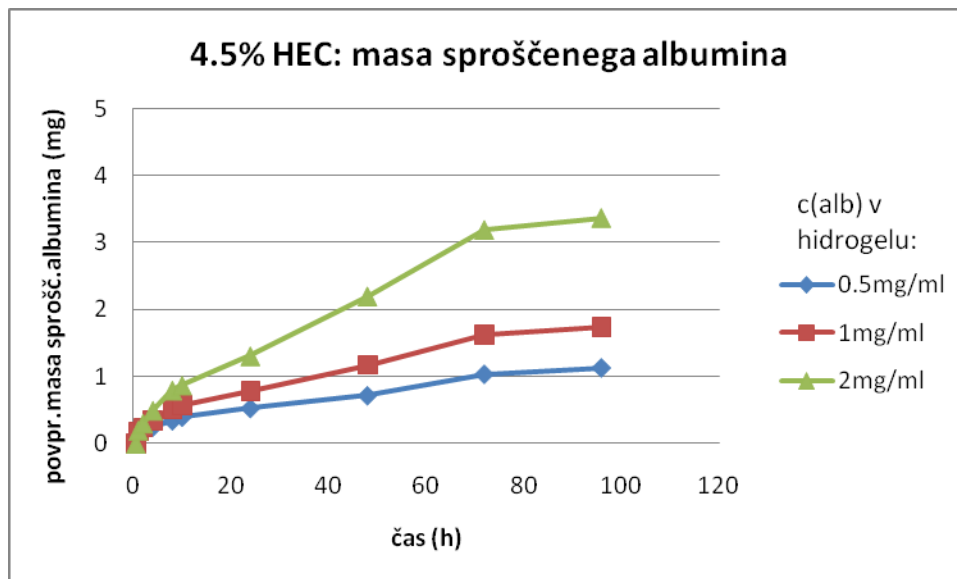
A)



B)



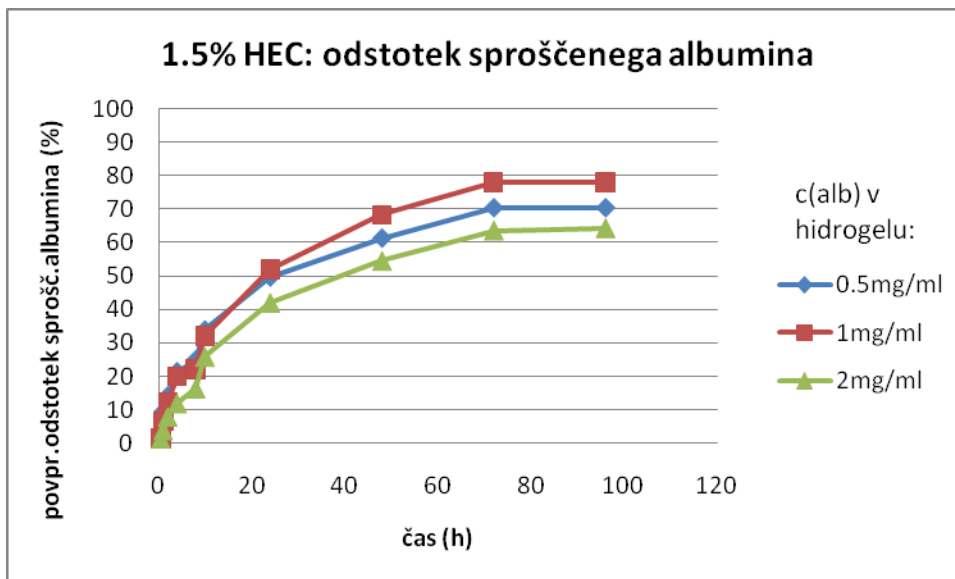
C)



