

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA BARTOL

**PROUČEVANJE REOLOŠKIH LASTNOSTI HIDROGELOV IZ  
POLIVINILALKOHOLA IZDELANIH Z METODO ZAMRZOVANJA  
IN ODTAJEVANJA**

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA BARTOL

**PROUČEVANJE REOLOŠKIH LASTNOSTI HIDROGELOV IZ  
POLIVINILALKOHOLA IZDELANIH Z METODO ZAMRZOVANJA  
IN ODTAJEVANJA**

**STUDY OF RHEOLOGICAL PROPERTIES OF POLYVINYL  
ALCOHOL HYDROGELS PREPARED BY FREEZING AND  
THAWING**

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

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

Za strokovno pomoč, potrpežljivost in dosegljivost pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem Romani Rošic.

Iskrena hvala tudi Tatjani Hrovatič za pomoč v laboratoriju.

Za strokovno pomoč in spodbudo pri delu se zahvaljujem izr. prof. dr. Saši Baumgartner.

Zahvala tudi družini in prijateljem za vse besede podpore med celotnim študijem.

Maja Bartol

Ljubljana, junij 2011

### **Izjava**

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

Diplomantov lastnoročni podpis

### **Predsednik diplomske komisije:**

- izr. prof. dr. Irena Mlinarič Raščan

### **Člani diplomske komisije:**

- izr. prof. dr. Saša Baumgartner
- asist. dr. Janez Mravljak

# VSEBINA

|                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. POVZETEK.....</b>                                                                             | <b>1</b>  |
| <b>2. SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>                                                                     | <b>5</b>  |
| <b>3. UVOD.....</b>                                                                                 | <b>6</b>  |
| 3.1. <i>HIDROGELI .....</i>                                                                         | <i>6</i>  |
| 3.1.1. <i>Fizikalne lastnosti hidrogelov .....</i>                                                  | <i>7</i>  |
| 3.1.2. <i>Reološko vrednotenje hidrogelov .....</i>                                                 | <i>9</i>  |
| 3.1.3. <i>Proučevanje reološkega obnašanja viskoelastičnih snovi.....</i>                           | <i>10</i> |
| 3.1.3.1. <i>Rotacijski reometri in viskozimetri.....</i>                                            | <i>11</i> |
| 3.1.3.2. <i>Oscilacijski testi .....</i>                                                            | <i>13</i> |
| 3.1.3.3. <i>Pomen rezultatov reološkega vrednotenja hidrogelov .....</i>                            | <i>15</i> |
| 3.1.4. <i>Uporaba hidrogelov .....</i>                                                              | <i>16</i> |
| 3.1.5. <i>Primernost hidrogelov za dostavo proteinov .....</i>                                      | <i>17</i> |
| 3.2. <i>POLIVINILALKOHOL (PVA).....</i>                                                             | <i>17</i> |
| 3.2.1. <i>Fizikalno kemijske lastnosti PVA .....</i>                                                | <i>17</i> |
| 3.2.2. <i>Biofarmacevtske lastnosti PVA .....</i>                                                   | <i>21</i> |
| 3.2.3. <i>Uporabnost PVA .....</i>                                                                  | <i>22</i> |
| 3.3. <i>HIDROGELI IZ PVA .....</i>                                                                  | <i>22</i> |
| 3.4. <i>PVA HIDROGELI NAREJENI Z METODO ZAMRZOVANJA IN ODTAJEVANJA<br/>POLIMERNE RAZTOPINE.....</i> | <i>23</i> |
| 3.4.1. <i>Mehanizem nastanka hidrogelov.....</i>                                                    | <i>24</i> |
| 3.4.2. <i>Lastnosti PVA hidrogelov narejenih z metodo zamrzovanja in odtajevanja .....</i>          | <i>26</i> |
| <b>4. NAMEN DELA .....</b>                                                                          | <b>28</b> |
| <b>5. EKSPERIMENTALNI DEL.....</b>                                                                  | <b>29</b> |
| 5.1. <i>MATERIALI .....</i>                                                                         | <i>29</i> |
| 5.2. <i>NAPRAVE .....</i>                                                                           | <i>30</i> |
| 5.3. <i>POSTOPKI IN METODE.....</i>                                                                 | <i>30</i> |
| 5.3.1. <i>Priprava izotoničnega fosfatnega pufra s pH 7 (PBS).....</i>                              | <i>30</i> |
| 5.3.2. <i>Priprava hidrogelov .....</i>                                                             | <i>30</i> |
| 5.3.3. <i>Vrednotenje mehanskih lastnosti hidrogelov.....</i>                                       | <i>31</i> |
| 5.3.4. <i>Hidrogeli z vgrajenim albuminom.....</i>                                                  | <i>32</i> |
| 5.3.5. <i>Preskus sproščanja albumina iz hidrogela .....</i>                                        | <i>33</i> |
| 5.3.5.1. <i>Priprava umeritvene premice za albumin .....</i>                                        | <i>33</i> |
| 5.3.5.2. <i>Izdelava mobilne faze in vrednotenje albumina s HPLC.....</i>                           | <i>33</i> |
| 5.3.5.3. <i>Razvoj modela za izvedbo sproščanja jajčnega albumina iz hidrogela.....</i>             | <i>34</i> |
| 5.3.6. <i>Liofilizacija hidrogelov.....</i>                                                         | <i>35</i> |
| 5.3.7. <i>Rehidracija hidrogelov.....</i>                                                           | <i>36</i> |

|           |                                                                                                  |           |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3.8.    | <i>Merjenje gostote liofiliziranih hidrogelov</i> .....                                          | 36        |
| 5.3.8.1.  | Merjenje navidezne gostote s Hubbardovim piknometrom .....                                       | 36        |
| 5.3.8.2.  | Določanje gostote s helijevim poknometrom .....                                                  | 37        |
| 5.3.9.    | <i>Izračun poroznosti hidrogelov</i> .....                                                       | 38        |
| 5.3.10.   | <i>Izdelava nanodelcev</i> .....                                                                 | 39        |
| <b>6.</b> | <b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....                                                               | <b>40</b> |
| 6.1.      | <i>REZULTATI REOLOŠKEGA VREDNOTENJA HIDROGELOV</i> .....                                         | 40        |
| 6.1.1.    | Vpliv koncentracije PVA.....                                                                     | 41        |
| 6.1.2.    | Vpliv števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja.....                                             | 45        |
| 6.1.3.    | Vpliv molekulske mase PVA.....                                                                   | 46        |
| 6.1.4.    | <i>Predpostavljen vpliv razlik v reoloških parametrih na sproščanje modelnega proteina</i> ..... | 47        |
| 6.2.      | <i>SPROŠČANJE ALBUMINA IZ HIDROGELOV</i> .....                                                   | 48        |
| 6.2.1.    | <i>Določitev enačbe umeritvene premice</i> .....                                                 | 48        |
| 6.2.2.    | <i>Rezultati testa sproščanja albumina iz hidrogelov</i> .....                                   | 49        |
| 6.2.2.1.  | Vpliv števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja hidrogelov .....                                 | 50        |
| 6.2.2.2.  | Vpliv koncentracije polivinil alkohola na sproščanje albumina iz hidrogelov .....                | 56        |
| 6.2.2.3.  | Vpliv molekulske mase polivinil alkohola na sproščanje albumina iz hidrogelov .....              | 60        |
| 6.2.2.4.  | Fickova kinetika sproščanja jajčnega albumina.....                                               | 66        |
| 6.2.3.    | <i>Nabrekanje hidrogelov med testiranjem sproščanja</i> .....                                    | 67        |
| 6.3.      | <i>VREDNOTENJE HIDROGELOV PO LIOFILIZACIJI</i> .....                                             | 69        |
| 6.3.1.    | <i>Liofilizacija hidrogelov iz Mowiola® 10-98</i> .....                                          | 69        |
| 6.3.2.    | <i>Izračun poroznosti hidrogelov iz Mowiola® 10-98</i> .....                                     | 70        |
| 6.4.      | <i>REZULTATI IZDELAVE NANODELCEV</i> .....                                                       | 72        |
| <b>7.</b> | <b>SKLEP</b> .....                                                                               | <b>74</b> |
| <b>8.</b> | <b>LITERATURA</b> .....                                                                          | <b>75</b> |

## 1. POVZETEK

Vedno več je proteinskih in peptidnih učinkovin, ki potrebujejo za svojo aktivnost ustrezno okolje. Kot dostavni sistemi proteinskih učinkovin se nam ponujajo hidrogeli, saj vodno okolje le-teh dobro simulira fiziološko okolje, poleg tega pa omogočajo ohranjanje native strukture proteinov in jih varujejo pred encimsko razgradnjo. Hidrogeli iz sinteznega polimera polivinilalkohola (PVA) izdelani z metodo zamrzovanja in odtajevanja imajo pred ostalimi takšnimi sistemi izrazito prednost. Omenjen postopek izdelave namreč ne potrebuje premreževalcev za tvorbo čvrstega obstojnega hidrogela, temveč prihaja med zamrzovanjem in odtajevanjem polimerne raztopine do tvorbe vodikovih vezi med hidroksilnimi skupinami PVA ter tvorbe kristalizacijskih področij. Hidrogeli tako ne vsebujejo primesi, ki bi v organizmu lahko delovale toksično ali pa vplivale na aktivnost vgrajenih proteinskih učinkovin.

Namen diplomske naloge je bila izdelava in vrednotenje hidrogelov iz PVA izdelanih z metodo zamrzovanja in odtajevanja, ki bodo omogočali nadzorovano sproščanje modelne proteinske učinkovine. Pri izdelavi smo spreminjali molekulsko maso PVA, koncentracijo polimera ter število ciklov zamrzovanja in odtajevanja, nato pa proučevali njihov vpliv na reološke lastnosti in sproščanje modelnega proteina (jajčnega albumina).

Reološko vrednotenje smo izvedli z metodo oscilacijske reometrije in proučevali vpliv različnih tehnoloških in formulacijskih parametrov na elastični ( $G'$ ) in plastični modul ( $G''$ ). Ugotovili smo, da večanje števila ciklov, večanje molekulske mase in višanje koncentracije polimera privede do porasta obeh modulov ( $G'$  in  $G''$ ).  $G'$  je pri večini gelov precej konstanten, s spreminjanjem frekvence deformacije se ne spreminja, kar pomeni, da so vzorci premreženi v tridimenzionalno mrežo, ki je značilna za čvrsto gelsko strukturo. 5% hidrogeli so zelo šibki, saj je koncentracija polimera prenizka za tvorbo kristalizacijskih področij že v prvem ciklu zamrzovanja in odtajevanja.

Iz vseh izdelanih hidrogelov smo izvedli sproščanje jajčnega albumina. Sproščanje je trajalo 96 ur, koncentracijo albumina v vzorcih pa smo vrednotili z metodo HPLC. Ugotovili smo, da parametri izdelave nimajo izrazitega vpliva na sproščanje jajčnega albumina, kar je v nasprotju z našimi pričakovanji ter rezultati reološkega testiranja. Pri vseh hidrogelih se je na koncu sprostila približno enaka količina albumina. Razliko smo opazili le v začetnem porastu koncentracije (t.i. »burst« efektu), ki se z večanjem števila

ciklov zamrzovanja in odtajevanja zmanjšuje, prav tako tudi z višanjem koncentracije PVA, z izjemo pri 5% hidrogelih, kjer z večanjem števila ciklov ostaja konstantno precej visok. Rezultati so pokazali, da višja molekulska masa PVA nima enotnega vpliva na sproščanje jajčnega albumina, ampak je vpliv odvisen tudi od koncentracije PVA. Višja molekulska masa nekoliko upočasni sproščanje albumina le pri 15% hidrogelih.

Izdelane hidrogele smo tudi liofilizirali. Ugotovili smo, da ne moremo popolnoma odstraniti vode pri bolj čvrstih hidrogelih (višja koncentracija polimera in večje število ciklov). Najverjetneje je voda močno vezana v kristalizacijska področja med polimerne verige PVA in je pri izbranih pogojih ni možno odstraniti. Prav tako smo opazili, da na površini hidrogela nastane suha plast v obliki filma, ki lahko nato predstavlja bariero za izhlapevanje vode iz notranjosti hidrogela. Posušnim hidrogelom smo nato izmerili poroznost, ki se zmanjšuje z večanjem koncentracije polimera, število ciklov pa na poroznost ni imelo nekega trendnega vpliva. K takšnim rezultatom je verjetno vplivalo tudi dejstvo, da vzorci niso bili dovolj suhi, voda pa meritve moti.

Nadalje smo poskusili izdelati tudi PVA nanodelce z emulzijsko metodo kombinirano z zamrzovanjem in odtajevanjem, vendar pa kljub intenzivnemu raziskovanju in številnim poskusom nismo bili uspešni. Ker menimo, da je metoda obetavna, saj teoretično omogoča skorajda neinvazivno vgradnjo proteinske molekule v nanodelce, bi bilo smiselno s poskusi nadaljevati in poiskati ustrezne pogoje za izdelavo.

## ABSTRACT

Peptide and protein active substances need proper environment for their activity. Hydrogels represent promising delivery system for protein drugs because of their high water content which closely resembles their physiological environment. Hydrogels also enable to preserve native conformation of proteins and protect them from enzymatic degradation. Hydrogels from synthetic polymer polyvinyl alcohol (PVA) prepared by freezing and thawing have certain advantage before other similar systems. Freezing and thawing preparation method doesn't need crosslinking agents for firm and robust hydrogel formation. During freezing and thawing of polymer solution hydrogen bonding between hydroxyl groups of PVA occurs and crystallites form. Hydrogels therefore contain no impurities, which could act toxic in human organism or have affect on activity of protein drugs.

The purpose of this thesis was preparation and evaluation of PVA hydrogels, prepared by freezing and thawing, which will enable controlled release of model protein drug. Different molecular weights of PVA, polymer concentration and number of freezing and thawing cycles were investigated. The affect of these parameters on rheological properties and release of model protein (albumin from chicken egg white) were then examined.

Rheological evaluation was performed by oscillation rheometry. The effect of technological and formulation parameters on storage ( $G'$ ) and loss ( $G''$ ) modulus were studied. It was found out that increasing the number of freezing and thawing cycles, molecular weight and polymer concentration leads to increase of both storage and loss modulus.  $G'$  of most investigated hydrogels remains constant and it doesn't change with changing of angular frequency. This means that the samples are crosslinked in three-dimensional network, which is characteristic of firm gel structure. 5% hydrogels have a very weak structure, because the concentration of polymer is too low for crystallites formation especially if they are exposed only to one freezing and thawing cycle.

Release of egg white albumin was tested from all prepared hydrogels. The test lasted 96 hours and the amount of released protein was evaluated with HPLC method. It was determined that the parameters of preparation of hydrogels have no significant effect on release of protein, which is contrast with our expectations and results from rheological properties testing. With all tested hydrogels approximately the same amount of albumin



was released. The difference in burst release was noticed. Burst release diminishes with increasing the number of freezing and thawing cycles, molecular weight and concentration of PVA. With 5% hydrogels burst release is high regardless of the number of freezing and thawing cycles. The results have shown that higher molecular weight of PVA slightly slows down the release of albumin with 15% hydrogels.

Hydrogels were also freeze-dried. It was determined, that it is impossible to remove all water from firmer hydrogels (higher number of freezing and thawing cycles and molecular weight). Most likely water is very strongly bound to crystallites and it is impossible to remove under selected conditions. It was also noticed, that dense dry layer was formed on the surface of hydrogel, which enabled water to evaporate from the core of the hydrogel. Porosity of freeze-dried hydrogels was then measured. Porosity decreases with higher concentration of PVA, but the number of freezing and thawing cycles hasn't got a uniform impact on porosity. The main reason for this result is perhaps that the hydrogels weren't completely dry.

In the last part we tried to prepare PVA nanoparticles with emulsification method combined with freezing and thawing. In spite of intense research and number of trials the preparation was not successful. We believe that the method is promising, because it theoretically enables almost non-invasive incorporation of proteins into nanoparticles. It would be reasonable to continue the research and find appropriate conditions for nanoparticle preparation.

## 2. SEZNAM OKRAJŠAV

$G'$ : elastični modul

$G''$ : plastični oz. viskozni modul

H vezi: vodikove vezi

LVE: območje linearne viskoelastičnosti

MM: molekulska masa

Mowiol<sup>®</sup>: polivinil alkohol proizvajalca Sigma-Aldrich

OH skupina: hidroksilna skupina

PBS: fosfatni pufer s pH 7

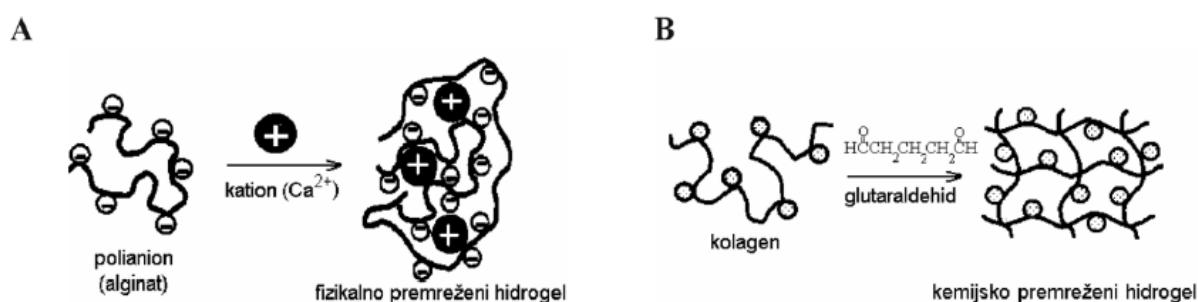
PVA: polivinilalkohol

### 3. UVOD

Hidrogeli so tridimenzionalne premrežene strukture hidrofilnih polimerov, ki v svojo strukturo sprejmejo večje količine vode. Zaradi svojih številnih prednosti in fiziološke kompatibilnosti so hidrogeli široko uporabni na najrazličnejših biomedicinskih področjih, med njimi pri razvoju dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin, izdelavi umetnih tkiv ter sodobnih oblog za vlažno celjenje ran. Polivinilalkohol (PVA) je le eden izmed sinteznih polimerov, ki se uporablja v ta namen. Njegove hidrokele sicer lahko pripravimo na več načinov, vendar pa je posebno zanimiv postopek zamrzovanja in odtajevanja, ki izdelanemu hidrogelu poda edinstvene lastnost (1).

#### 3.1. HIDROGELI

Hidrogeli so plastični geli, ponavadi sestavljeni iz štirih osnovnih komponent in sicer polimera, ki je lahko sinteznega, polysinteznega ali naravnega izvora, vodne faze, vlažilca ter konzervansa (2, 3). V vodi in fizioloških tekočinah nabrekajo, a se pri tem ne raztapljajo. Netopnost in fizikalna integriteta sta posledica prisotnih kemijskih (ireverzibilni hidrogeli) ali fizikalnih (reverzibilni hidrogeli) premreženj med polimernimi verigami. Povezava med polimernimi verigami je pri kemijskih premreženjih kovalentne narave, pri fizikalnih pa so verige medsebojno povezane s šibkimi van der Waalsovimi ali vodikovimi vezmi, hidrofobnimi interakcijami oziroma pride le do prepletov verig (Slika 1) (1).



Slika 1: Primer tvorbe interakcij v fizikalno premreženem alginatnem gelu (A) in kemijsko premreženje kolagena z glutaraldehydom (B) (4).