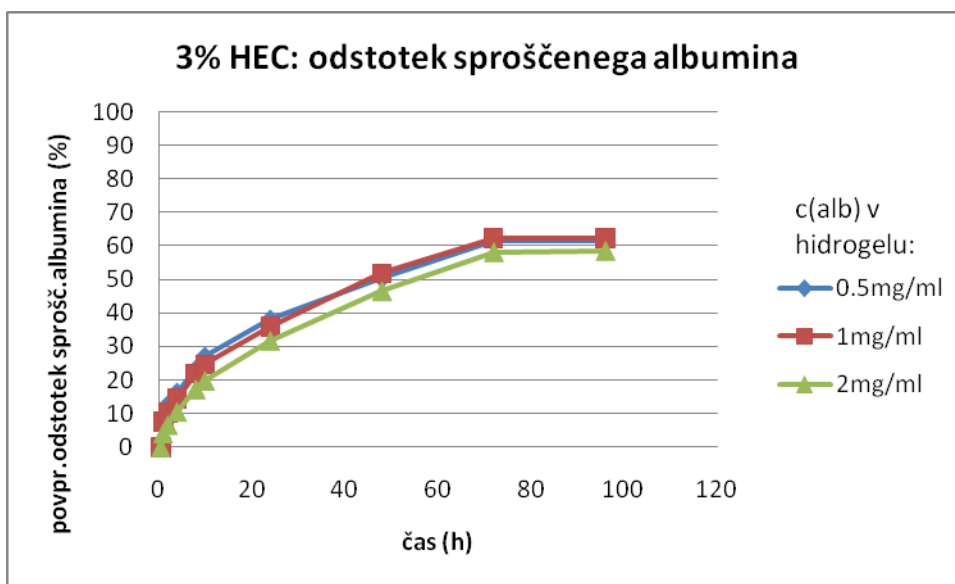
Slika 23: Spremljanje povprečne mase sproščenega albumina iz hidrogela v času 96 ur, pri različnih koncentracijah albumina v hidrogelu (0.5-, 1- in 2 mg/ml) in različnih koncentracijah polimera: 1.5- odstotna HEC (A), 3- odstotna HEC (B), 4.5- odstotna HEC (C); n=3

Če primerjamo odstotke sproščenega albumina pri treh koncentracijah vgrajenega albumina, ugotovimo, da se kljub večjim razlikam v absolutnih masah sproščenega albumina v odstotkih sproščanja razlikujejo le malo: 70, 78 in 64 % sproščenega albumina za koncentracije albumina 0.5, 1.0 in 2.0 mg/ml pri 1.5- odstotni HEC; 62, 62 in 59 % pri 3- odstotni HEC ter 61, 65 in 58 % sproščenega albumina pri 4.5- odstotni HEC (Slika 24A, B, C). Najhitreje se sprošča albumin iz 1.5 % HEC hidrogela, najpočasneje pa iz 4.5 % HEC hidrogela. Delež sproščenega albumina glede na dejansko maso vgrajenega albumina pa je pri isti koncentraciji polimera najmanjši pri največji koncentraciji vgrajenega albumina, kar je morda nekoliko presenetljivo.

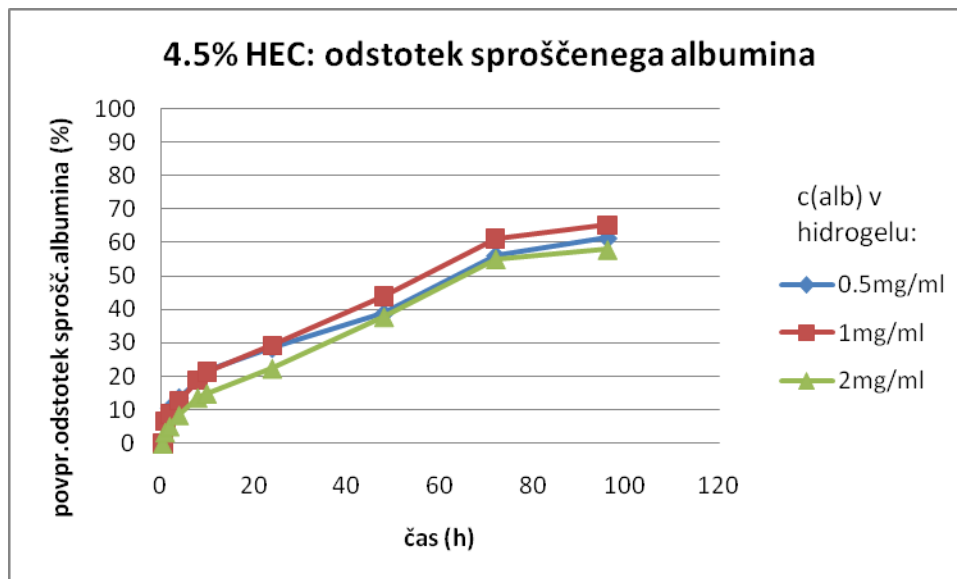
A)