Polimeri tvorijo skupaj z vodo v hidrogelih trdno gelsko mrežo, ki ima določene lastnosti tekočin. Ta omogoča prepustnost snovi v hidrogelu, ki je posledica ujete vode v tridimenzionalni mreži polimera. Na začetku hidratacije najprej pride do vezave vode na

polimer zaradi močnih interakcij med hidrofilnimi skupinami polimera in vodo (primarno vezana voda). Zaradi tega gel nabreka in izpostavi se hidrofobne skupine, ki prav tako interagirajo z vodo (sekundarna vezana voda). Primarna in sekundarna vezana voda skupaj predstavljata celotno vezano vodo. Hidrogel nato zaradi osmotske sile vsrka dodatno vodo, ki zapolni prostore med verigami in pore. To vodo imenujemo prosta voda, ki ni vezana ter lahko zmrzuje. Nadaljnemu nabrekanju nasprotujejo kovalentne ali fizikalne povezave v gelski mreži in predstavljajo elastično silo, ki omejuje nabrekanje. Na ta način gel doseže ravnotežno stanje nabrekanja. Končna količina vode je v splošnem odvisna od hidrofilnosti polimera in stopnje premreženja (5).

### **3.1.1. Fizikalne lastnosti hidrogelov**

Lastnosti hidrogela so tesno povezane z njegovo strukturo, zato je potrebno oba podatka vedno podajati skupaj. Strukturo hidrogela definira izbira polimera ter uporabljeni premreževalec. Struktura pomembno vpliva na stopnjo hidratacije, mehanske lastnosti, permeabilnost in biokompatibilnost hidrogela (3). Izbrane fizikalne lastnosti hidrogelov, pomembne za nadaljnjo razumevanje eksperimentalnega dela, so podrobneje opisane v nadaljevanju.

#### Nabrekanje

Nabrekanje pove, koliko vode oz. raztopine je hidrogel sposoben absorbirati, le-to pa določa tako izbira polimera in gostota premreženja kot tudi temperatura, ionska moč ter pH medija (3). Tako na primer bolj hidrofilen polimer sprejme več vode, prav tako tudi polimer z manjšo gostoto premreženja. Stopnjo nabrekanja običajno določamo z gravimetrično analizo (3).

#### Sol-gel prehod

Polimerne raztopine lahko prehajajo iz sol stanja (koloidna raztopina) v gel stanje, pri čemer je prehod odvisen od posameznega polimera, njegove koncentracije v raztopini in temperature. Kritična koncentracija geliranja je koncentracija, pod katero gel pri določenih eksperimentalnih pogojih ne nastane. Sol-gel prehod določamo s termogravimetričnimi metodami, kot je diferenčna dinamična kalorimetrija (3).

### Spremembe hidrogela povezane s staranjem

Struktura večine hidrogelov ne predstavlja ravnotežnega stabilnega stanja, zato s časom stremljeva k vzpostavitvi le-tega. Pri tem pride do sprememb v mikrostukturi gela, nekovalentne povezave v hidrogelu se porušijo in preuredijo. Lahko pride do več različnih pojavov, kot so polimerizacija (dodatno povezovanje verig polimera, predvsem zaradi velikega števila prostih hidroksilnih skupin, kot npr. pri silikatnih gelih), sinereza (skrčenje polimerne mreže in iztisnjenje tekočine iz por), zorenje (*ang. ripening*, raztapljanje in ponovno obarjanje zaradi razlik v topnosti) (6).

### Mehanske lastnosti

Mehanske lastnosti hidrogela so odvisne predvsem od njegove strukture. Pogosto so ravno slabe mehanske lastnosti tiste, ki omejujejo širšo uporabo hidrogelov kot na primer tkivnih nadomestkov. Velika količina absorbirane vode je sicer zelo pomembna pri permeabilnosti in biokompatibilnosti hidrogelov, vendar pa pogosto prav ta negativno vpliva na njihove mehanske lastnosti - nastala hidrogelska struktura je šibka. Dodatno na mehanske lastnosti vpliva tudi stanje vode v hidrogelu. Tako je z večjim deležem proste vode mehanska trdnost hidrogela zmanjšana, saj ta voda deluje kot plastifikator in zniža temperaturo steklastega prehoda hidrogela, kar pomeni povečano mobilnost polimernih verig (3).

Na mehanske lastnosti pomembno vpliva gostota premreženj polimera v hidrogelu. Če so premreženja redka, so polimerne verige med temi premreženji dolge in fleksibilne, zato se material obnaša elastično. Če pa so premreženja gosta, so verige med posameznimi točkami premreženja kratke in bolj rigidne, zato tudi hidrogel izkazuje trdnejšo strukturo (3).

### Reološke lastnosti

Reološke lastnosti hidrogelov so močno odvisne tako od lastnosti posameznega polimera in starosti vzorca kot tudi od eksperimentalnih pogojev, zato je njihovo vrednotenje zahtevno. V splošnem viskoznost hidrogelov narašča z višanjem koncentracije polimera, njegove molekulske mase ter gostote premreženja. Na navidezno viskoznost vplivajo tudi dodatki elektrolitov, topil oziroma netopil ter temperatura, ki v odvisnosti od interakcij med molekulami polimera in topila viskoznost poveča ali zmanjša (3).

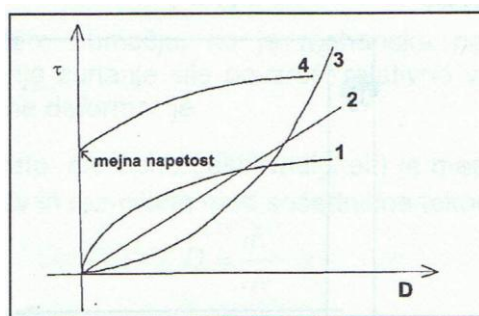
### 3.1.2. Reološko vrednotenje hidrogelov

Izraz reologija izhaja iz grškega jezika in je sestavljen iz dveh besed: RHEOS, kar pomeni tok, in LOGOS, kar pomeni veda. Reologija je veda o toku, deformacijah in preoblikovanju snovi in snovnih sistemov pod vplivom različnih strižnih sil. Preiskave reoloških lastnosti snovi segajo od pravih kapljev in preko poltrdnih teles vse do trdnih snovi (7).

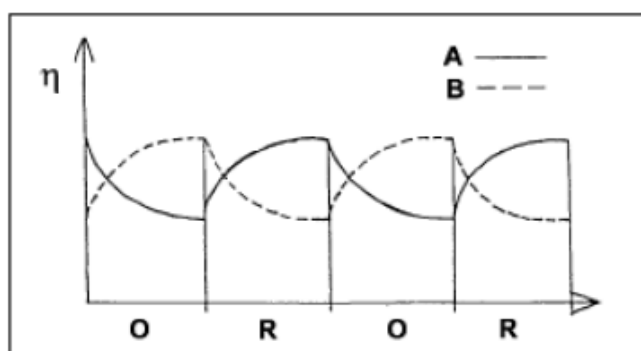
Najlažje prikažemo pestrost tokovnega obnašanja sistemov z reogrami, kjer predstavimo odvisnost strižne napetosti ( $\tau$ ) od strižne hitrosti ( $D$ ), druga možnost, t.i. viskoznostni reogram, pa je prikaz odvisnosti viskoznosti ( $\eta$ ) od strižne hitrosti ( $D$ ). Viskoznost predstavlja notranjo upornost tekočin pri pretakanju (7).

Sisteme, ki jih reološko preučujemo, v grobem delimo na (7):

- **newtonske ali idealne**, kjer je viskoznost lastnost sistema in odvisna le od temperature in atmosferskega tlaka, neodvisna pa od delovanja sile na sistem (smeri, jakosti in časa mehanske obremenitve) in njenega trajanja. Med te sodijo idealne tekočine (voda, mineralna olja...). Z naraščajočo temperaturo viskoznost pada zaradi povečanega Brownovega gibanja osnovnih molekul. Čim bolj je tekočina viskozna, tem bolj je temperaturno občutljiva (7).
- **nenewtonske ali realne**, ki pri konstantnem tlaku in temperaturi nimajo konstantne viskoznosti, ampak je le-ta odvisna od jakosti in smeri mehanske sile, ki deluje na njih. Ker imajo v nekaterih primerih tudi časovno odvisno strukturo, lahko sisteme dodatno razdelimo na časovno odvisne in časovno neodvisne. Med časovno neodvisne sisteme, katerih viskoznost je odvisna le od jakosti delovanja strižne sile, sodijo pseudoplastični, plastični in dilatantni sistemi (Slika 2). Če pa se viskoznost sistema pri konstantnih strižnih pogojih spreminja tudi s časom in smerjo delovanja sile, take sisteme imenujemo časovno odvisne. Med te sodijo tiksotropni in reopeksni sistemi (Slika 3).



Slika 2: Reogrami za Newtonske (2), psevdoplastične (1), dilatantne (3) in plastične (4) sisteme (7).



Slika 3: Odvisnost viskoznosti od časa v obremenitveni fazi-O in razbremenitveni fazi-R za tiksotropen sistem(A) in za reopeksni sistem (B)(7).

### 3.1.3. Proučevanje reološkega obnašanja viskoelastičnih snovi

V strukturiranih tekočinah pri pogojih mirovanja notranja mikrostruktura tekočine zavzame energetsko najugodnejše stanje (8). Pri deformaciji teh tekočin termodinamske sile v tekočini težijo k povrnitvi mikrostrukture v stanju mirovanja (8). Proces je podoben raztegovanju vzmeti iz začetne lege, kar se odraža v shrambi energije, natančneje v elastični sili, ki deluje v smeri povrnitve v začetno lego. Ta oblika energije je izvor elastičnosti v strukturiranih tekočinah. V fazi mirovanja predstavljajo izvor elastičnih sil v mikrostrukturi na primer izolirane linearne ali razvejane polimerne verige z naključno nedeformirano konformacijo ali ne-raztegnjene prepletene polimerne verige. Ko na takšno strukturirano tekočino delujemo s silo, se le-ta sicer deformira, vendar pa se po prenehanju obremenitve struktura povrne v prvotno obliko za tisti delež, ki pripada elastičnosti (8). Delež energije, ki pripada viskoznosti, se porabi za plastično preoblikovanje ter zaradi viskoznega trenja, pri čemer se ta energija pretvori v toploto (8).

Vrednotenje mehanskih lastnosti viskoelastičnih snovi je odvisno od tega, za kaj nameravamo uporabiti rezultate in od razpoložljive opreme. Za ponovljivo določitev viskoelastičnih lastnosti je pomembno, da meritve izvajamo pri pogojih majhnih strižnih deformacij. Na ta način namreč lahko zagotovimo, da se bo snov na strižno silo odzvala v območju linearnega viskoelastičnega odziva (LVE), reološke količine pa bodo relativno enostavno merljive. Namen meritev je določiti delež viskoznega in elastičnega doprinosa k viskoelastičnemu odzivu tekočine ali poltrdne snovi, zato jih izvajamo pri t. i. nedestruktivnih strižnih pogojih. Uporabimo lahko dve merilni tehniki (8):

- Dinamični oz. oscilatorni testi
- Statični testi

Izbira ustreznega instrumenta je odvisna od lastnosti preučevane snovi ter namena reološkega preučevanja (kontrola kakovosti, določanje procesnih parametrov, reološka karakterizacija snovi z namenom proučevanja strukture). Kadar delamo z instrumenti, s katerimi lahko vrednost strižnih hitrosti oziroma strižnih napetosti izračunamo s pomočjo merljivih in nastavljivih količin ter s pomočjo geometrijskih karakteristik izbranega senzorskega sistema - absolutni instrumenti (rotacijski in kapilarni reometri), je potrebno izpolnjevati določene pogoje, da pridobimo pravilne rezultate, in sicer (8):

- Meritev je potrebno izvajati pri pogojih laminarnega toka
- Med meritvijo moramo zagotoviti izotermne pogoje
- Treba je preprečiti, da bi prišlo do zdrsa na meji tekočina-trdna snov
- Treba je zagotoviti pogoje enostavnega striga in se izogniti robnim vplivom

Če ne zadostimo tem pogojem v primeru turbulentnega toka izmerimo previsoko strižno napetost pri dani strižni hitrosti (9). Temperatura, kot smo videli v točki 3.1.2., prav tako vpliva na meritve viskoznost. Zdrsavanje na mejni ploskvi pa povzroči nihanje vrednosti merjenih parametrov.

#### 3.1.3.1. Rotacijski reometri in viskozimetri

Rotacijski reometri in viskozimetri so instrumenti, ki se zelo pogosto uporabljajo za proučevanje reološkega obnašanja nenewtonskih tekočin. Merilni sistem je sestavljen iz dveh delov, od katerih lahko eden miruje in drugi rotira, lahko pa tudi oba rotirata. Glede na način merjenja poznamo rotacijske reometre z nastavljivo strižno hitrostjo ter rotacijske reometre z nastavljivo strižno napetostjo (8). Pri reometrih z nastavljivo strižno napetostjo



merimo strižno deformacijo ali strižno hitrost. Takšni reometri predstavljajo novejšo generacijo rotacijskih reometrov, ki v splošnem omogočajo natančnejše meritve v širšem območju delovanja striga (8).

Pri tem sistemu rotirajoči del senzorskega sistema poganja motor, katerega vrednost navora je predhodno nastavljena. Električni vnos moči je linearno povezan z vrednostjo navora. Odpor vzorca med senzorskim sistemom proti uporabljeni strižni napetosti pa povzroča, da se rotor odmakne od začetne lege ali da se vrti z določeni kotno hitrostjo. Reometer z nastavljivo strižno napetostjo omogoča tudi oscilacijsko merjenje z nastavljivo strižno napetostjo ali z nastavljivo strižno deformacijo (8).

Primeren senzorski sistem rotacijskega reometra, ki omogoča uspešno merjenje reoloških lastnosti tekočine, izberemo glede na vrsto tekočine (viskoznost, sestavo, stopnjo strukturiranosti...), pogoje merjenja (destruktivni ali nedestruktivni pogoji merjenja), temperaturno območje ter posamezne dodatne zahteve (npr. inertna atmosfera, povišan tlak).

Osnovne zveze, ki opisujejo reološko obnašanje tekočin, je mogoče definirati, če meritve izvajamo v območju linearnega strižnega toka, saj so takrat deformacijski in tokovni pogoji enostavni in kontrolirani. Za enostavni strižni tok velja, da se strižna hitrost v reži senzornega sistema spreminja linearno z razdaljo. V praksi lahko enostavni strižni tok dosežemo z več senzorskimi sistemi (Slika 4) (10):

➤ Senzorski sistem dveh vzporednih plošč (Slika 4A)

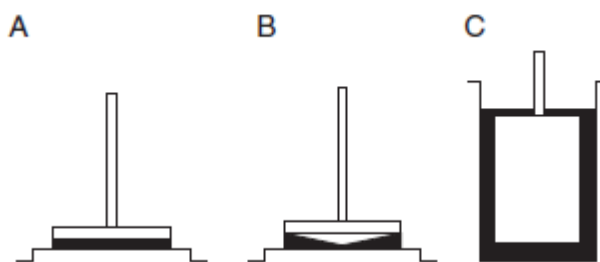
Vzorec se nahaja v reži med dvema ploščama z določenim polmerom ter razdaljo med njima. Od sistema stožec-plošča se razlikuje po tem, da se strižna hitrost spreminja po polmeru plošče in s tem po celotnem vzorcu. Iz merjenega oz. nastavljenega navora na ploščo, ki je posledica upora tekočine pri rotaciji ene od plošč, izračunamo strižno napetost na obodu plošče ob znanih dimenzijah (8). Velikost reže med ploščama je nastavljiva, zato lahko preprosto določamo različna območja strižnih hitrosti oziroma strižne deformacije. Ta senzorski sistem se uporablja za merjenje visoko viskoznih tekočin in poltrdnih snovi (10).

➤ Senzorski sistem stožca in plošče (Slika 4B)

Vzorec se nahaja v reži med stožcem in ploščo. Poglavitne prednosti tega sistema so enostavnost doziranja vzorca in čiščenja merilnega sistema po opravljeni meritvi ter majhne količine potrebnega vzorca. Za majhne kote stožca je strižna hitrost po celotni reži enaka, prav tako tudi strižna napetost (10).

➤ Senzorski sistem koaksialnih valjev (Slika 4C)

Preučevana tekočina se nahaja med valjema določene debeline in višine, pri čemer eden izmed njiju (notranji ali zunanji) rotira z določeno kotno hitrostjo, medtem ko drugi miruje. Iz navora na notranji valj zaradi notranjega trenja tekočine pri pogojih strižnega toka ali strižne deformacije pri določeni strižni hitrosti lahko izračunamo strižno napetost (10).



*Slika 4: Senzorski sistemi pri rotacijskih reometrih: A- Sistem vzporednih plošč, B- Sistem stožec – plošča, C- Sistem koaksialnih valjev. Črno obarvanje predstavlja merjeni vzorec (10).*

#### 3.1.3.2. Oscilacijski testi

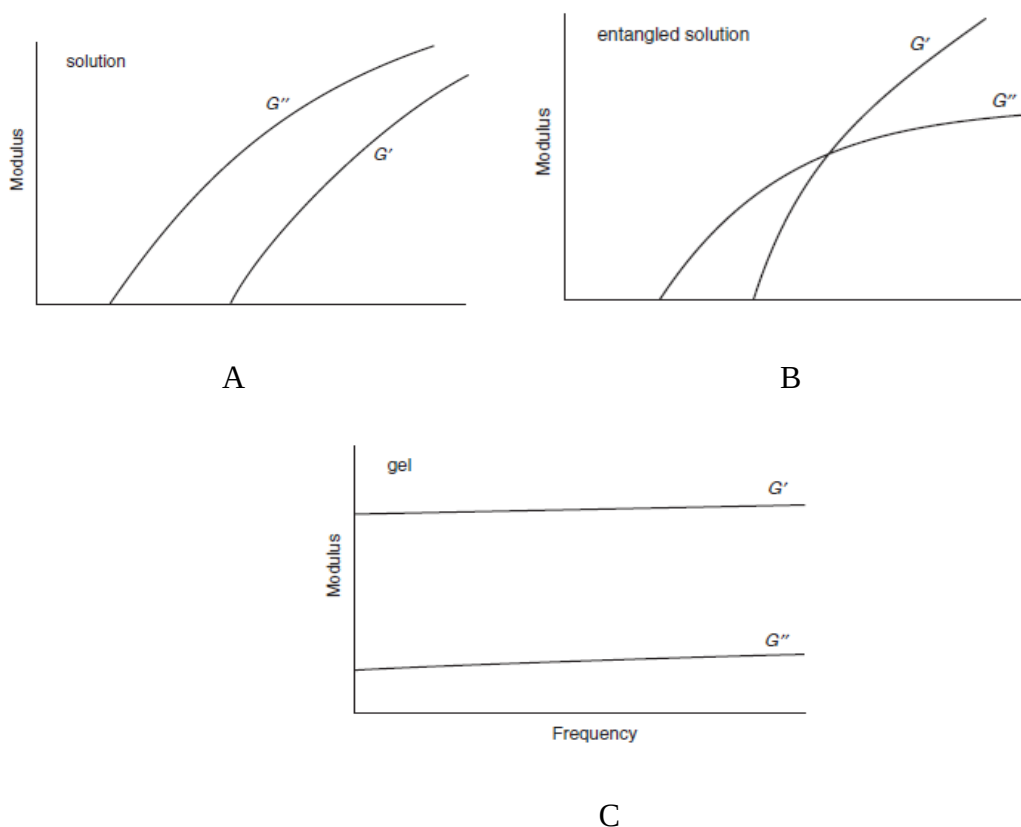
V nasprotju z meritvami pri stacionarnih tokovnih pogojih se pri oscilacijskih testih strižna deformacija spreminja sinusno s časom z določeno frekvenco in amplitudo. Oscilatorno testiranje z dovolj majhno amplitudo strižne deformacije omogoča določiti viskozno in elastično komponento viskoelastične snovi pri nedestruktivnih strižnih pogojih (8). Ker so viskoelastične lastnosti odvisne od časovnega poteka strižne deformacije, lahko s spreminjanjem frekvence oscilacije enostavno spreminjamo časovni potek strižne deformacije v določenem frekvenčnem intervalu.

Pri oscilatornih testih predstavlja nastavljena strižna deformacija vsiljeno nihanje. Odziv na deformacijo je periodično nihanje strižne napetosti z določeno frekvenco ( $\omega$ ) in amplitudo ( $\gamma$ ). Idealno trdna snov se odzove le elastično (kot vzmet), to je v fazi z deformacijo, medtem ko je viskozni odziv zamaknjen za  $90^\circ$ . Doprinos odziva v fazi (sinusni del) predstavlja elastično komponento, doprinos odziva izven faze (kosinusni del) pa predstavlja viskozno komponento viskoelastičnega odziva (8). Celoten odpor na vsiljeno sinusno deformacijo je določen s **kompleksnim modulom ( $G^*$ )**, ki je sestavljen iz elastičnega (realna komponenta) in plastičnega modula (imaginarna komponenta). Je kvocient amplitud strižne napetosti in strižne deformacije pri periodičnih ali oscilatornih testih. **Elastični modul ( $G'$ )** je modul shranjene energije, ki se obnovi pri vsakem ciklu aplikacije deformacije in je v fazi s strižno deformacijo. **Viskozni ali plastični modul ( $G''$ )** pa je modul energetskih izgub v obliki toplote, ki je izven faze z vsiljeno strižno deformacijo. Pomemben parameter je **fazni zamik ( $0^\circ < \delta < 90^\circ$ )**, katerega tangens pomeni razmerje med  $G''$  in  $G'$ . **Kompleksna viskoznost ( $\mu^*$ )** predstavlja celoten odpor snovi proti toku. Je kvocient kompleksnega strižnega modula in frekvence pri periodičnih ali oscilatornih testih ( $\mu^* = G^* / \omega$ ). Vse te dinamične količine pa lahko v območju linearnega viskoelastičnega odziva določimo tako z reometrom z nastavljivo strižno hitrostjo kot z reometrom z nastavljivo strižno napetostjo (8).

Frekvenčna odvisnost dinamičnih modulov  $G'$  in  $G''$  prikazuje odziv materiala na periodično delovanje strižne deformacije. V praksi smo pogosto omejeni na izvajanje meritev v ožjem frekvenčnem območju, kar je odvisno od območja delovanja reometra ter od lastnosti vzorca. Frekvenčno območje, v katerem se snov obnaša viskoelastično tekoče ali trdno, pa je odvisno od lastnosti snovi (8). Idealna elastična snov ima  $G''$  enak nič, vsa energija se torej shrani v obliki elastične energije. Idealna viskozna tekočina pa ima  $G'$  enak 0, kar pomeni, da se pri aplikaciji deformacije vsa energija pretvori v toploto. Za pretežno viskozne snovi je torej značilno, da je  $G'' > G'$ ,  $\tan(\delta) > 1$  (Slika 5A), pri pretežno elastičnih snoveh pa je  $G' > G''$ ,  $\tan(\delta) < 1$  (Slika 5C). Znotraj LVE velja Hookov zakon, kar pomeni, da pri nizkih obremenitvah obstaja sorazmerje med aplicirano obremenitvijo in deformacijo (8). V tem območju sta  $G'$  in  $G''$  konstantna tudi če spreminjamo amplitudo deformacije (8).

### 3.1.3.3. Pomen rezultatov reološkega vrednotenja hidrogelov

Glede na  $G'$  in  $G''$  vrednosti pri frekvenčnem testu lahko dobimo tri tipe rezultatov, na podlagi le-teh pa lahko določimo, ali gre za razredčeno raztopino, raztopino, kjer so polimerne verige med seboj prepletene, ali gel. Razredčena raztopina makromolekul izkazuje  $G'' > G'$  znotraj celotnega frekvenčnega testa (Slika 5A). Z večanjem koncentracije makromolekul le-te interagirajo med sabo, dobimo raztopino s prepletenimi polimernimi verigami (*ang. entangled*), za katero je značilno presečišče, ko je  $G' = G''$  in  $\tan(\delta) = 1$  (Slika 5B). Pri frekvencah pod to točko je material pretežno tekoč (viskozen), nad njo pa pretežno trden (elastičen). Če se tvori gel, je  $G' > G''$  (Slika 5C), material je torej pretežno elastičen, oba modula sta relativno neodvisna od frekvence (10), popolno neodvisnost pa dobimo le v primeru tvorbe idealnih premreženj (npr. kovalentne vezi). Opaziti je možno tudi plato  $G'$ , medtem ko  $G''$  pada z naraščajočo frekvenco in doseže minimum (8).



Slika 5: Trije tipi materialov, ki jih razlikujemo na osnovi frekvenčnega testa: A-razredčena raztopina, B-premrežena raztopina, C-gel.  $G'$  je elastični,  $G''$  pa viskozni modul (10).

Povzamemo torej lahko, da je za hidrogelne značilno elastično področje, majhna odvisnost  $G'$  in  $G''$  od frekvence, opazen je plato  $G'$ ,  $G''$  pa pada z naraščajočo frekvenco in doseže minimum. (8).

#### **3.1.4. Uporaba hidrogelov**

Hidrogeli so široko uporabni na biomedicinskem področju predvsem zaradi možnosti enostavnega spreminjanja njihovih lastnosti s spreminjanjem sestave hidrogela ali postopka izdelave (3). Poleg tega so njihove mehanske lastnosti primerne za različne načine aplikacije. Zelo pogosto se hidrogeli uporabljajo na področju kontaktnih leč ter še posebej pri tkivnem inženirstvu, saj so zaradi svoje visoke vsebnosti vode in mehke konsistence podobni človeškemu tkivu (3). Mehka konsistenca in prožnost hidrogela namreč zmanjšujeta možnost draženja okoliškega tkiva, zato je biokompatibilnost hidrogelov izredno velika. Dodatno zaradi nizke medfazne napetosti med hidrogelom in okoliško tekočino obstaja majhna verjetnost adsorpcije proteinov iz telesnih tekočin, ki je začetni korak pri prepoznavanju in zavračanju tujih snovi in s tem povezano nekompatibilnostjo materiala (11). Kot tkivni nadomestek najbolj izstopa uporaba hidrogelov za nadomeščanje sklepnega hrustanca. Velik potencial na tem področju izkazuje uporaba polivinilalkohola, ki ima ustrezne mehanske lastnosti, faktor obrabe in vsebnost vode (3).

Še eno področje, kjer se hidrogeli uspešno uporabljajo, je razvoj sodobnih oblog v terapiji kroničnih ran in opeklin, saj so na rani sposobni zagotavljati vlažno mikrookolje. Tak način zdravljenja v veliki meri izpodriva prekrivanje ran s klasično gazo, saj so prednosti, ki jih prinaša vlažno okolje, številne. Vlaga namreč ustrezno hidratira tkivo in omogoči večjo celično in encimsko aktivnost. Posledično se zniža pH, nastane blaga hipoksija, ki stimulira angiogenezo in omogoči tvorbo novega kapilarnega omrežja. Takšno okolje pa ugodno vpliva na avtolitične procese čiščenja in razkrajanja nekroz (5). Vlažno okolje prekrije proste živčne končiče, zato je njihovo draženje zmanjšano in bolečina umirjena. Hidrogeli tudi predstavljajo nadomestek manjkajočega tkiva, ustrezno pripravijo ležišče rane, vpijajo izločke, zaščitijo pred sekundarno infekcijo, potrebno je manj pogosto prevezovanje, ki je tudi manj boleče. S tem se poveča kakovost bolnikovega življenja, zmanjšajo pa se tudi celokupni stroški zdravljenja, čeprav so sodobni materiali dražji od klasične gaze. Študije so pokazale, da uporaba hidrogelov za vlažno celjenje ran močno pospeši in izboljša proces zdravljenja kroničnih ran (3).

Hidrogeli predstavljajo perspektiven način dostave zdravilnih učinkovin zaradi velike kapacitete za absorpcijo vode, nabrekanja, permeabilnosti in odziva na fizikalne, kemijske ali biološke stimuluse (pH, temperatura, ionska moč, elektromagnetno sevanje), ki povzročijo spremembe v strukturi. Imajo porozno strukturo, ki jo je možno uravnavati s pomočjo gostote polimernega premreženja, s tem pa lahko optimiziramo farmakokinetični profil sproščanja učinkovin. Prav tako lahko hidrogeli služijo kot depo sistem za sproščanje učinkovin skozi daljše časovno obdobje. Dodatno so nekateri hidrogeli tudi biorazgradljivi, samo obliko hidrogelov pa lahko prilagajamo obliki površine, kamor jih nanašamo (2, 3, 12). Sproščanje učinkovin iz hidrogelov je lahko difuzijsko nadzorovano, kemijsko nadzorovano ali nadzorovano z nabrekanjem polimera (2, 12).

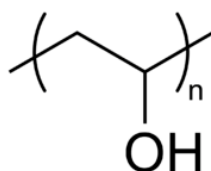
### **3.1.5. Primernost hidrogelov za dostavo proteinov**

Peptidi in proteini morajo, dokler ne dosežejo ciljnega mesta, ohraniti svojo nativno strukturo, med potjo pa ne sme priti do njihove encimske razgradnje. Le v tem primeru bodo namreč ohranili svojo biološko aktivnost. Vodno okolje hidrogela je podobno fiziološkemu okolju proteinov v organizmu, zato so hidrogeli eden izmed najprimernejših sistemov za ohranjanje stabilnosti in aktivnosti teh občutljivih substanc. Adsorpcija proteinov na hidrokele je majhna zaradi majhne površinske napetosti med hidrogeli in vodo. Prav tako lahko hidrogeli sprejmejo učinkovine z različno molekulsko maso in hidrofilnostjo, neproblematična je tudi največja količina vgrajene učinkovine (11).

## **3.2. POLIVINILALKOHOL (PVA)**

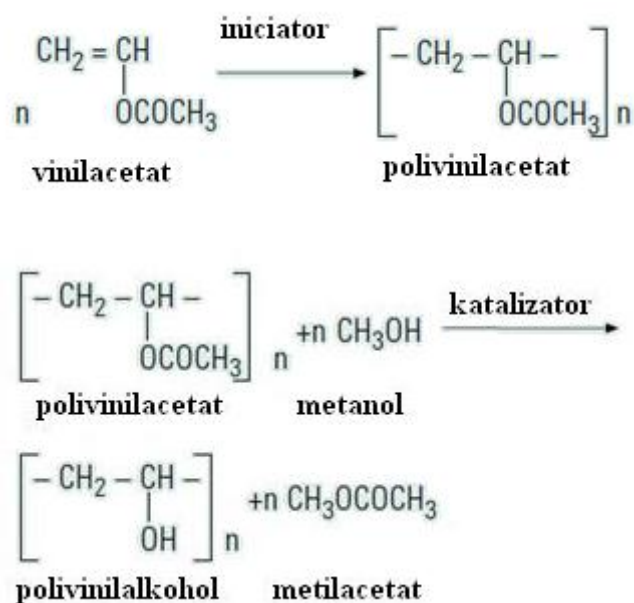
### **3.2.1. Fizikalno kemijske lastnosti PVA**

Polivinilalkohol (PVA) je polimer enostavne strukture (Slika 6) sestavljen iz monomernih enot vinil alkohola.



*Slika 6: Kemijska struktura polivinilalkohola.*

Ker v naravnih virih ni prisoten, ga pridobivamo izključno po sintezni poti in sicer s polimerizacijo vinil acetata v polivinil acetat in nato s hidrolizo le-tega v polivinilalkohol (Slika 7), pri čemer izvedba samega sinteznega postopka določa lastnosti dobljenega polimera (1). V praksi popolna hidroliza ne poteča, zato v verigi vedno ostane še nekaj acetilnih skupin. Stopnja hidrolize znatno vpliva na topnost PVA v vodi, sposobnost kristalizacije ter kemijske lastnosti. Tako na primer nižja kot je stopnja hidrolize, večja je topnost polimera v vodi, saj acetilne skupine pri nižji stopnji hidrolize oslabijo inter- in intramolekularne povezave ter olajšajo raztapljanje polimera (1).



Slika 7: Sinteza polivinilalkohola (13).

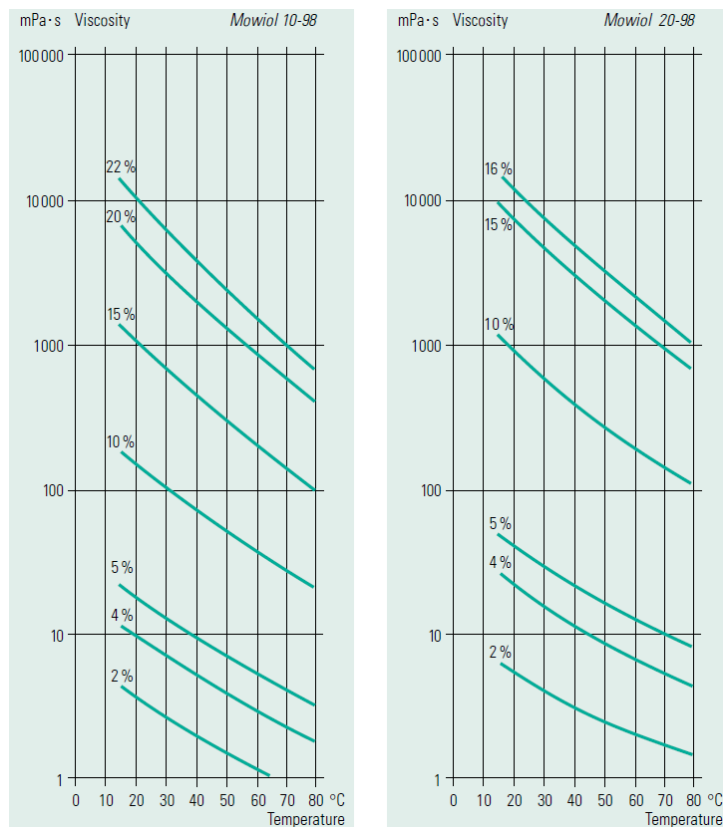
Med samo sintezo nastajajo polimeri različnih molekulskih mas, ki še dodatno vplivajo na sposobnost kristalizacije, adhezivnost, mehansko trdnost in difuzivnost (1). Potrebno je poudariti, da je praktično nemogoče meriti molekulsko maso polimera na samem PVA, saj povezovanje verig med seboj lahko privede do napačnih rezultatov. Ponavadi se tako izmeri molekulska masa vmesnega produkta polivinil acetata, nato pa izračuna molekulska masa PVA. V praksi je namesto podatka o molekulski masi velikokrat podan podatek viskoznosti 4% vodne raztopine PVA pri temperaturi 20°C ter stopnja hidrolize (13).

Mowiol® je registrirano ime PVA, v našem primeru od proizvajalca Sigma Aldrich, obstajajo pa tudi nekateri drugi. Mowioli se razlikujejo po molekulski masi in stopnji hidrolize, kar je pogosto razvidno že iz imena, kjer prva številka imena pomeni viskoznost 4% raztopine pri 20°C, druga pa stopnjo hidrolize (odstotek OH skupin, ki niso

acetilirane). Na primer Mowiol® 10-98 je PVA z izračunano molekulsko maso 61000 Da in 98% stopnjo hidrolize in ima v 4% raztopini pri 20°C viskoznost  $10 \pm 1,0$  mPas, Mowiol® 20-98 pa ima molekulsko maso 125000 Da in viskoznost  $20 \pm 1,5$  mPas (13).

Viskoznost PVA raztopin je odvisna tako od koncentracije kot tudi od stopnje polimerizacije in hidrolize (Slika 8). Iz slike 8 je razvidno, da se z višanjem koncentracije večja viskoznost raztopine. Molekule PVA so namreč ob višji koncentraciji bližje skupaj, zato se med njimi lahko tvori več povezav, v glavnem vodikovih vezi (14). Podoben vpliv kot višanje koncentracije PVA ima tudi večanje stopnje polimerizacije, saj daljše polimerne verige povečajo število inter- in intramolekularnih vodikovih vezi med verigami PVA (15). Pomemben parameter, ki signifikantno vpliva na viskoznost, pa je seveda tudi temperatura, pri čemer viskoznost PVA raztopin z naraščajočo temperaturo pada.

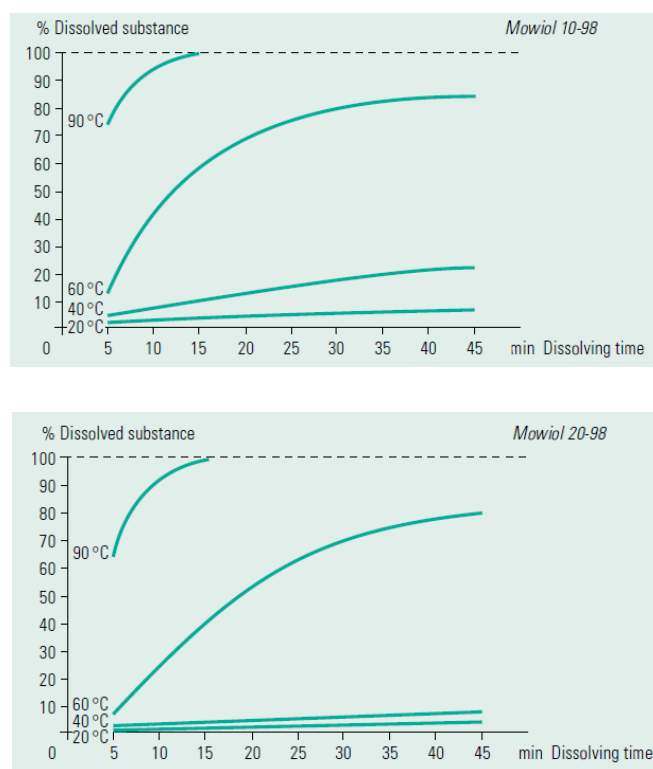
Velja poudariti, da je meritve potrebno izvajati vedno na enak način po istem času, saj s časom prihaja do ureditve verig, kar znatno vpliva na rezultate viskoznosti (13).



Slika 8: Viskoznost Mowiola® 10-98 in Mowiola® 20-98 v odvisnosti od temperature in koncentracije (13).