B)



C)



Slika 24: Spremljanje povprečnega odstotka sproščenega albumina iz hidrogela v času 96 ur, pri različnih koncentracijah albumina v hidrogelu (0.5-, 1- in 2 mg/ml) in različnih koncentracijah polimera: 1.5- odstotna HEC (A), 3- odstotna HEC (B), 4.5- odstotna HEC (C); n=3

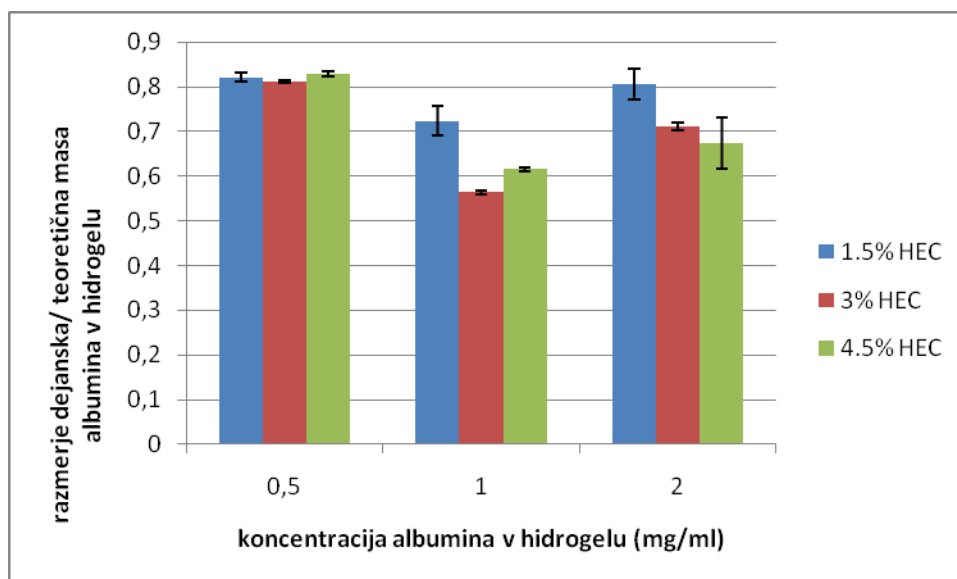
Po testih sproščanja albumina smo zaostanke raztopili v PBS z namenom, da bi določili dejanske mase albumina v 5- gramskih hidrogelih. Ugotovili smo, da se dejanske mase znotraj paralelek večinoma niso dosti razlikovale; relativni standardni odkloni so bili pri vseh hidrogelih, z izjemo enega, razmeroma nizki (Tabela IV). Na podlagi tega sklepamo, da je bil način priprave hidrogelov, četudi ročni, ustrezen in je zagotovil homogenost izdelanih 50-gramskih hidrogelov.

Tabela IV: Razlike v masah albumina izdelanih HEC hidrogelov

	1.5% HEC			3% HEC			4.5% HEC		
teoretična koncentracija albumina v hidrogelu (mg/ml)	0.5	1	2	0.5	1	2	0.5	1	2
teoretična masa albumina v hidrogelu (mg)	2.25	4.49	8.86	2.21	4.68	8.97	2.22	4.33	8.65
dejanska masa albumina v hidrogelu (mg)	1.85	3.25	7.14	1.80	2.64	6.38	1.84	2.66	5.84
masa sproščenega albumina (mg)	1.30	2.53	4.58	1.11	1.64	3.74	1.13	1.74	3.37
delež sproščenega albumina (%)	70.2	78.0	64.3	61.7	62.3	58.6	61.3	65.2	58.0
preostanek albumina v hidrogelu po 96- urnem sproščanju (mg)	0.55	0.72	2.56	0.69	1.0	2.64	0.71	0.92	2.47
teoretična - dejanska masa albumina v hidrogelu (%)	17.8	27.6	19.4	18.6	43.6	28.9	17.1	38.6	32.5
RSD	1.08	4.07	4.44	1.40	1.32	1.57	0.54	0.57	8.81