Topnost PVA je podana kot količina raztopljenega polimera pri določeni temperaturi v določenem času (13). Najpogostejše in najpomembnejše topilo za PVA je voda oziroma puferske raztopine. Iz spodnjih grafov (Slika 9) je razvidno, da večanje molekulske mase PVA (Mowiol® 20-90 v primerjavi z 10-90) upočasni raztapljanje PVA, posebno pri nižjih temperaturah, pri 90°C pa molekulska masa praktično ne vpliva na hitrost raztapljanja, kot je razvidno iz približno enakega časa raztapljanja obeh primerov polimera na sliki 9(13). Na topnost PVA vpliva tudi stopnja hidrolize. Pri višji stopnji hidrolize so inter- in intramolekularne vezi v polimeru močne, PVA je bolj kristaliničen, njegova topnost v vodi pa manjša. Za prekinitev teh vezi je potrebne več toplotne energije, zato je za raztapljanje potreben daljši čas in temperatura nad 80°C. Med ohlajanjem se nato vodikove vezi med verigami PVA ali pa med PVA in vodo ponovno vzpostavijo, zato se viskoznost raztopin z ohlajanjem poveča (15).



Slika 9: Hitrost raztapljanja Mowiola® 10-98 in Mowiola® 20-98 (13).

Zanimiva in pomembna lastnost PVA je tudi njegova semikristalinična struktura, nagnjena k tvorbi inter- in intramolekularnih vodikovih vezi, vodna raztopina PVA pa lahko pod različnimi pogoji preide celo v termoreverzibilen hidrogel (16). Močno polarne verige

PVA se tako v trdnem kot v raztopini orientirajo ena proti drugi, na določenih predelih tečejo vzporedno in se povezujejo z vodikovimi vezmi, ki jih tvorijo med hidroksilnimi skupinami. Tako je struktura polimera urejena, znotraj polimerne strukture pa se oblikujejo posamezna kristalizacijska področja. Število zaostalih acetilnih skupin v polimeru močno vpliva na urejenost strukture polimera, pri čemer večji delež le-teh zmanjša polimerno kristaliničnost in urejenost, kar posledično poveča topnost samega polimera. Izredno pomembno pa je dejstvo, da segrevanje privede do znatno povečane tvorbe kristalizacijskih področij (13).

### **3.2.2. Biofarmacevtske lastnosti PVA**

Biokompatibilnost je povezana z adsorpcijo proteinov na površino hidrogelov, pri čemer so površine, ki so bolj odporne na adsorpcijo proteinov, manj podvržene vezavi celic. Za hidrofilne snovi je večja verjetnost, da se proteini nanje ne bodo vezali, prav tako tudi celice ne. PVA je visoko odporen proti adheziji proteinov in celic, ta lastnost pa je v določenih primerih ugodna (npr. pri žilnih implantantih, kjer je zaželena odpornost na vezavo proteinov, trombocitov in razmnoževanje endotelnih celic), v drugih pa ne (pri uporabi PVA hidrogelov v tkivnem inženirstvu) (17). PVA je v naravi biorazgradljiv z mikroorganizmi (vrste *Bacillus* in *Pseudomonas* npr.), končna produkta razgradnje pa sta ogljikov dioksid in voda (15). Za razgradnjo je potreben encim dehidrataza, lahko pa pride najprej tudi do osidacije z oksidazami do  $\beta$ -hidroksiketona ali 1,3-diketona, ki pa se nato lahko razgradi s hidrolazami (18).

Po peroralni aplikaciji se 98% vnesenega PVA po 48 urah izloči z blatom, manj kot 0,2% preko ledvic, nalaganje v tkivih pa ni znano. Ti podatki jasno nakazujejo, da se zelo malo PVA absorbira po peroralni aplikaciji (19). PVA je v organizmu zelo stabilen, se ne razgradi, saj ne v urinu ne v fecesu niso našli njegovih razgradnih produktov (20).

Peroralno aplicirani PVA je varen za uporabo v prehrambni in farmacevtski industriji. Raziskave so namreč dokazale, da je akutna toksičnost zelo nizka ( $LD_{50}$  je 15-20 g/kg/dan), se praktično ne absorbira iz gastrointestinalnega trakta, ni mutagen, NOAEL (non observable adverse effect level) pa je 5000 mg/kg/dan za subkronično testiranje in testiranje reproduktivne toksičnosti pri dveh generacijah (19).

### 3.2.3. Uporabnost PVA

PVA se zaradi svojih številnih pozitivnih lastnosti široko uporablja v farmaciji in biomedicini in je primeren kandidat za biomateriale (1). Biomaterial je katerikoli material bodisi naravnega ali sinteznega izvora, ki posnema celoten ali pa le del žive strukture (21). Lahko je tudi naprava, ki popravlja, podpira, nadomesti ali ponovno vzpostavi naravno funkcijo nekega tkiva v telesu. Zaradi stika s telesnimi tekočinami mora biti biokompatibilen (ne sme izzvati neželenih učinkov v organizmu oz. organizmu na biomaterialu), netoksičen, nekancerogen, imeti mora primerne fizikalne in mehanske lastnosti, omogočati mora obdelavo oblike glede na vrsto uporabe in biti odporen na razgradnjo (21).

PVA ima kar nekaj prednosti pri uporabi, saj je netoksičen, nekancerogen, bioadheziven ter biokompatibilen. Je enostaven za uporabo, ima enostavno kemijsko strukturo ter sposobnost geliranja in tvorbe filmov. Njegovo strukturo je možno modificirati s preprostimi kemijskimi reakcijami, v vodi in bioloških tekočinah pa ima visoko stopnjo nabrekanja. Dodatno njegova elastična struktura v mehanskih lastnostih posnema naravno tkivo, zato ga telo ne zavrača (22).

### 3.3. HIDROGELI IZ PVA

Hidrogele iz PVA lahko naredimo z različnimi načini premreževanja (1):

➤ premreževanje z uporabo kemijskih premreževalcev

V primeru kemijskega premreženja uporabimo premreževalce, kot so acetaldehid, glutaraldehid in drugi monoaldehidi, ki tvorijo acetalne mostove med polimernimi verigami preko hidroksilnih skupin PVA. Kemijsko premreženje preprečuje raztapljanje polimernega matriksa in razpletanje polimernih verig (12). Glavna slabost tako izdelanih hidrogelov je zaostanek premreževalcev, ki bi lahko ob *in vivo* uporabi izzvali različne neželeno učinke, zato jih je potrebno odstraniti. Ker so premreževalci reaktivne spojine, bi lahko v hidrogelu z občutljivo učinkovino povzročile spremembo strukture le-te in s tem spremenili njeno biološko aktivnost, ali pa bi vplivali na njeno sproščanje (1).

➤ premreževanje s pomočjo  $\gamma$ -sevanja

Ko sevanje interagira s polimerom, le-ta adsorbira njegovo energijo. Pri tem nastanejo radikali, ki reagirajo s polimerom ali pa med seboj, pri čemer nastanejo premrežene strukture in s tem hidrogel. To privede do izboljšanih mehanskih in termičnih lastnosti, pa tudi stabilnosti (23). Hidrogeli narejeni s to metodo imajo rahlejšo, bolj odprto strukturo, zato sprejmejo desetkrat večjo količino vode kot kemijsko premreženi. V primerjavi z uporabo kemijskih premreževalcev ta metoda sicer za sabo ne pušča toksičnih zaostankov, vendar pa v gelu nastanejo zračni mehurčki, ki jih je zelo težko odstraniti (1, 24).

➤ fizikalno premreženje s tvorbo kristaliničnih področij

PVA ima zanimivo lastnost, da pri ponavljajočih ciklih zamrzovanja in odtajevanja tvori kristalinična področja (1), ki povežejo polimerne verige. In prav ta edinstvena lastnost omogoča tvorbo izredno čvrstih hidrogelov brez dodatka kakršnega koli premreževalca.

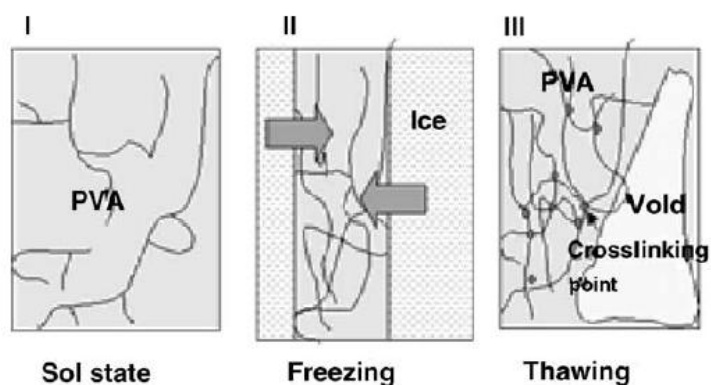
### **3.4. PVA HIDROGELI NAREJENI Z METODO ZAMRZOVANJA IN ODTAJEVANJA POLIMERNE RAZTOPINE**

Izdelava PVA hidrogelov po metodi ponavljajočih se ciklov zamrzovanja in odtajevanja poteka tako, da pripravimo polimerno raztopino določene koncentracije, jo nato zamrznemo ter po daljšem času (20-24 ur) odtalimo, pri čemer lahko te cikle večkrat ponavljamo. Metoda je popolnoma fizikalna, zato imajo hidrogeli izdelani na ta način številne prednosti kot so (1):

- odsotnost potencialno toksičnih primesi (emulgatorjev, katalizatorjev, premreževalcev (25))
- visoka stopnja nabrekanja v vodi
- gumijasta, elastična struktura
- visoka mehanska trdnost
- stabilnost pri sobni temperaturi
- zadržijo svojo obliko
- biokompatibilnost
- visoka vsebnost vode (1)

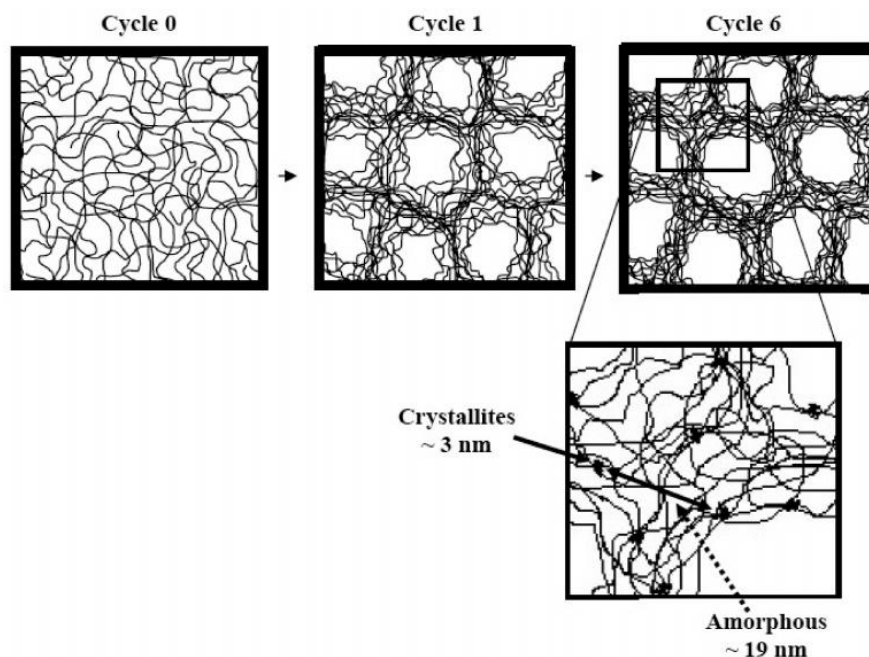
### 3.4.1. Mehanizem nastanka hidrogelov

Osnovni mehanizem nastanka PVA hidrogelov z metodo ponavljajočih ciklov zamrzovanja ter odtajevanja je tvorba kristaliničnih področij med polimernimi verigami PVA. Ko PVA raztopino izpostavimo nizkim temperaturam, voda v raztopini zamrzne, zato se molekule polimera v raztopini ne morejo več prosto gibati (Slika 10-I). Dodatno zamrzovanje vodi do povečevanja volumna ledu in približevanja polimernih verig PVA, ki se sedaj lahko (Slika 10-II) med seboj povežejo z vodikovimi vezmi. Pri prvem ciklu nastanejo šibka premreženja (Slika 10-III), ki pa ostanejo tudi po odtajevanju (26).



Slika 10: Shematski prikaz tvorbe PVA hidrogela z zamrzovanjem-odtajevanjem (26).

Sprva se povežejo le sosednje vzporedne verige, z večanjem števila ciklov pa se vključujejo še ostale molekule, zaradi nastalih točk premreženja pa so polimerne verige v polimerni mreži omejene na določeno področje gibanja (26). Z večanjem števila ciklov se število točk premreženja povečuje, verige polimera agregirajo in nastanejo kristalizacijska področja (26) (Slika 11).



Slika 11: Shematičen prikaz vpliva povečevanja števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja na strukturo hidrogela (27).

Podrobnejše poznavanje kristalizacijskih področij na molekularnem nivoju razkrije, da so le-ta plastovite strukture (1). Dve plasti verig polimera se povežeta z vodikovimi vezmi med hidroksilnimi skupinami, med temi dvojnimi plastmi pa delujejo šibkejšje Van der Waalsove sile. Tako se tvorijo manjši urejeni predeli, na velikost le-teh področij pa vpliva tako dolžina polimernih verig oziroma molekulska masa polimera in koncentracija raztopine kot tudi čas zamrzovanja (1). Ker je število intermolekularnih interakcij odvisno od možnosti povezave dveh sosednjih polimernih molekul, bo število povezav v raztopini z nižjo koncentracijo zaradi večje oddaljenosti verig manjše, nastali hidrogel pa rahlejšje strukture (26). V kolikor je koncentracija raztopine PVA manjša od 5%, so verige polimera že tako narazen, da med zamrzovanjem nastanejo samo intramolekularne vodikove vezi, zato se tudi po zamrzovanju hidrogel ne tvori, temveč dobimo bistro raztopino (28), po odtajanju pa se odvečna voda spontano loči od gela (fazna separacija) (25).

Ob višji koncentraciji in daljših verigah, torej ob večji molekularni masi, so polimerne verige bližje skupaj, dodatno pa so tudi mrežne pore oz. razdalje med točkami premreženja (*ang. mesh size*) manjše, zato je stopnja kristaliničnosti večja. Prav tako se z vsakim dodatnim ciklom zamrzovanja in odtajevanja stopnja kristaliničnosti poveča, število točk premreženj se poveča, razdalja med njimi pa se zmanjša (25).

Sprva so menili, da premreženja nastanejo le med zamrzovanjem, vendar pa so kasnejše študije dokazale, da se nova dodatna premreženja tvorijo tudi med procesom odtajevanja. Polimerne verige so namreč v odtajanem stanju bolj gibljive, kar privede do njihovega preurejanja in dodatne kristalizacije (29).

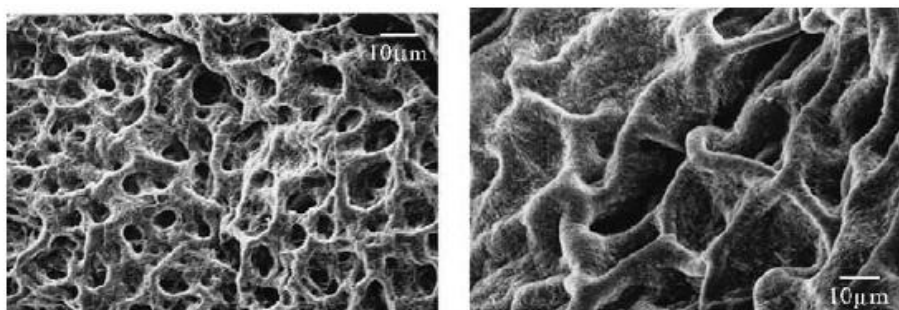
Delež kristalnih področij v hidrogelu je definiran kot volumen kristalnega PVA glede na celoten volumen hidrogela (1). Določamo ga lahko z meritvami gostot gelov, kalorimetrično (diferencialna termična analiza, termogravimetrična analiza, diferenčna dinamična kalorimetrija), spektroskopsko (NMR, IR) ali z rentgensko difrakcijsko analizo (1).

#### **3.4.2. Lastnosti PVA hidrogelov narejenih z metodo zamrzovanja in odtajevanja**

Z urejanjem molekul in kristalizacije v ciklih zamrzovanja in odtajevanja nastane izredno čvrst gel. Lastnosti izdelanih hidrogelov so odvisne od parametrov vhodnega materiala, kot so molekulska masa, stopnja hidrolize in koncentracije PVA, ter od načina izdelave. Pri slednjih je pomembna temperatura zamrzovanja in odtajevanja ter število in čas ponavljajočih se ciklov (1, 16).

Ko tak gel izpostavimo vodnemu mediju, le-ta sicer nabreka, vendar pa področja kristalizacije služijo kot kemijska premreženja, kar naredi hidrogel praktično netopen (25, 26). Večja kot je koncentracija polimera in večje kot je število ciklov, manj hidrogel nabreka (25). Po literarnih podatkih naj bi hidrogeli pri temperaturi 37°C ohranili svojo strukturo 6 mesecev (29).

Z večanjem števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja postanejo tudi stene por debelejšje, vendar pa se njihova velikost poveča (Slika 12) (26).



*Slika 12: Slika PVA hidrogela na elektronskem mikroskopu. Levo 2 cikla in desno 5 ciklov zamrzovanja 5% hidrogela (26).*

Tudi staranje hidrogela privede do povečanja kristaliničnih področij. Molekule topila namreč med sabo interagirajo, zato se nekatere hidroksilne skupine PVA sprostijo in lahko sodelujejo v kristalizaciji. Pri tem prihaja do fazne separacije (1).

PVA hidrogeli pripravljani z metodo zamrzovanja in odtajevanja kažejo mnoge izboljšane lastnosti v primerjavi s tradicionalnim postopkom izdelave s kemijskim premreženjem, najopaznejša lastnost pa je izboljšanje mehanske trdnosti. Čeprav raziskave na tem področju potekajo že več kot 30 let, pa še vedno ni popolnoma razjasnjen odnos med strukturo in lastnostmi (1).



#### **4. NAMEN DELA**

Vedno več zdravilnih učinkovin je proteinov, katerih struktura je izredno občutljiva. Zato je zanje izredno pomembno, da jih vgradimo v takšen dostavni sistem, ki bo to strukturo ohranjal, hkrati pa v organizmu zagotavljal želen profil sproščanja. Primeren dostavni sistem za proteine predstavljajo PVA hidrogeli izdelani z metodo zamrzovanja in odtajevanja, kar je bil predmet raziskovanja v tej diplomski nalogi.

Namen diplomske naloge bo izdelava in vrednotenje PVA hidrogelov s postopkom zamrzovanja in odtajevanja, ki bo omogočal nadzorovano sproščanje modelne proteinske učinkovine. Hidrogele bomo pripravili iz PVA polimera z dvema različnima molekulskima masama, v treh različnih koncentracijah in z različnim številom ciklov zamrzovanja in odtajevanja. Te hidrogele bomo nato reološko vrednotili ter iz njih sklepali na njihove mehanske lastnosti.

V gele bomo nato vgradili modelni protein jajčni albumin in preučevali njegovo sproščanje. Glavni cilj bo ugotoviti, kako parametri izdelave hidrogelov iz polivinil alkohola (molekulska masa polimera, koncentracija polimera in število ciklov zamrzovanja in odtajevanja) vplivajo na mehanske lastnosti hidrogelov ter na sproščanje proteina iz njih.

Z namenom povečanja stabilnosti bomo nato hidrogele še liofilizirali ter preučili poroznost in rehidracijo liofilizatov. V zadnjem delu naloge bomo poskusili izdelati tudi nanodelce z emulzijsko metodo v kombinaciji z zamrzovanjem in odtajevanjem.