*Legenda: teoretična koncentracija albumina v hidrogelu- koncentracija albumina v 5-gramskem hidrogelu (mg/ml); teoretična masa albumina v hidrogelu- povprečna teoretična masa albumina v 5- gramskem hidrogelu, preračunana iz natehte albumina pri izdelavi hidrogela (mg); dejanska masa albumina v hidrogelu- povprečna dejanska masa albumina v 5-gramskem hidrogelu (mg), izračunana po enačbi 4; masa sproščenega albumina- povprečna masa sproščenega albumina (mg), izračunana po enačbi 3; delež sproščenega albumina- povprečni delež sproščenega albumina (%) glede na dejansko maso vgrajenega albumina v hidrogelu, izračunan po enačbi 5; preostanek albumina v hidrogelu po 96- urnem sproščanju- določena masa albumina, ki je ostal v hidrogelu po sproščanju (mg); teoretična – dejanska masa albumina v hidrogelu- razlika med povprečno teoretično in povprečno dejansko maso albumina v hidrogelu v odstotkih, izračunana po enačbi $(m_{teoretična} - m_{dejanska}) * 100 / m_{teoretična}$; RSD- relativni standardni odklon dejanskih mas albumina v hidrogelu (%); n=3*

V vseh hidrogelih so bile dejanske mase albumina manjše od natehtanih mas. Natehte albumina za pripravo hidrogelov so bile relativno majhne (za 50- gramski hidrogel: 21.7 mg albumina pri koncentraciji albumina v PBS 0.5 mg/ml; 43.4 mg albumina pri koncentraciji 1 mg/ml; 86.8 mg albumina pri koncentraciji albumina v PBS 2 mg/ml), zato je možno, da je nihanje tehtnice deloma prispevalo k razliki mas. Ker pa so se razlike med dejanskimi in natehtanimi masami z višanjem koncentracije albumina v hidrogelu večinoma le še povečale (Slika 25), menimo, da nihanje tehtnice ni ključnega pomena za razliko mas. Na samih kromatogramih nismo opazili sprememb, saj so bili prisotni samo kromatografski vrhovi albumina ($t_R \approx 9$ in 10 minut) in HEC ($t_R \approx 13$ minut). Bolj verjetno je, da pri določanju dejanske mase albumina v hidrogelu ni prišlo do popolnega raztapljanja hidrogela v PBS, zaradi česar je del albumina ostal vgrajen v neraztopljenih delcih hidrogela. Ravno tako lahko del izgub pripišemo filtraciji vzorcev. Kljub temu so rezultati sproščanja verjetni, saj smo vedno upoštevali le prosti sproščeni albumin, ki je na razpolago za delovanje kot modelni protein, torej kot učinkovina inhibitor cisteinskih proteaz.



Slika 25: Povprečno razmerje med dejansko in teoretično (natehtano) maso vgrajenega albumina v hidrogelih pri različnih koncentracijah albumina (0.5; 1; 2 mg/ml) in polimera (1.5; 3; 4.5% HEC); n=3

Več kot teden dni po izdelavi hidrogelov smo lahko v njih določili večino vgrajenega albumina, kar pomeni, da predstavljajo hidrogeli varno okolje za ohranitev proteinov znotraj določenega časovnega obdobja. Hidrogeli so ohranili svoj videz, barvo in vonj več tednov po izdelavi.

Na profilih sproščanja albumina je opazno hitro začetno sproščanje, ki je najverjetneje posledica difuzije albumina s površine hidrogela. S časom se sproščanje upočasni, kar opazimo kot padec naklona krivulje sproščanja. Hitrost sproščanja je po pričakovanjih premo sorazmerna s koncentracijo albumina in obratno sorazmerna s koncentracijo polimera: pri višji koncentraciji albumina je večji koncentracijski gradient, ki poganja difuzijo, pri višji koncentraciji polimera pa je difuzija otežena zaradi večje gostote hidrogela ter manjših por.