## 5. EKSPERIMENTALNI DEL

### 5.1. MATERIALI

#### MATERIALI ZA IZDELAVO HIDROGELOV

- polivinil alkohol MOWIOL<sup>®</sup> 10-98, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija; molekulska masa 61000 Da, videz: beli kosmiči
- polivinil alkohol Mowiol<sup>®</sup> 20-98, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija; molekulska masa 125000 Da, videz: beli kosmiči
- jajčni albumin (albumine from chicken egg white, Grade V), min. 98% (agarozna gelska elektroforeza), kristaliziran in liofiliziran, brez prisotnosti soli; molekulska masa: 44287 Da, videz: beli do svetlo rumeni kosmiči, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat (99,0- 102,0%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat ( 99,5 - 100,5% ), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev klorid ( >99,5%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- klorovodikova kislina 37%, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev hidroksid (  $\geq 99\%$  ), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev klorid ( >99,5% ), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- bidestilirana voda

#### MATERIALI ZA IZDELAVO PUFRA IN MOBILNE FAZE

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

#### MATERIALI ZA IZDELAVO NANODELCEV

- silikonsko olje, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

## 5.2. NAPRAVE

- avtomatska pipeta BIOHIT m1000 (100-1000  $\mu$ L), Kemomed, Finska
- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- digitalna tehtnica, Exacta 2200 EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- digitalna tehtnica, Sartorius BP310S, Göttingen, Nemčija
- magnetno mešalo (IKA WERKE, Nemčija)
- magnetno mešalo z grelcem (IKA WERKE, Nemčija)
- liofilizator CHRIST BETA 1-8K, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Nemčija
- pH meter, MA 234, Mettler Toledo, pH/Ion Analyzer, Schwarzenbach, Švica
- sistem za visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC), Agilent Series, Agilent Technologies, Nemčija; kolona ZORBAX GF-225 z dolžino 225mm in notranjim premerom 9,4 mm ter velikostjo delcev 4  $\mu$ m
- helijev piknometar Micromeritics AccuPyc 1330, ZDA
- Hubardov piknometar, 25 mL, Duran, Wertheim, Nemčija
- rotor-stator homogenizator Ultra-turrax (IKA, Nemčija)
- modularni reometer Physica MCR 301, Anton Paar®, Graz, Avstrija
- naprava za merjenje velikosti delcev Zetasizer Nano ZS (PCS naprava) (Malvern, Velika Britanija)

## 5.3. POSTOPKI IN METODE

### 5.3.1. Priprava izotoničnega fosfatnega pufra s pH 7 (PBS)

Fosfatni pufer (PBS) smo pripravili tako, da smo natehtali 0,2 g KCl, 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ter 8 g NaCl. Vse soli smo kvantitativno prenesli v litrsko bučo, dodali približno 800 mL bidestilirane vode ter mešali s magnetnim mešalom, dokler se vse soli niso raztopile. Tako pripravljeni raztopini smo z 1 M NaOH ali 1 M HCl umerili pH na vrednost  $7,0 \pm 0,05$ , nato pa bučko z vodo dopolnili do oznake. Fosfatni pufer predstavlja okolje, v katerem je albumin najbolj stabilen, zato smo pri tvorbi gelov uporabljali fosfatni pufer.

### 5.3.2. Priprava hidrogelov

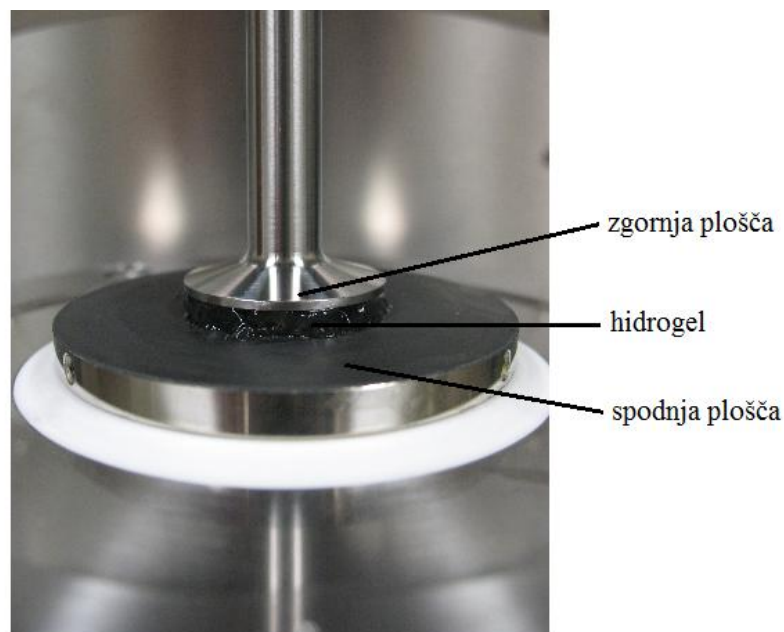
Pripravili smo hidrokele s 5, 10 in 15% koncentracijo polivinil alkohola dveh različnih molekulskih mas. Na digitalni tehtnici smo natehtali ustrezne količine polimera (250 mg,

500 mg, 750 mg) in ga raztopili v 5 g fosfatnem pufru s pH 7. Polimer smo raztapljali s segrevanjem na 90°C ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu, dokler ni bilo več opaznih kosmičev PVA, vendar pa so pri bolj koncentriranih gelih bile vidne niti polimera. Čas raztapljanja je bil odvisen od koncentracije polimera; pri 5% gelu je bil približno 15 minut, pri 15% raztopini pa 40 minut. Med segrevanjem smo morali biti pozorni na temperaturo vzorcev, saj se je temperatura zaradi majhne količine gela hitro preveč dvignila, pri čemer se je raztopina pričela peniti. Raztopljene vzorce smo nato pustili na magnetnem mešalu, da so se enakomerno ohladili na sobno temperaturo, v ohlajenih hidrogelih pa večinoma ni bilo prisotnih zračnih mehurčkov. Vzorce smo predhodno tudi stehali, da smo lahko nadomestili del vode, ki je med segrevanjem izhlapela.

Raztopine PVA smo nato izpostavili cikličnemu zamrzovanju in odtajevanju. Vzorce smo najprej 20 ur zamrzovali v zamrzovalniku pri -22°C, nato pa jih za nadaljnje 4 ure pustili tajati na sobni temperaturi. Takšne cikle smo ponavljali do štiri krat, dobljene hidrogelne vzorce smo nato vrednotili.

### **5.3.3. Vrednotenje mehanskih lastnosti hidrogelov**

Hidrogelne vzorce smo pripravili po postopku opisanem v točki 5.3.2, zamrzovali pa smo jih v enako velikih petrijevkah, v katere smo nalili tanko in pri vseh vzorcih približno enako debelo plast gela. Nastalim hidrogelom smo po vsakem ciklu zamrzovanja in odtajevanja merili mehanske lastnosti vzorcev. Meritve smo izvajali na reometru Physica MCR 301 s sistemom vzporednih ploščic s premerom 25 mm. Vzorec smo postavili na spodnjo statično ploščo nato pa približali zgornjo ploščo, da se je dotikala gela. Razmik med ploščama smo nastavili glede na debelino gela. Presežek hidrogela, ki je gledal izpod plošče, smo odstranili. Prikaz meritve je predstavljen na sliki 13.



*Slika 13: Prikaz meritve reoloških lastnosti hidrogela v sistemu plošča-plošča*

Najprej smo na enem od vzorcev naredili amplitudni test z namenom ugotoviti območje linearnega reološkega obnašanja testirane snovi, znotraj katerega so reološke lastnosti snovi neodvisne od amplitude strižne deformacije. Frekvenca oscilacije je bila konstantna (10 rad/s), strižno deformacijo pa smo zvezno povečevali od 0,01 do 100%, pri čemer smo merili elastični in plastični modul. Znotraj tega območja smo nato izbrali parametre merjenja frekvenčnega testa. Meritve smo izvajali pri temperaturi 25°C.

Ko smo določili strižno deformacijo znotraj LVE, smo začeli s frekvenčnimi testi. Frekvenco smo spreminjali od 100 proti 0,1 rad/s, deformacija ( $\gamma$ ) pa je bila 0,1%. Pod enakimi pogoji smo pomerili vse pripravljene vzorce, da bi lahko neposredno primerjali rezultate med seboj, ter beležili spreminjanje elastičnega ( $G'$ ) in plastičnega ( $G''$ ) modula.

Vzorci, ki so bili po zmrzovanju preveč tekoči, se na ta način niso dali izmeriti, zato smo meritve izvedli z drugim senzorskim sistemom in sicer stožec-ploščica (namesto ploščica-ploščica). To so bili 5% gel iz Mowiola® 10-98 po enem, dveh in treh ciklih zamrzovanja in odtajevanja ter iz Mowiola® 20-98 po prvem ciklu.

#### **5.3.4. Hidrogeli z vgrajenim albuminom**

Najprej smo natehtali 50 mg albumina in ga raztopili v 1 mL PBS. Ker smo hkrati izdelovali 12 vzorcev, smo to količino pomnožili z 12.

Hidrogele smo pripravili po enakem postopku kot v točki 5.3.2, le da smo uporabili 1 mL manj PBS pri pripravi gela (torej 4 g). Pripravljene raztopine smo ohladili na sobno temperaturo in jim šele nato dodali 1 mL raztopine albumina s koncentracijo 50 mg/mL. Albumin je kot protein občutljiv na visoko temperaturo, zato ga lahko dodamo šele v ohlajene koloidne disperzije, drugače bi denaturiral (30). Končna koncentracija albumina v gelu je bila 1 mg/mL. Ta koncentracija je bila izbrana z ozirom na mejo detekcije HPLC sistema.

Po dodatku albumina sistem še vedno dobro gelira. Prisotnost tega srednje velikega proteina očitno ne prepreči urejanja verig PVA in njihovega povezovanja, ki je potrebno za tvorbo kristaliničnih področij kot fizikalnih povezav v mreži. Po literaturnih podatkih ostane protein stabilen tudi po ciklih izpostavljenosti zamrzovanju in odtajevanju (29).

### **5.3.5. Preskus sproščanja albumina iz hidrogela**

#### **5.3.5.1. Priprava umeritvene premice za albumin**

Na digitalni tehtnici smo natehtali 50,0 mg albumina, ga kvantitativno prenesli v 25,0 mL bučko in z mobilno fazo dopolnili do oznake. Tako smo dobili osnovno raztopino s koncentracijo 2 mg/mL, ki smo jo nato z mobilno fazo redčili tako, da smo dobili raztopine s koncentracijo 1, 0,5, 0,2, 0,1, in 0,01 mg/mL. Najnižja koncentracija je bila določena glede na mejo detekcije HPLC sistema. Umeritveno krivuljo smo izdelali na osnovi priprave treh osnovnih raztopin. Pred HPLC analizo smo tudi standarde zamrznili in nato odtalili, da so bili tretirani popolnoma enako kot vzorci sproščanja albumina iz hidrogela.

#### **5.3.5.2. Izdelava mobilne faze in vrednotenje albumina s HPLC**

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

- mobilna faza je bila sestavljena iz 130 mM NaCl in 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> s pH 7. Pripravili smo jo tako, da smo 7,6 g NaCl in 7,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*12H<sub>2</sub>O raztopili v približno 1800 mL bidestilirane vode, z 1 M NaOH ali 1 M HCl uravnali pH na  $7 \pm 0,05$ , ter dopolnili do 2000 mL
- uporabili smo kolono ZORBAX GF-225 z dolžino 225 mm in notranjim premerom 9,4 mm ter velikostjo delcev 4  $\mu$ m. Ločevanje poteka na osnovi izključitvene

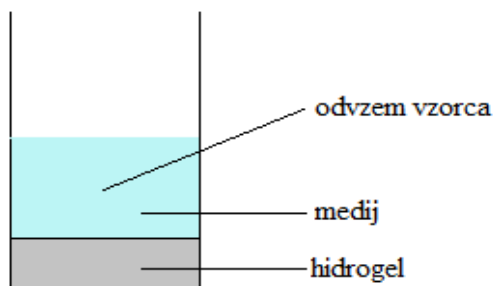
kromatografije po velikosti, primerna pa je za vodotopne makromolekule z molekulsko maso od 4 do 400 kDa;

- volumen avtomatsko injiciranega vzorca je bil 10  $\mu$ L
- pretok mobilne faze je bil 1 mL/min
- sistem je bil termostatiran na 23°C, temperatura vzorce je bila 20°C
- UV detekcija je potekala pri valovni dolžini 210 nm
- čas potovanja enega vzorca po koloni je bil 14 min
- vzorce za stabilnost in sproščanje smo hranili v vialah, ki smo jih takoj po odvzemu zamrznili, da bi lahko analizo vseh vzorcev izvedli skupaj.

Vzorcev pred analizo na HPLC-ju nismo filtrirali, saj se pri kromatografih niso pokazali nobeni dodatni vrhovi. Čeprav se je polimer med sproščanjem razpletal, to na vzorčenje ni imelo vpliva.

#### 5.3.5.3. Razvoj modela za izvedbo sproščanja jajčnega albumina iz hidrogela

Pripravljene vzorce hidrogelov smo zamrzovali in odtajevali v enakih čašah, v katerih smo nato izvajali sproščanje. V vseh čašah je bilo 5 g gela, na katerega smo nalili PBS s pH 7 kot medij za sproščanje. Razmerje volumen hidrogela/volumen medija je bil vedno 1:2, s čimer smo zagotovili sink pogoje (Slika 14). Hidrogele smo pokrili s parafilmom in sproščanje izvajali pri sobni temperaturi. Vzorce po 10  $\mu$ L smo z avtomatsko pipeto jemali iz sredine medija ob določenih časovnih intervalih in jih nadomestili z enako količino svežega pufra, da smo ohranjali sink pogoje. Sproščanje smo testirali 4 dni, pri čemer smo vzorce jemali 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 10 h, 24 h, 48 h, 72 h in 96 h po začetku sproščanja. Odvzete vzorce smo napolnili v viala in jih zamrznili do vrednotenja s HPLC. Vsako sproščanje smo izvajali v treh paralelkah.



*Slika 14: Shema modela sproščanja jajčnega albumina iz hidrogelov.*

### **5.3.6. Liofilizacija hidrogelov**

Liofilizacija je postopek sušenja, pri katerem odstranimo topilo (običajno vodo) iz zamrznjenega vzorca s sublimacijo. S to metodo lahko tako posušimo in hkrati ohranimo strukturo, sestavo in biološko aktivnost bioloških in organskih vzorcev, ki bi jih pri drugih metodah sušenja zaradi segrevanja lahko poškodovali, zaradi odsotnosti vode pa ima liofiliziran produkt znatno podaljšano stabilnost. Slabosti postopka sta predvsem časovna in ekonomska potratnost (31).

Proces liofilizacije poteka v treh fazah (32):

#### **1. Zamrzovanje**

V prvi fazi vzorce zamrznemo, ponavadi pri atmosferskem tlaku, voda v vzorcih se spremeni v led, hkrati pa tako vzorec imobiliziramo, da ohrani svojo strukturo, velikost in obliko. Zamrzovalna faza je najbolj kritična v celotnem procesu liofilizacije, saj lahko v primeru nepravilnega izvajanja pride do uničenja produkta.

#### **2. Primarno sušenje**

Med fazo primarnega sušenja znižamo tlak (na nekaj milibarov) in dovedemo dovolj toplote materialu, da voda sublimira. V tej stopnji odstranimo 95 % vsebnosti vode v materialu, in sicer nevezano vodo. Čeprav vzorec stoji na toplejši podlagi, se zaradi hladilnega efekta sublimacije ne tali, zato se ohrani struktura, ki smo jo dosegli z zamrzovanjem. To je najdaljša faza v procesu liofilizacije.



### 3. Sekundarno sušenje

Cilj sekundarnega sušenja je odstranitev nezmrznjene vezane vode. V tej fazi je temperatura višja kot v primarni fazi sušenja in je lahko celo nad 0°C, saj hočemo prekiniti fizikalno-kemijske interakcije, ki so nastale med vodnimi molekulami in zamrznjenim materialom. Običajno znižamo tudi tlak, da pospešimo desorpcijo. Sekundarno sušenje omogoča, da imamo na koncu v vzorcu prisotne le še zelo nizke koncentracije vode (nekje med 1 in 4%) (32).

#### Naši eksperimentalni parametri:

- vzorce smo zmrznili v zamrzovalniku na -22°C čez noč
- temperaturo police smo nastavili na -25°C
- tlak med primarnim sušenjem je znašal 0,57 mbarov
- čas liofilizacije je bil približno 60 ur (najprej 22 ur, nato še dodatno 38 ur)
- liofilizacijo smo izvajali v vzorcih enake mase in debeline (manj kot 10 mm)

Po končani liofilizaciji smo vzorce PVA hidrogela z vgrajenim albuminom hranili v eksikatorju do nadaljnje obdelave.

#### **5.3.7. Rehidracija hidrogelov**

Liofilizirane vzorce smo želeli rehidrirati in jih na tak način ponovno rekonstituirati. Rehidracijo smo izvedli tako, da smo vzorce hidrogela v ustrezni steklovini pred liofilizacijo stehali, nato liofilizirali in ponovno stehali po liofilizaciji, pri čemer je prišlo do izgube mase zaradi odstranitve vode. Suhim vzorčkom smo s kapalko dodali toliko bidestilirane vode, da smo povrnili prvotno maso. Vzorčke smo potem pustili stati in jih opazovali pet dni. Rehidrirane vzorce smo imeli namen ponovno reološko vrednotiti in ponoviti sproščanje, vendar pa suhi vzorci niso sprejeli vse vode, zato niso bili primerni za nadaljnje testiranje.

#### **5.3.8. Merjenje gostote liofiliziranih hidrogelov**

##### 5.3.8.1. Merjenje navidezne gostote s Hubardovim piknometrom

Gostota je definirana kot razmerje med maso ( $m$ ) in prostornino ( $V$ ). Navidezna gostoto (razmerje mas enakih volumnov snovi in vode) trdnih snovi lahko merimo s Hubardovim

piknometrom (Slika 15), pri čemer potrebujemo tekočino, v kateri se vzorec ne raztaplja, z njo ne reagira, tekočina pa ga popolnoma omoči. Pri izvajanju meritev moramo paziti na to, da v vzorcu ni zračnih mehurčkov, da piknometer po termostatisiranju skrbno obrišemo ali posušimo, da tehtamo z analizno tehtnico pri 20°C in da med posameznimi tehtanji piknometer dobro očistimo. Na ta način se namreč izognemo napakam meritev (7).

Najprej smo stehali liofiliziran hidrogel na zraku ( $m$ ), piknometer napolnjen s parafinom ( $m_3$ ), piknometer napolnjen z liofiliziranim vzorcem ter dopolnjen s parafinom ( $m_4$ ) in še prazen piknometer ( $m_5$ ). Iz teh podatkov smo po enačbi 1 izračunali navidezno gostoto, ki smo jo kasneje uporabili za izračun poroznosti.

$$\delta_{NAV} = \delta_{PAR} * \frac{m}{m + m_1 - m_2} \quad (\text{enačba 1})$$

$m$ ...masa vzorca na zraku

$m_1$ ... masa parafina v piknometru ( $m_3 - m_5$ )

$m_2$ ... masa vzorca in parafina v piknometru ( $m_4 - m_5$ )

$\delta_{PAR}$ ... gostota parafina

$\delta_{NAV}$ ... navidezna gostota vzorca



*Slika 15: Mejenje gostote s Hubardovim piknometrom.*

#### 5.3.8.2. Določanje gostote s helijevim piknometrom

S helijevom piknometrom določamo volumen vzorca po spremembi tlaka helija v celici določenega volumna. Piknometer nato iz podatka za maso izračuna gostoto. Naprava deluje na osnovi plinskega zakona. Njena bistvena dela sta celica za vzorec in ekspanzijska

celica. V prvo celico vložimo stehtan trden vzorec neznane volumna. Predpostavimo, da je na začetku tlak v ekspanzijski celici in v celici za vzorec enak tlaku v laboratoriju. Zapremo ventil med obema celicama in v celico z vzorcem spustimo znano množino helija, pri čemer tlak v celici naraste. Nato ta ventil zopet odpremo, tlaka med celicama pa se izenačita. Iz razlike tlakov pred in po odprtju ventilov nato naprava izračuna volumen vzorca. Večji je volumen vzorca, višji je ravnotežni tlak (33).

Helij se uporablja zaradi velikosti atoma ( $r=0,318 \text{ \AA}$ ), ki omogoča prodiranje tudi v najmanjše pore vzorca, ter njegove inertnosti, saj se ne adsorbira na trdne površine. Metoda se uporablja za določanje gostote pri vseh trdnih snoveh, možno jo je uporabljati tudi pri poltrdnih sistemih, kot so geli in mazila, ni pa uporabna pri tekočinah, saj je parni tlak previsok in moti meritve (7).

Meritve smo izvajali tako, da smo najprej stehali prazno celico za vzorec, jo do vsaj dveh tretjin volumna napolnili z liofiliziranim hidrogelom, ponovno stehali ter izračunali maso vzorca. Nato smo odvili pokrov naprave in vanj namestili celico z vzorcem ter pokrov spet privili. Na analizatorju smo nato z nizom ukazov izračunali pravo gostoto in jo izpisali.



Slika 16: Mejenje gostote s Helijevim piknometrom.

### 5.3.9. Izračun poroznosti hidrogelov

Na podlagi izmerjene navidezne in prave gostote smo po enačbi 2 izračunali poroznost liofiliziranih hidrogelov.

$$\epsilon = 1 - \frac{\delta_{\text{nav}}}{\delta_{\text{prava}}} \quad (\text{enačba 2})$$

$\epsilon$ ... poroznost

$\delta_{\text{NAV}}$ ... navidezna gostota

$\delta_{\text{PRAVA}}$ ... prava gostota

### 5.3.10. Izdelava nanodelcev

V podrobnem študiju literature smo v samo enem članku (34) zasledili, da je možno z metodo zamrzovanja in odtajevanja narediti nanodelce iz polivinil alkohola z emulzijsko metodo pri čemer emulgator ni potreben, zato smo tudi izdelavo nanodelcev vključili v eksperimentalno delo diplomske naloge.

Najprej smo izdelali 10% raztopino polivinil alkohola Mowiol® 10-98 po enakem postopku kot v točki 5.3.2. V čašo smo nato nalili 100 mL silikonskega olja, vanj vlili pripravljeno vodno raztopino PVA ter tako dobili emulzijo, ki smo jo homogenizirali z rotor-stator homogenizatorjem 5 minut pri 10 000 obratov/min. Nastalo emulzijo voda v olju smo takoj prenesli v zamrzovalnik in jo izpostavili enemu ali trem ciklom zamrzovanja na -22°C 20 h in odtajevanja pri sobni temperaturi 4 h. Pri tem je emulzija prešla v suspenzijo delcev PVA v silikonskem olju. Nastale delce smo nato ekstrahirali z acetonom v volumskem razmerju 1:10, njihovo prisotnost in karakterizacijo v acetonu pa izvedli z zetasizerjem po centrifugiranju pri 4000 rpm 5 minut. Dodatno smo vzorce analizirali tudi po enem tednu stanja v hladilniku, saj smo želeli, da se posedejo morebitni ostanki silikonskega olja v acetonu in bi tako po ponovnem merjenju preverili, ali so res nastali nanodelci. Enak postopek smo izvedli še z Miowol® 20-98 z 10% raztopino ter z 15% raztopino Miowol® 10-98.

Zaradi težav z ločevanjem silikonskega olja in acetona pri ekstrakciji (silikonskega olja namreč popolnoma ni bilo mogoče odstraniti) smo poskusili silikonskemu olju najti zamenjavo. Namesto njega smo uporabili še etilacetat, benzilni alkohol, butil laktat in olivno olje. Da bi dosegli hitrejšo zamrznitev notranje faze emulzije smo zamrzovanje v zamrzovalniku poskusili nadomestiti z zamrzovanjem v tekočem dušiku.

## 6. REZULTATI IN RAZPRAVA

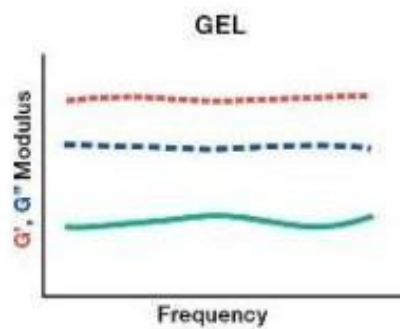
### 6.1. REZULTATI REOLOŠKEGA VREDNOTENJA HIDROGELOV

Rotacijske in oscilacijske reološke teste smo izvajali na sveže izdelanih hidrogelih, saj staranje znatno vpliva na strukturo hidrogelov. Glede na literaturne podatke se s staranjem povečujejo kristalinična področja. Molekule topila med sabo namreč interagirajo, kar povzroči sprostitvev hidroksilnih polimernih skupin, ki sedaj lahko sodelujejo v kristalizaciji, posledično pa to vodi do fazne separacije (1).

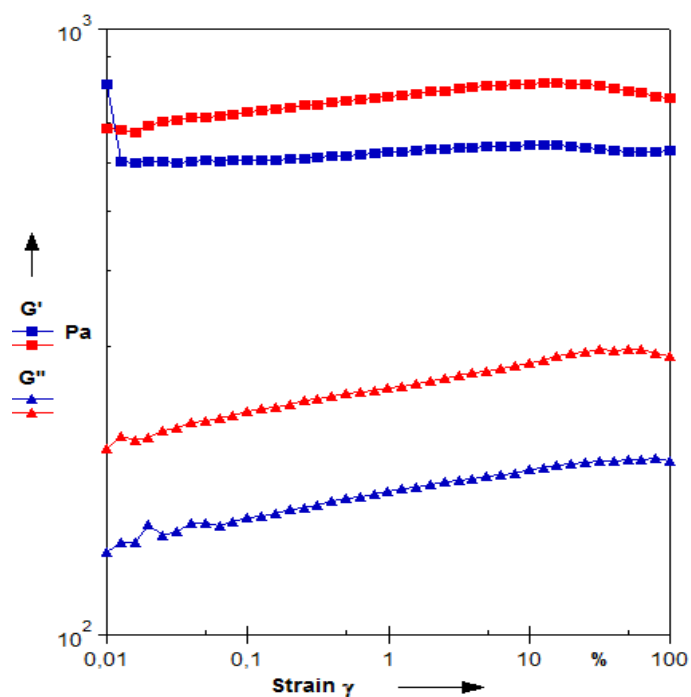
Sprva smo poskusili z meritvami klasične rotacijske viskoznosti z uporabo sistema stožec-plošča, kjer smo merili viskoznost v odvisnosti od strižne hitrosti. Ko smo gel stisnili med stožec in ploščo, se je gel strgal, nato pa med povečevanjem strižne hitrosti izhajal iz reže med ploščama. V reži med stožcem in ploščo so ostali le še koščki gela, ki pa so bili premajhni za pravilno določitev viskoznosti oziroma merjeni vzorec ni bil enak izhodnemu materialu. Na podlagi tega smo se odločili za določitev dinamičnih modulov (elastičnega- $G'$  in plastičnega- $G''$  modula) z uporabo oscilacijske reometrije.

Najprej smo na vzorcih naredili amplitudni test z namenom ugotavljanja območja linearne viskoelastičnosti. Rezultati so pokazali, da je bil elastični modul ( $G'$ ) za večino preskušanih vzorcev skozi celotno frekvenčno območje konstanten, viskozni (plastični) modul ( $G''$ ) pa je rahlo padal (Slika 18), pri čemer je vrednost elastičnega modula vedno presegala vrednost plastičnega. Izjema so bili 5% geli z enim ciklom zamrzovanja in odtajevanja. Za vse ostale vzorce na podlagi teh rezultatov lahko potrdimo gelsko strukturo vzorcev, saj je gelsko obnašanje tipično za tako strukturirane sisteme s tridimenzionalno mrežo (Slika 17) (36). Na osnovi amplitudnih testov smo določili strižno deformacijo znotraj LVE in sicer  $\gamma = 0.1$ . Pri tej deformaciji smo nato začeli z izvajanjem frekvenčnih testov.

Ugotovili smo, da je elastični modul  $G'$  praktično neodvisen od frekvence oscilacije, medtem ko  $G''$  rahlo pada. Takšni mehanski spektri so značilni za gelsko strukturo in s pomočjo dobljenih rezultatov smo preučevali vpliv koncentracije hidrogelov, števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja ter molekulske mase PVA na  $G'$  in  $G''$ .



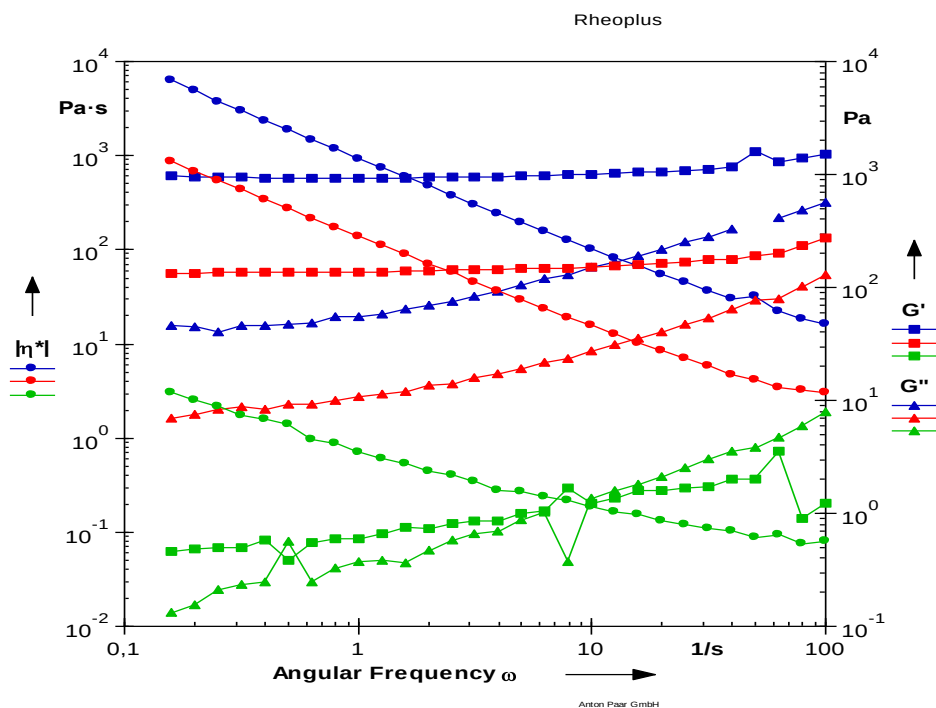
Slika 17: Tipičen rezultat meritve dinamičnih modulov gela.



Slika 18: Amplitudni test 15% hidrogela iz Mowiola® 20-98 po enem ciklu zamrzovanja in odtajevanja.

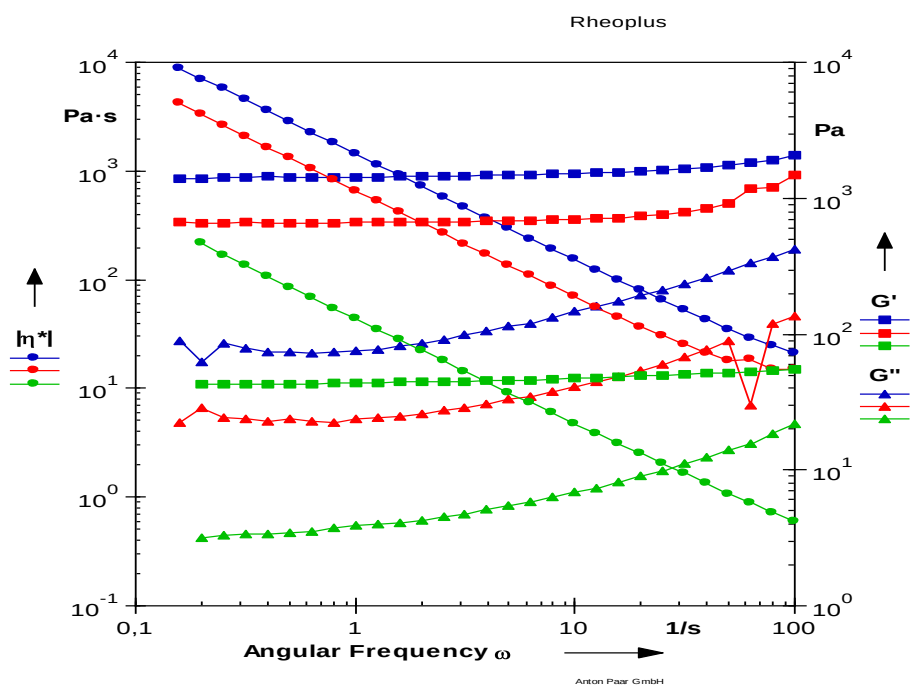
### 6.1.1. Vpliv koncentracije PVA

Proučevali smo, kako koncentracija PVA vpliva na reološke parametre  $G'$  in  $G''$ . Primerjali smo hidrokele, ki so bili izpostavljeni različnemu številu ciklov zamrzovanja in odtajevanja.



■ 15%, 20-98, 1c ■ 10%, 20-98, 1c ■ 5%, 20-98, 1c

Slika 19: Vpliv koncentracije na  $G'$  in  $G''$  pri hidrogelih z enim ciklom zamrzovanja iz Mowiola® 20-98.



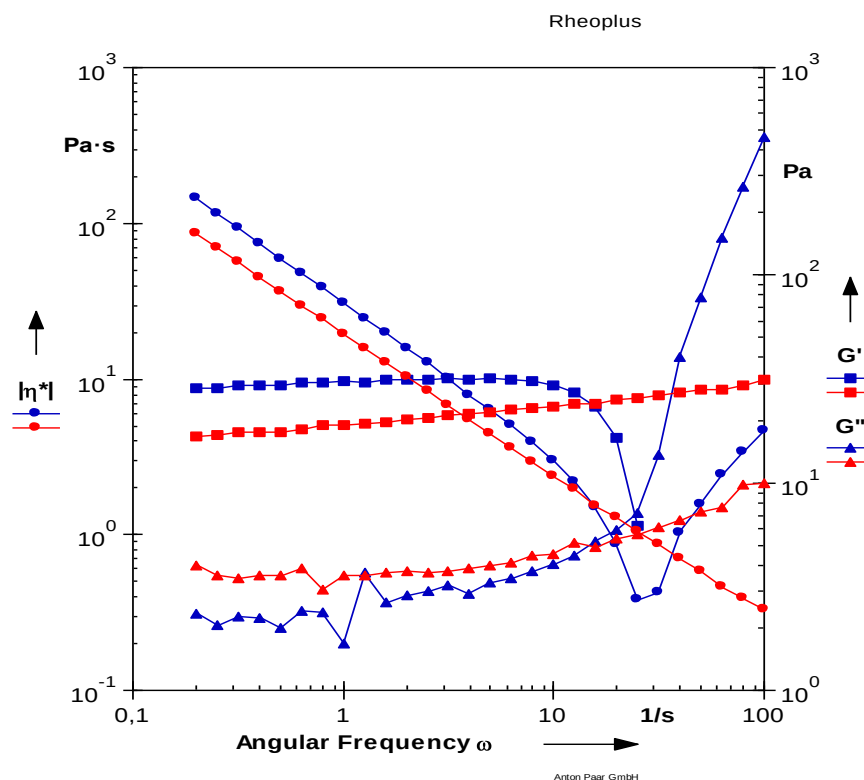
■ 15%, 20-98, 2c ■ 10%, 20-98, 2c ■ 5%, 20-98, 2c

Slika 20: Vpliv koncentracije na  $G'$  in  $G''$  pri hidrogelih z dvema cikloma zamrzovanja in odtajevanja iz Mowiola® 20-98.

Iz slik 19 in 20 je razvidno, da se z višanjem koncentracije PVA povečata tako elastičnost kot tudi kompleksna viskoznost vzorcev. Vrednosti  $G'$  so pri 10% in 15 % hidrogelih zelo visoke in sicer za 10% hidrogel po treh ciklih zamrzovanja in odtajevanja iz Miowola 20-98 je  $G'$  1830 Pa, za 15% hidrogel pa 3420 Pa (povprečna vrednost pri frekvencah od 0,1 do 100  $s^{-1}$ ). Elastični modul za 5% hidrogel pa je precej nižji in sicer 275 Pa. Velja poudariti, da 5% hidrogeli po enem samem ciklu zamrzovanja in odtajevanja skorajda niso nastali, gelska struktura je bila zelo šibka, pravzaprav tekoča, rokovanje z njimi pa zelo zahtevno. Ker aplikacija vzorca v sistem plošča-plošča zaradi šibke strukture ni bila mogoča, smo vzorce pomerili s sistemom stožec-plošča pri enakih nastavitvah kot ostale vzorce. Na sliki 19 pa vidimo, da je kljub temu prišlo do spodrsavanja merilnega sistema, zato vrednosti  $G'$  in  $G''$  zelo nihajo (Slika 19). Enak pojav je bilo možno opaziti tudi pri 5% hidrogelih po dveh ciklih zamrzovanja in odtajevanja (Slika 20), po treh ciklih pa so bili vzorci že dovolj čvrsti za meritve s sistemom plošča-plošča.

Ugotovili smo, da neposredna primerjava meritev z uporabo različnih sistemov (plošča-plošča in stožec-plošča) ni možna, saj smo pri testiranju enakega vzorca opazili manjše razlike v meritvah med enim in drugim sistemom. Kot lahko vidimo na sliki 21 pri enakem vzorcu s sistemom stožec-plošča (rdeča krivulja) v celotnem frekvenčnem območju izmerimo nižjo  $G'$  in višji  $G''$  kot z uporabo sistema plošča-plošča. Po drugi strani pa je z uporabo sistema plošča-plošča po frekvenci 25  $s^{-1}$  elastični modul zelo padel, česar pri sistemu stožec-plošča nismo opazili.  $G'$  je pri nižjih frekvencah linearen, vendar je vrednost precej višja kot pri sistemu stožec-plošča (za kar približno 70%).  $G''$  v tem primeru najprej počasi raste in je za zopet približno 70% nižji kot v sistemu stožec-plošča, nato pa po frekvenci 25  $s^{-1}$  zelo hitro naraste. V teh primerih ne gre za splošne ugotovitve, pač pa je potrebno pogledat vsak vzorec posebej in poiskati najoptimalnejše pogoje in sistem.