Da bi opredelili kinetiko in mehanizem sproščanja, smo eksperimentalne podatke testov sproščanja poskusili opisati z matematičnimi modeli 0. reda, 1. reda in Higuchijevim modelom. Konstruirali smo grafe, in sicer

- **za model 0. reda:** graf kumulativna masa sproščenega albumina v odvisnosti od časa; enačba dobljene premice je $m_t = k_0 * t$ (m_t ...masa sproščenega albumina v času t ; k_0 ...hitrostna konstanta 0. reda; t ...čas)
- **za model 1. reda:** graf logaritem mase nesproščenega albumina v odvisnosti od časa; enačba dobljene premice je $\ln(m_0) - \ln(m_t) = k_1 * t$ ($\ln(m_0) - \ln(m_t)$...naravni logaritem mase nesproščenega albumina; k_1 ...hitrostna konstanta 1. reda; t ...čas)
- **za Higuchijev model:** graf kumulativna masa sproščenega albumina v odvisnosti od $\sqrt{t}$; enačba dobljene premice je $m_t = K_H * \sqrt{t}$ (m_t ...masa sproščenega albumina v času t ; K_H ...Higuchijeva konstanta; $\sqrt{t}$...kvadratni koren časa)

S primerjavo regresijskih koeficientov 0. reda, 1. reda in Higuchijeve kinetike smo ugotovili, da sproščanje iz pripravljenih hidrogelov najbolje sledi Higuchijevemu modelu, kar pomeni,

da je proces sproščanja iz hidrogelov v veliki meri nadzorovan z difuzijo, hitrost sproščanja pa je proporcionalna s $\sqrt{t}$ (Tabela V). To pojasnjuje upad hitrosti sproščanja pri daljših časih sproščanja, saj difuzijska razdalja s časom narašča in koncentracijski gradient pada.

Tabela V: Primerjava regresijskih koeficientov premic za 0. red, 1. red, Higuchijev in Korsmeyer-Peppasov model sproščanja jajčnega albumina iz HEC hidrogelov

c(HEC)	c(alb)	R ² (0.red)	R ² (1.red)	R ² (Higuchi)	R ² (K.Peppas)	n	K
1.5%	0.5	0.7613	0.802	0.9111	0.924	0.67	7.08
	1	0.8057	0.8479	0.9362	0.9093	0.82	4.75
	2	0.8676	0.9268	0.9712	0.9673	0.76	3.67
3%	0.5	0.8268	0.8761	0.9492	0.9975	0.45	9.22
	1	0.8284	0.861	0.9478	0.9977	0.51	7.38
	2	0.9083	0.9507	0.9884	0.9924	0.59	4.65
4.5%	0.5	0.9411	0.9755	0.9827	0.9902	0.43	7.74
	1	0.9458	0.9807	0.9901	0.9956	0.49	6.47
	2	0.9635	0.982	0.9871	0.9959	0.63	3.47

Legenda: c(HEC)- koncentracija HEC v hidrogelu, izražena v m/m %; c(alb)- koncentracija jajčnega albumina v hidrogelu (mg/ml); R²- regresijski koeficienti premic za 0. red, 1.red, Higuchijev in Korsmeyer- Peppasov model; n- difuzijski koeficienti, izračunani s Korsmeyer-Peppasovo enačbo; K- difuzijske konstante, izračunane s Korsmeyer- Peppasovo enačbo

Za bolj natančen opis mehanizma sproščanja pa smo izbrali **Korsmeyer-Peppasov model**, ki ga uporabljamo, kadar na procese sproščanja vplivata Fickova difuzija in viskoelastična relaksacija polimernega sistema (22). Model opisuje naslednja enačba:

$$(m_t/m_\infty) = K_K \cdot t^n \quad \Rightarrow \quad \log(m_t/m_\infty) = \log K_K + n \cdot \log(t)$$

To je potenčni model, kjer je n "difuzijski eksponent" (diffusional exponent). Razmerje m_t/m_∞ predstavlja količino sproščene učinkovine v času t, pri čemer se upošteva zgornjo mejo 60 % sproščene učinkovine (albumina). K_K in n sta konstanti, ki sta povezani z difuzijskim koeficientom in specifičnim transportnim mehanizmom.. Enačba je pogosto uporabljena za opredelitev mehanizma sproščanja učinkovine glede na določitev števila n (Tabela VI).

Tabela VI: Vrednosti števila n , ki ustrezajo različnim vrstam transporta za sisteme z definirano geometrijsko obliko (22)

ploščica	cilinder	krogla	transportni mehanizem
0.50	0.45	0.43	Fickov transport
$0.50 < n < 1$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	"ne-Fickov" transport
1	0.89	0.85	Case II transport

V primeru sproščanja iz našega sistema, slednjega lahko opišemo kot ploščico, saj sproščanje dejansko poteka le z ene površine. Izračunani parametri, K_K in n , so podani v Tabeli V.

Ugotovimo lahko, da sproščanje iz 1.5% HEC hidrogela lahko opredelimo kot "ne-Fickov" transport, kar pomeni, da na sproščanje poleg difuzije vpliva tudi relaksacija polimera oz. erozija hidrogela, ki je v primeru najnižje koncentriranega sistema tudi pričakovana. V primeru bolj koncentriranih hidrogelov (3- in 4.5%) pa je poglavitni mehanizem sproščanja klasična Fickova difuzija ($n \approx 0.5$). Nekoliko odstopata vrednosti difuzijskega eksponenta pri koncentraciji vgrajenega albumina 2 mg/ml, kjer bi že lahko govorili o ne-Fickovem mehanizmu sproščanja. Kaže, da ima pri višji vsebnosti učinkovine v sistemu pri isti koncentraciji polimera na sproščanje ponovno vpliv tudi relaksacija polimernih verig.

5. ZAKLJUČEK

V diplomskem delu smo proučevali hidrokele kot sodobne obloge za vlažno celjenje ran. Namen našega dela je bil izdelava hidrogelov, ki bi ob aplikaciji na kronične rane zagotavljali optimalno vlažnost tkiva, hkrati pa bi omogočili nadzorovano sproščanje proteaznega inhibitorja cistatina in na ta način aktivno sodelovali v procesu celjenja. Kot modelni protein smo v HEC hidrokele vgradili jajčni albumin, ki je po molekulski masi podoben cistatinu. Za vodno fazo smo pri izdelavi hidrogelov uporabili fosfatni pufer PBS, ki predstavlja fiziološko okolje za vgrajeni albumin.

Pri HPLC analizi je elucija neznane spojine z retencijskim časom $t_R \approx 30$ minut vplivala na kakovost kromatografskih vrhov albumina. Ločbo kromatografskih vrhov na bazni liniji smo izboljšali z optimizacijo priprave vzorcev za analizo: vzorce smo filtrirali skozi 0.20 μm filter, čas analize posameznega vzorca pa smo podaljšali z 20 na 45 minut.

Nujni pogoj za dostavo proteinov s hidrogeli je stabilnost proteinov pri pogojih v hidrogelu. Izvedli smo 96-urno testiranje stabilnosti albumina v fosfatnem pufru PBS in prečiščeni vodi, brez in z dodatkom metilparabena. Odstotki detektiranega albumina so bili v obeh medijih nižji v prisotnosti metilparabena. Koncentracija albumina v PBS se je ohranjala s časom, odstotek ohranjenega albumina pa je bil visok. Ravno tako smo testirali stabilnost albumina, vgrajenega v HEC hidrogel: odstotek vgrajenega albumina je bil več kot teden dni po izdelavi hidrogelov dokaj visok, kar pomeni, da predstavljajo hidrogeli varno okolje za ohranitev proteinov znotraj določenega časovnega obdobja. Izdelani hidrogeli so ohranili videz, barvo in vonj več tednov po izdelavi.

Sproščanje jajčnega albumina iz HEC hidrogelov smo spremljali 96 ur, kar sovpada s časom zadrževanja oblog na rani. Izdelali smo hidrokele s tremi koncentracijami polimera (1.5; 3 in 4.5 m/m % HEC) in albumina (0.5; 1 in 2 mg/ml). Eksperimentalni podatki testov sproščanja so se najbolj prilegali Higuchijevemu modelu, kar pomeni, da je proces sproščanja albumina iz pripravljenih hidrogelov v veliki meri nadzorovan z difuzijo, hitrost sproščanja pa proporcionalna s kvadratnim koren timer. Ugotovili smo, da z višanjem koncentracije vgrajenega albumina narašča hitrost sproščanja, kar velja za vse tri koncentracije HEC.