■ 5%, 10-98, 3c      ■ 5%, 10-98, 3c CP

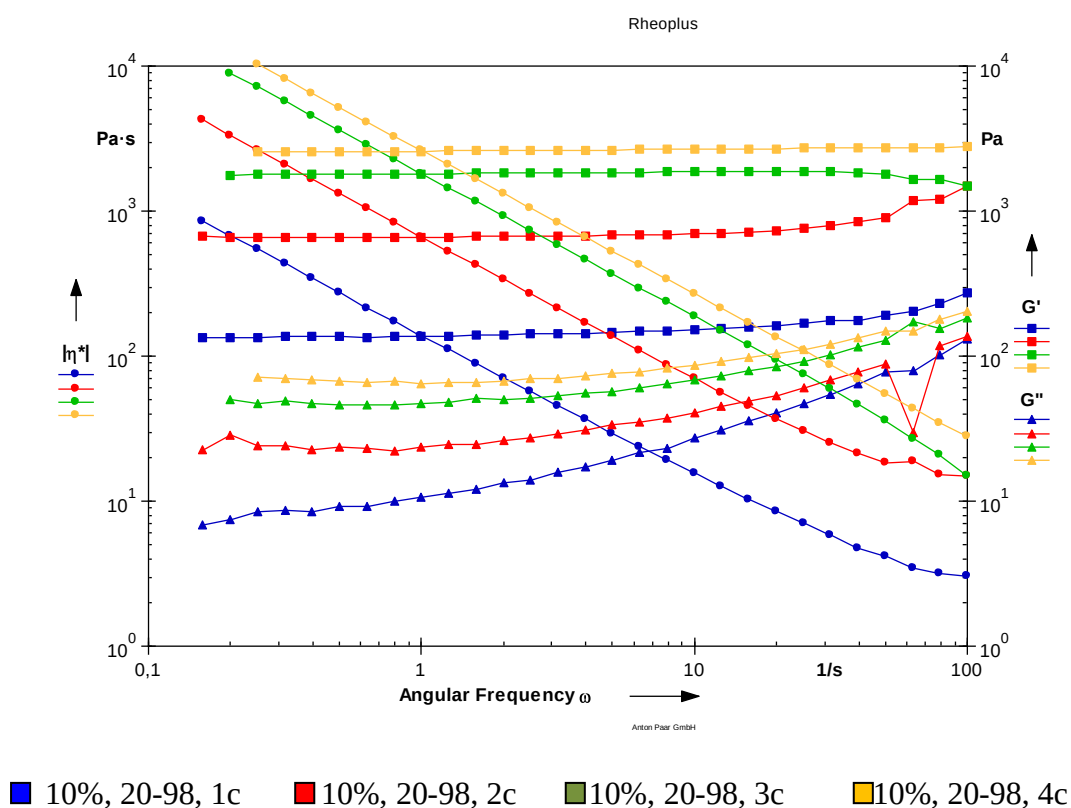
Slika 21: Vrednosti  $G'$  in  $G''$  pri 5% hidrogelu iz Mowiola® 10-98 po treh ciklih zamrzovanja in odtajevanja merjene s sistemom stožec plošča in plošča-plošča.

Če primerjamo rezultate pridobljene s sistemom plošča-plošča lahko zaključimo, da se z višanjem koncentracije PVA hidrogelov z enakim številom ciklov in enako molekulsko maso polimera vrednosti reoloških parametrov  $G'$  in  $G''$  povišujejo (Slika 19 in 20). Z večanjem koncentracije se poveča strukturiranost in čvrstost vzorca. Pri višji polimerni koncentraciji so polimerne molekule bližje skupaj, kar omogoči več povezav med verigami, med zamrzovanjem in odtajevanjem, tako nastane več kristaliničnih področij, ki učvrstijo strukturo gela, večja je elastična komponenta nastalega gela. Pri 5% koncentraciji PVA v vodnem mediju, so molekule med seboj precej oddaljene in prihaja več do intramolekularnih kot intermolekularnih povezav, zato je nastala gelska struktura šibka oziroma polimer ostaja v obliki koloidne disperzije. Za tvorbo čvrstejšje gelske strukture je torej potrebna višja koncentracija PVA polimera.

### 6.1.2. Vpliv števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja

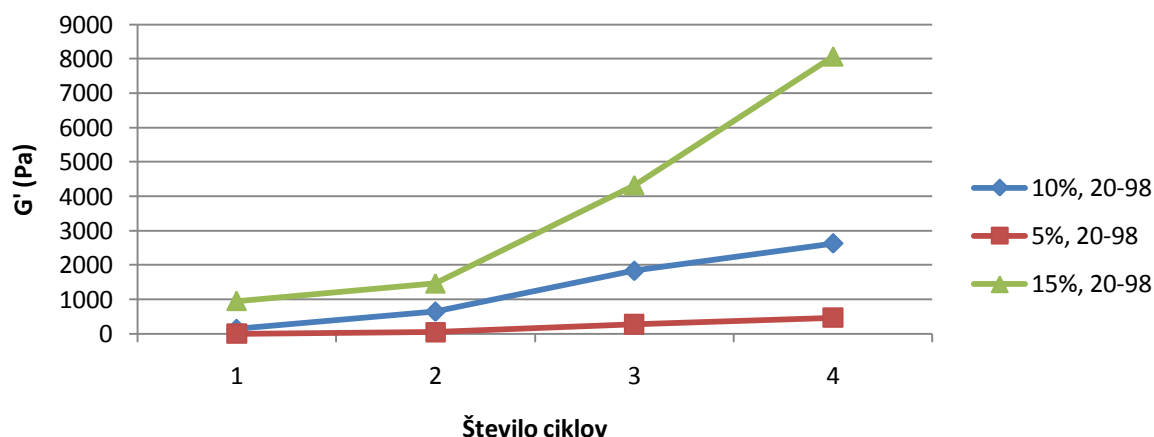
Med eksperimentalnim delom smo že na pogled videli, da število ciklov zamrzovanja in odtajevanja zelo vpliva na lastnosti hidrogelov, saj so z večanjem števila ciklov nastajali vedno bolj čvrsti hidrogeli, z reološkim vrednotenjem pa smo naša opažanja tudi potrdili.

Ugotovili smo, da se ne glede na molsko maso in koncentracijo PVA v hidrogelu z večanjem števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja mehanske lastnosti gelov izboljšujejo, večje število ciklov povečuje tako elastični kot plastični modul (Slika 22).



Slika 22: Vpliv števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja na  $G'$  in  $G''$  pri 10% hidrogelih iz Mowiol® 20-98.

Iz slike 23 je razvidno, da se  $G'$  pri 15% koncentraciji PVA bolj strmo povečuje kot pri 10% ali 5% koncentraciji, kar pomeni, da število kristaliničnih področji z večanjem koncentracije PVA in števila ciklov ne narašča linearno. Elastični modul se najmanj poveča med prvim in drugim ciklom zamrzovanja, potem pa narašča hitreje.

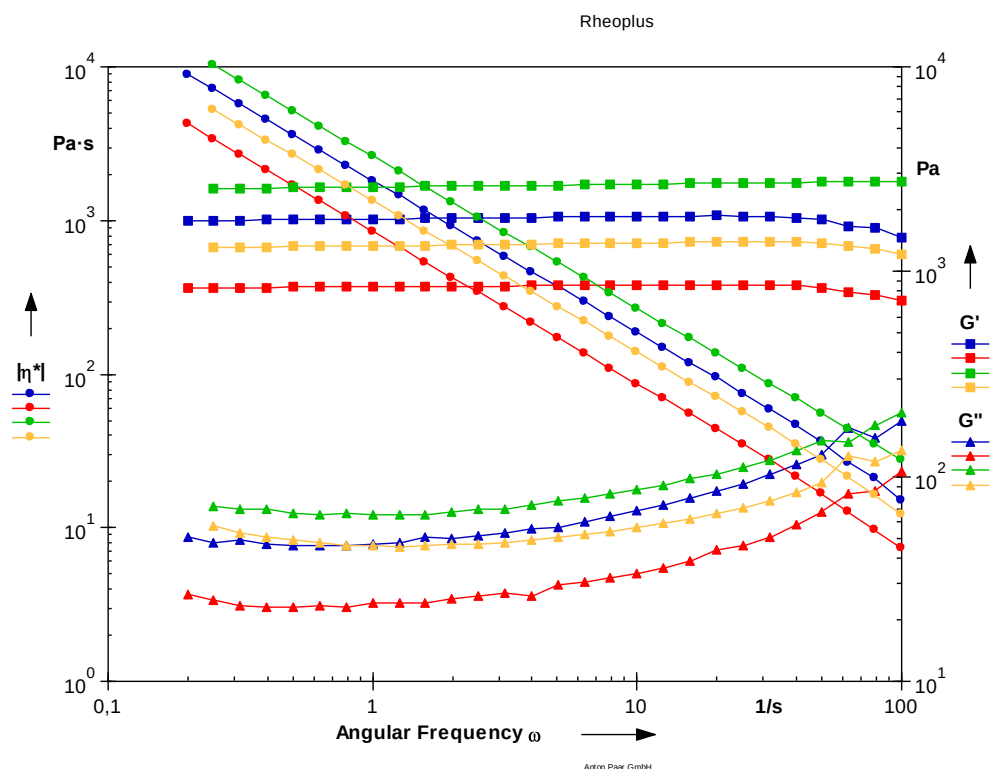


Slika 23: Vpliv števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja na vrednost elastičnega modula  $G'$  pri frekvenci  $3,16 \text{ s}^{-1}$

Dobljene rezultate lahko razložimo na sledeč način. Večanje števila ciklov povzroči vedno večje število polimernih verig, ki se vključujejo v tvorbo kristalizacijskih področij, zato ta postajajo vedno večja, možno je tudi, da narašča število kristaliničnih področij, kar oboje vodi v tvorbo čvrstjšega hidrogela. Pri prvem ciklu nastanejo primarna kristalizacijska področja, ki se nato z večanjem števila ciklov povečujejo, dodatno pa pri nadaljnjih cikli nastajajo nova, sekundarna kristalizacijska področja, ki strukturo hidrogela dodatno ojačijo (27). Posledično se s tem debelijo stene por hidrogela, s polimerom revna področja pa postajajo večja (Slika 12). Poleg tega znotraj večjih por zaradi nastanka sekundarnih kristalizacijskih področij nastanejo nove, manjše pore.

### 6.1.3. Vpliv molekulske mase PVA

Ob preučevanju hidrogelov dveh različnih molekulskih mas smo ugotovili, da se z višanjem molekulske mase PVA (Mowiol® 20-98) ob enakih koncentracijah in enakim številom ciklov zamrzovanja in odtajevanj,  $G'$  in  $G''$  povečata (Slika 24).



■ 10%, 20-98, 3c    ■ 10%, 10-98, 3c    ■ 10%, 20-98, 4c    ■ 10%, 10-98, 4c

Slika 24: Vpliv molekulske mase na  $G'$  in  $G''$  10% hidrogelov izdelanih s tremi in štirimi cikli zamrzovanja in odtajevanja.

Razlika med elastičnim in plastičnim modulom pa se z večanjem števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja za PVA različnih molekulskih mas zmanjšuje. Iz tega lahko sklepamo, da sicer molekulska masa vpliva na mehanske lastnosti vzorca, vendar pa v fazi, ko je vedno več polimernih verig vključenih v kristalizacijska področja (to je ob večanju števila ciklov), molekulska masa ne igra pomembne vloge pri čvrstosti gela.

#### 6.1.4. Predpostavljen vpliv razlik v reoloških parametrih na sproščanje modelnega proteina

Glede na to, da se z večanjem koncentracije ter molekulske mase PVA in števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja čvrstost hidrogelov povečuje, smo predvidevali, da se bo vpliv spremenjenih lastnosti odrazil tudi na hitrosti sproščanja modelnega proteina (jajčnega albumina). Večanje mehanske trdnosti hidrogelov namreč zmanjšuje celokupno poroznost le-teh, s tem pa se lahko upočasnjuje sproščanje.

## 6.2.SPROŠČANJE ALBUMINA IZ HIDROGELOV

### 6.2.1. Določitev enačbe umeritvene premice

Izdelali smo različne koncentracije jajčnega albumina (MM 44 kDa) ter jih ovrednotili s HPLC metodo. Temu primerno smo izbrali tudi HPLC kolono, ki je bila primerna za določitev molekulske mase od 4 do 400 kDa. Ostali eksperimentalni podatki so opisani v poglavju 3.5.1.

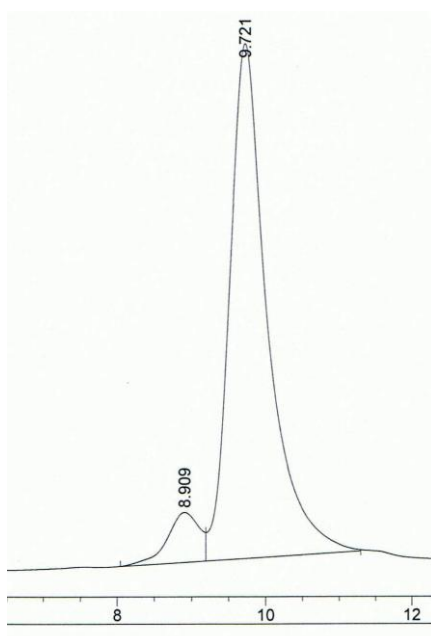
Slika 25 prikazuje tipičen HPLC kromatogram raztopine jajčnega albumina. Na kromatogramu je jasno viden kromatografski vrh z retencijskim časom okrog 10 minut. Z višanjem koncentracije albumina se je pojavil še dodatni vrh z retencijskim časom 9 minut. Ker tudi ta kromatografski vrh predstavlja albumin (4), smo iz podatkov o površini pod obema krivuljama pri različnih koncentracijah postavili umeritveno premico z enačbo:

Enačba umeritvene premice:

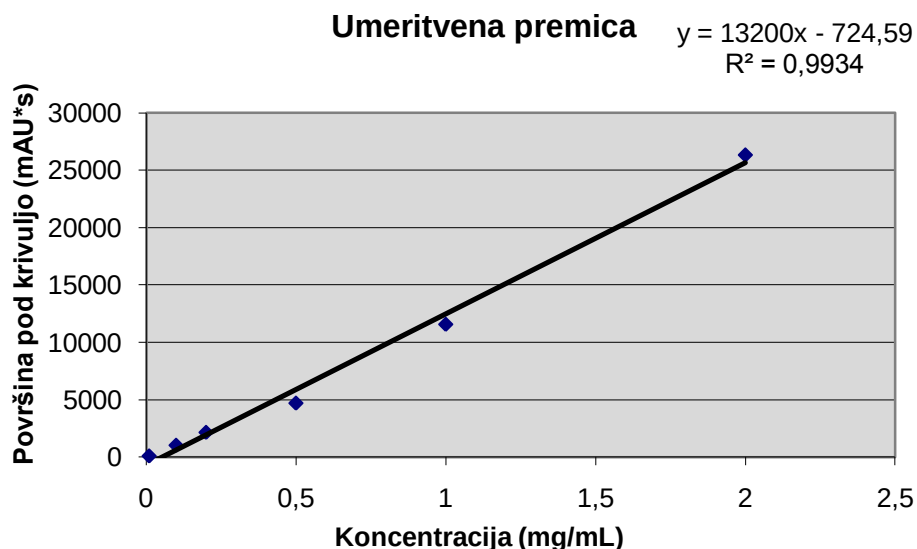
$$A=13200 \cdot c - 724,59 \rightarrow c(\text{mg/mL}) = (A + 724,59) / 13200 \quad (\text{enačba 3})$$

A... površina pod krivuljo (vrh 9 in 10 minut)

c... koncentracija albumina



Slika 25: Primer kromatograma jajčnega albumina med testiranjem sproščanja.



*Slika 26: Odvisnost vsote površin pod krivuljo albumina v odvisnosti od njegove koncentracije v mobilni fazi.*

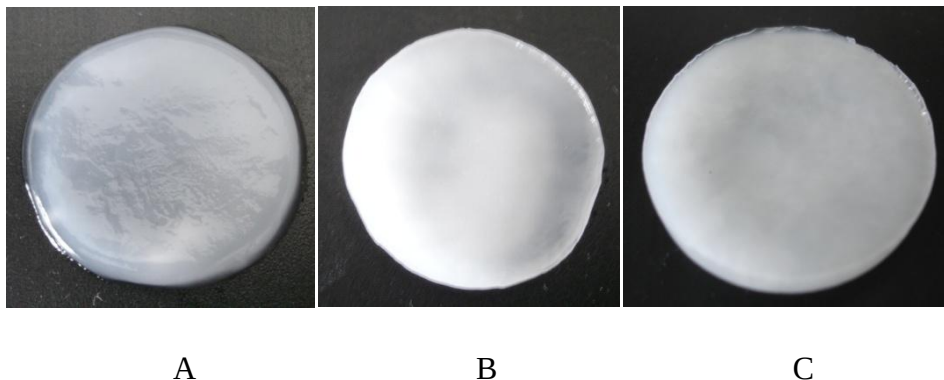
#### **6.2.2. Rezultati testa sproščanja albumina iz hidrogelov**

Preskusa sproščanja nismo izvedli po standardnih farmakopejskih metodah, pač pa smo uporabili alternativno metodo (4). Izdelane hidrokele smo namreč želeli uporabiti kot sodobne obloge za vlažno celjenje ran. Po drugi strani pa smo seveda nameravali ovrednotiti sproščanje učinkovine v čim manjši količini in pridobiti podatke, kako struktura hidrogela vpliva na sproščanje proteinske molekule.

Izdelava hidrogelov, iz katerih smo spremljali sproščanje proteina, je trajala 5 dni, saj smo gele izpostavili različnim številom ciklov zamrzovanja in odtajevanja. Zadnji dan (petek) smo hidrokele po končanem zadnjem ciklu odtajevanja postavili v hladilnik (4°C) čez vikend, v ponedeljek pa pričeli s testiranjem sproščanja. V času shranjevanja so hidrogeli ostali mikrobiološko stabilni, saj kljub temu, da nismo uporabili konzervansa, ni bilo vidnih nobenih sprememb, prav tako tudi ne med samim izvajanjem preskusa.

Nastali hidrogeli so bili po izpostavitvi različnemu številu ciklov zamrzovanja in odtajevanja na pogled in otip večinoma precej čvrsti, posebno tisti z višjo koncentracijo PVA in z večjim številom ciklov zamrzovanja in odtajevanja, kot smo dokazali z reološkimi meritvami. Njihovo konsistenco bi lahko opisali s konsistenco gumijastih bombonov (Slika 27). Zato med poskusom sproščanja ni bilo težko določiti meje med hidrogelom in medijem za sproščanje (PBS s pH=7), meja je bilo jasno vidna in se je

ohranila tudi ves čas sproščanja. Med sproščanjem je prihajalo do erozije polimera, kar pa na vzorčenje ni imelo večjega vpliva.