Opazili smo tudi, da je pri višji koncentraciji polimera bolj ovirana difuzija albumina zaradi manjših por hidrogela. Kljub razlikam v masah sproščenega albumina, se odstotki sproščanja pri različnih koncentracijah albumina in HEC niso dosti razlikovali. Z določanjem dejanskih mas vgrajenega albumina v hidrogelih in primerjavo le- teh znotraj paralelk smo ugotovili, da je bil albumin homogeno porazdeljen v hidrogelih. S tem smo potrdili, da tudi ročni način izdelave hidrogelov zagotavlja homogeno porazdelitev proteina.

Z eksperimentalnim delom smo potrdili, da predstavljajo izdelani HEC hidrogeli primeren dostavni sistem za proteinske učinkovine, saj zagotavljajo njihovo stabilnost in omogočajo nadzorovano sproščanje. Nadgradnja raziskovalnega dela obsega med drugim vgraditev cistatina v hidrokele in ugotavljanje, ali vgrajeni cistatin ohrani svojo aktivnost.

6. LITERATURA

1. Mattson Porth C, Gaspard KJ: Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States. 3. izdaja. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2003: 835- 860
2. Gosenca M, Gašperlin M: Membrane za *in vitro* testiranje dermalne absorpcije. Farm Vest 2009; 60: 8- 13
3. Gašperlin M: Transdermalna dostava zdravilnih učinkovin. Farm Vest 2006; 57: 100-105
4. Obreza A: Pregled dermoterapevtikov. Farm Vest 2006; 57: 116- 121
5. Slovenski medicinski slovar
6. Enoch S, Leaper DJ: Basic Science of Wound Healing. Surgery 2005; 23: 37- 42
7. Cegnar M, Baumgartner S, Kristl J: Vlažna oskrba rane s sodobnimi oblogami. Med Razgl 2007; 46: 235- 247
8. Lanza R, Langer R, Vacanti J: Principles of tissue engineering. Elsevier, Amsterdam 2007: 1149- 1161
9. Schmidt R. Topical delivery of α - antichymotrypsin for wound healing. Doktorsko delo, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig- Maximilians- Universität München, 2005
10. Vozelj S, Obermajer N, Kos K: Proteaze in njihovi inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci. Farm Vest 2007; 58: 133- 138
11. Rzychon M, Chmiel D, Stec- Niemczyk J: Modes of inhibition of cysteine proteases. Acta Biochimica Polonica 2004; 51: 861- 873
12. Turk V, Bode W: The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. Febs letters 1991; 285: 213- 219
13. Berdowska I: Cysteine proteases as disease markers. Clinica Chimica Acta 342; 2004: 41- 69
14. Ovington GL: Advances in wound dressings. Clinics in Dermatology 2007; 25: 33-38
15. Rošic R: Proučevanje hidrogelov za vlažno celjenje ran z vgrajenim modelnim proteinom. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009
16. Jorgensen L, Moeller EH, van de Weert M, Nielsen HM, Frokjaer S: Preparing and evaluating delivery systems for proteins. European journal of pharmaceutical sciences 2006; 29: 174- 182

17. Bos GW, Verrijck R, Franssen O, Bezemer JM, Hennink WE, Crommelin DA: Hydrogels for the controlled release of pharmaceutical proteins. *Pharmaceutical Technology* 2001; 110-119
18. Hoare TR, Kohane DS: Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 2008; 49: 1993- 2007
19. Pillai O, Panchagnula R: Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* 2001; 5: 447- 451
20. Guo J, Skinner GW, Harcum WW, Barnum PE: Pharmaceutical applications of naturally occurring water- soluble polymers. *Pharmaceutical Science and Technology Today* 1998; 1
21. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ: *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 4th Ed. American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press 2003: 330- 334
22. Ritger PL, Peppas NA: A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Rel.* 1987; 5: 23-36