*Slika 27: Fotografije 5% (A), 10% (B) in 15% (C) hidrogela po 4 ciklih zamrzovanja in odtajevanja.*

#### 6.2.2.1. Vpliv števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja hidrogelov

##### A. Hidrogeli iz Mowiola® 10-98

###### ➤ 5% hidrogeli

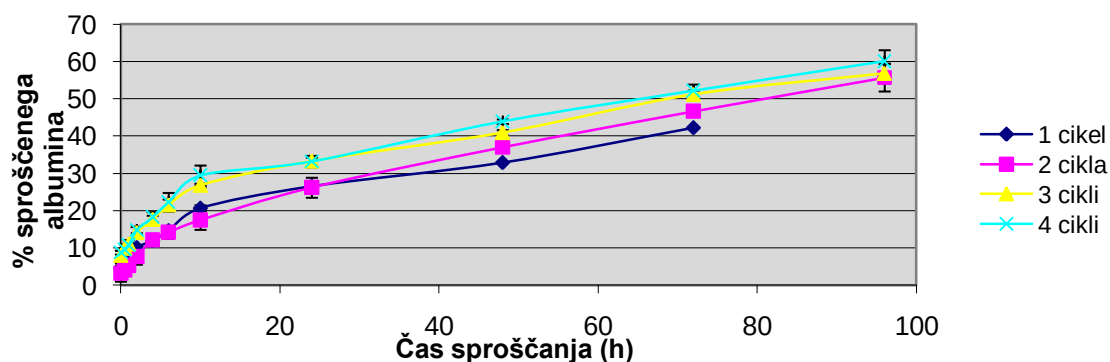
5% geli so imeli najšibkejšo konsistenco, ki je bila odvisna od števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja, kar smo dokazali tudi z reološkimi meritvami. Več ciklov zamrzovanja in odtajevanja se je odrazilo že v vizualnih spremembah: hidrogeli pridobljeni z več cikli so bili bolj motne belkaste barve, medtem ko so pri manjšem številu ciklov hidrogeli bolj prosojni.

Hidrogeli pridobljeni po enem ciklu so bili zelo rahle strukture, v mediju so lebdeli, zato pogoji za sproščanje niso bili enaki kot pri ostalih hidrogelih, saj se je učinkovina sproščala iz celotne površine hidrogela, medtem ko je bila pri ostalih gelih v stiku z medijem le zgornja površina hidrogela. Kljub temu je bil medij dobro ločen od hidrogela in se z njim ni mešal, zato z vzorčenjem na začetku nismo imeli težav. Poleg tega sta dva od treh vzorcev po 48 h razpadla, kar lahko pripišemo sami strukturi izdelanega hidrogela.

Glede na rezultate reološkega vrednotenja 5% hidrogela po enem ciklu zamrzovanja in odtajevanja lahko namreč sklepamo, da z enim ciklom 5% PVA vzorec ne tvori prave gelske strukture, in ostane v obliki visoko koncentrirane koloidne disperzije. V raztopini so prisotne le hidratirane nabrekle molekule PVA, tvorile pa so se pretežno intramolekularne

ter vodikove vezi med PVA in vodo. Delež intermolekularnih vezi, ki so najpomembnejše za nastanek hidrogela, pa je zaradi velike oddaljenosti verig zelo majhen in tako premajhen za tvorbo gelske strukture. Šele po treh ciklih zamrzovanja in odtajevanja se je tvorilo dovolj H vezi, posledično je bil hidrogel čvrstejši.

Zanimivo pa je, da kljub dokazani reološki različenosti med preskušanimi vzorci, tega rezultati sproščanja ne kažejo, saj so razlike v sproščanju med vzorci zelo majhne (Slika 28). Kaže celo, da je sproščanje pri manjšem številu ciklov počasnejše. To pomeni, da bolj čvrsta struktura še ne zagotavlja bolj upočasnjene sproščanja. Iz dobljenih rezultatov sproščanja lahko opazimo, da sproščanje prvih 10 ur poteka hitreje, nato pa se upočasni. Iz linearnosti krivulje v posameznih hitrostnih fazah je razvidno tudi, da sproščanje v obeh fazah poteka enakomerno.



Slika 28: Profil sproščanja albumina iz 5% PVA hidrogelov iz Mowiola® 10-98 narejenih z enim, dvema, tremi in štirimi cikli zamrzovanja in odtajevanja.

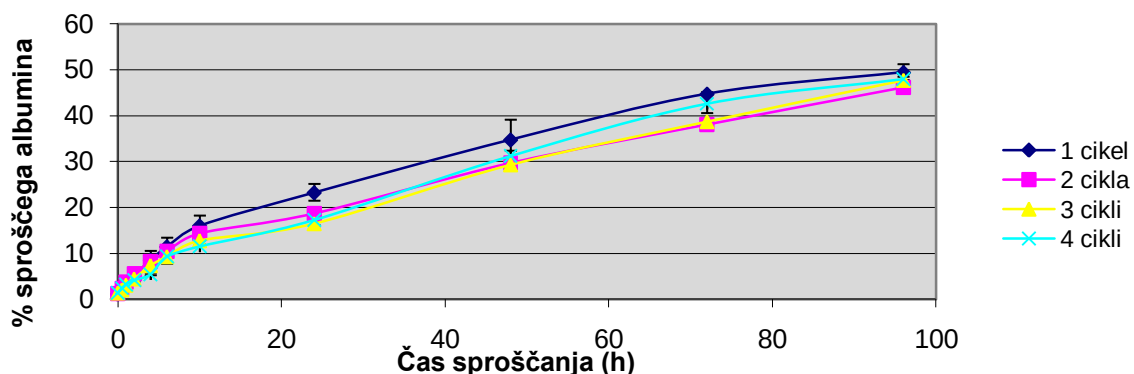
Profili sproščanja se glede na število ciklov med sabo signifikantno ne razlikujejo, končni odstotek sproščene učinkovine pa je pri vseh med 55 in 60% celokupnega vgrajenega albumina. Opazimo lahko precejšno razliko v začetnem porastu koncentracije (t.i. burst efekt), ki se z večanjem števila ciklov povečuje in ne zmanjšuje, kot bi pričakovali. Eden od možnih vzrokov za ta pojav je, da je albumin sposoben tvoriti močne vodikove vezi s PVA preko amidnih, tiolnih, hidroksilnih in aminskih skupin stranskih verig aminokislin. Pri 5% hidrogelu z nizkim številom zamrzovanja in odtajevanja, kjer hidrogel skoraj ne nastane, so torej OH skupine polimera proste in lahko tvorijo številne H vezi z albuminom, ter mu tako preprečujejo sproščanje v medij. Z večanjem števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja vedno več verig PVA vstopa v medsebojne interakcije, zato se molekule



albumina sprostijo in so na voljo za sproščanje. Prav zaradi tega se delež sproščenega albumina iz 5% hidrogelov z večanjem števila ciklov nekoliko poveča in ne zmanjša.

### ➤ 10% hidrogeli

Vsi 10% hidrogeli so ne glede na število ciklov zamrzovanja in odtajevanja strukturno čvrstejši kot katerikoli 5% hidrogel.

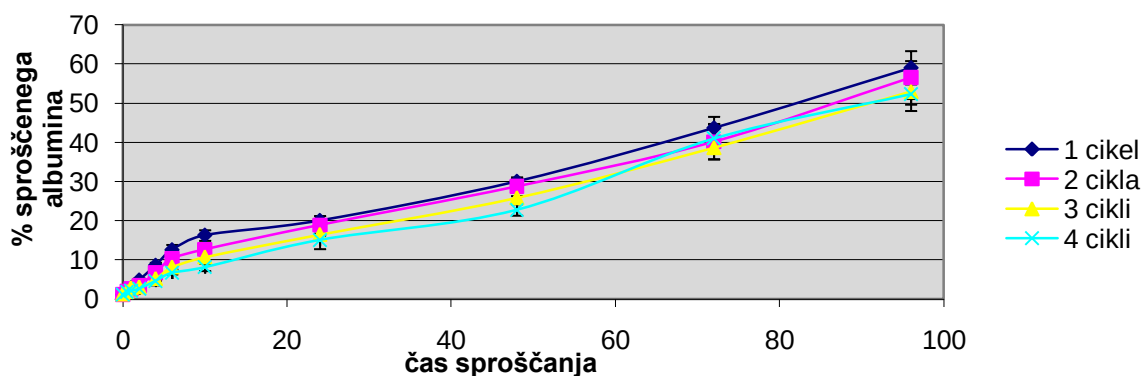


Slika 29: Profil sproščanja albumina iz 10% PVA hidrogelov iz Mowiola® 10-98 narejenih z enim, dvema, tremi in štirimi cikli zamrzovanja in odtajevanja.

Profili sproščanja so prikazani na sliki 29. Iz teh profilov ponovno opazimo hitrejšo sproščanje do desete ure nato počasnejše, vendar vedno z enakomerno hitrostjo v posameznih fazah. Ponovno so razlike v sproščanju glede na število ciklov zamrzovanja in odtajevanja majhne in na koncu se pri vseh hidrogelih sprosti od 46 do 50% albumina vgrajenega v hidrogel. Takšno obnašanje lahko pripišemo tekmovalni dveh pojavov. Po eni strani interakcije polimer – albumin upočasnijo sproščanje, interakcije polimer – polimer pa ga pospešijo, saj izpodrivajo molekule albumina iz vezavnih mest na polimeru. Hkrati pa z večanjem gostote mreže polimernega matriksa na zmanjšano sproščanje vpliva tudi upočasnjena difuzija.

### ➤ 15% hidrogeli

Hidrogeli iz 15% PVA so zelo čvrsti že po prvem ciklu zamrzovanja in odtajevanja. Nekaj težav je povzročal hidrogel zaradi nabrekanja, saj se je njegov volumen po 24 urah zelo povečal, čaša z vzorcem je postala preozka, hidrogel se je na eni strani zavihal nekoliko navzgor, zato je bila v stiku z medijem nekoliko večja površina hidrogela. To pa lahko povzroči nekoliko hitrejšo sproščanje.



Slika 30: Profil sproščanja albumina iz 15% PVA hidrogelov iz Mowiola® 10-98 narejenih z enim, dvema, tremi in štirimi cikli zamrzovanja in odtajevanja.

Ponovno je sproščanje na začetku hitrejše, vendar v teh primerih le nekje do šeste ure, nato se upočasni, ves čas pa je enakomerno. Opazen je trend, da se z večanjem števila ciklov sproščanje upočasni, razlike pa niso signifikantno različne. Po 96 urah se je sprostil med 52 in 59 % vgrajenega albumina.

Večje število ciklov se je kazalo v manjšem t.i. »burst« efektu, a se je kasneje hitrost sproščanja izenačila. Pričakovali bi, da bo sproščanje glede na čvrstost hidrogelov precej počasnejše kot pri 5% in 10% hidrogelih, vendar tega nismo opazili. Eden od možnih razlogov je ponovno manjša vezava albumina na verige PVA, saj so le-te v močnih medsebojnih interakcijah. Z večanjem števila ciklov se verige še približujejo in iz vmesnih prostorov iztiskajo molekule albumina. Teh je nato več v področjih revnih z polimerom, zato je ovira za sproščanje manjša. Prav tako se velikost por nastalih po večjem številu ciklov lahko poveča, stene s polimerom se učvrstijo, sproščanje se pospeši. To pomeni, da na eni strani interakcije polimer - učinkovina sproščanje upočasni, inerakcija polimer-polimer pa sproščanje lahko celo pospešijo.

Glede na pridobljene rezultate lahko sklepamo, da število ciklov zamrzovanja in odtajevanja ne vpliva signifikantno na sproščanje albumina iz hidrogelov iz Mowiola® 10-98. Določen vpliv je opazen na začetku sproščanja (»burst release«), ki se z večanjem števila ciklov zmanjšuje, vendar pa se končna količina sproščenega albumina signifikantno ne razlikuje (le za nekaj odstotkov). Ima pa število ciklov vpliv na čvrstost hidrogela in na hitrost erozije PVA. Poleg tega na osnovi rezultatov sklepamo, da se z večanjem števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja izpodriva albumin z vezavnih mest na PVA, zato se

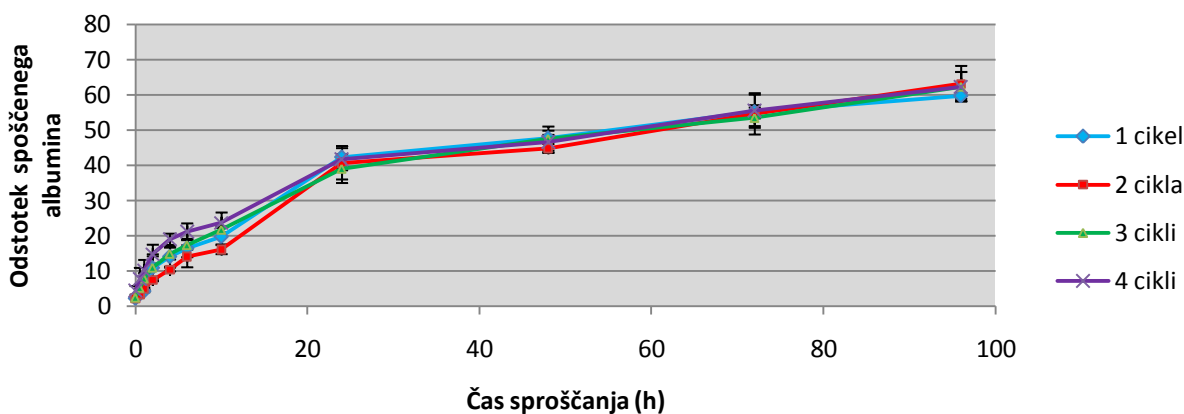
sproščanje albumina ne upočasni kljub več mehanskim oviram za sproščanje zaradi debelitve sten por.

## B. Hidrogeli iz Mowiola® 20-98

### ➤ 5% hidrogeli

Hidrogeli iz Mowiola® 20-98 se obnašajo zelo podobno kot tisti iz Mowiola® 10-98. Ko smo na 5% hidrogel, narejen z enim ciklom zamrzovanja in odtajevanja, nalili medij za sproščanje, ga je curek na sredini pretrgal. Hidrogel je nato med sproščanjem lebdel v mediju in sproščal učinkovino z večje površine kot ostali hidrogeli. Prav tako so vsi 5% hidrogeli s površine odpuščali delčke, ki so plavali v mediju. Predvidevamo lahko, da ti delčki predstavljajo premrežene verige PVA, med katerimi so nastale intermolekularne H vezi, vendar se le-ti še niso povezali med seboj, saj je koncentracija PVA prenizka.

Sproščanje je hitrejše do 24 ure in se šele nato upočasni in poteka enakomerno naslednje tri dni. Iz slike 31 je razvidno, da je sproščanje albumina ne glede na število ciklov zamrzovanja in odtajevanja zelo podobno. Na koncu se iz hidrogelov sprosti med 59 in 63% albumina.

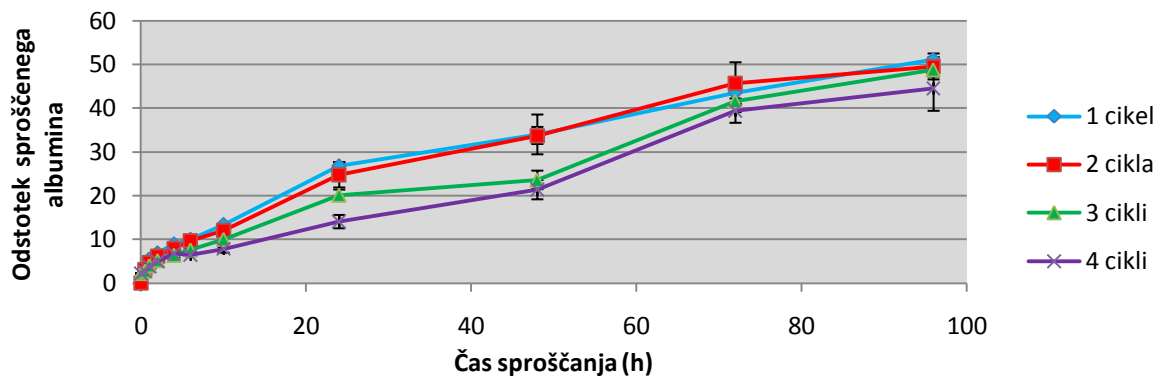


Slika 31: Profil sproščanja albumina iz 5% PVA hidrogelov iz Mowiola® 20-98 narejenih z enim, dvema, tremi in štirimi cikli zamrzovanja in odtajevanja.

### ➤ 10% hidrogeli

Hidrogeli pripravljani iz 10% raztopine PVA so bili čvrsti na otip in mlečno bele barve. Pri profilih sproščanja iz 10% hidrogelov (Slika 32) opazimo več razlik kot pri 5% hidrogelih. Profila sproščanja pri enem in dveh ciklih zamrzovanja sta si precej podobna, enako tudi po treh in štirih. Začetno sproščanje je pri vseh štirih hidrogelih zelo podobno do 8 ure,

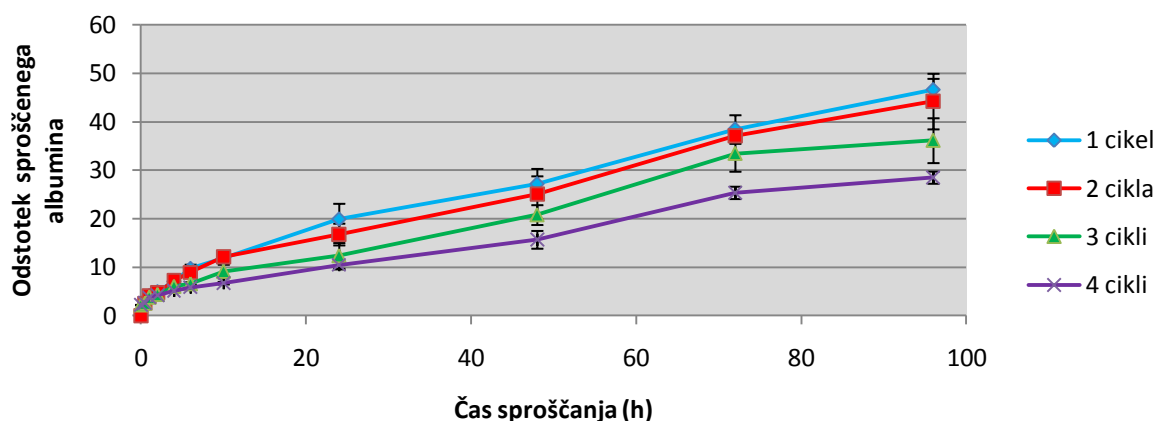
nato pa se razlike povečujejo. Na koncu se največ albumina sprosti iz gela za enim ciklom zamrzovanja in odtajevanja (51,1%), pri dveh ciklih se sprosti 49,5%, pri treh 48,8% in pri štirih ciklih najmanj (44,5%). Razlike so majhne, vendar večje kot pri 5% hidrogelih.



Slika 32: Profil sproščanja albumina iz 10% PVA hidrogelov iz Mowiola® 20-98 narejenih z enim, dvema, tremi in štirimi cikli zamrzovanja in odtajevanja.

#### ➤ 15% hidrogeli

Hidrogeli pripravljene iz 15% raztopine PVA so na otip zelo čvrsti in gumijaste konsistence. Med vsemi testiranimi hidrogeli tu opazimo največje razlike v profilih sproščanja albumina (Slika 33). Razlik do šeste ure sicer skoraj ni, potem pa s časom postajajo čedalje večje. V začetku ni opaziti izrazitega "burst" efekta, tako kot pri ostalih hidrogelih. Rezultati sproščanja iz hidrogelov po enem in dveh ciklih zamrzovanja sta ponovno precej bližje skupaj kot tista po treh ali štirih ciklih. Najbolj se razlikujejo profili tudi po količini celokupno sproščenega albuminu (en cikel 46,6%, dva cikla 44,2%, trije cikli 36,1% in štirje cikli 28,5%). S številom ciklov se sproščanje upočasnjuje, najverjetneje zaradi upočasnjene difuzije albumina skozi nastale pore.



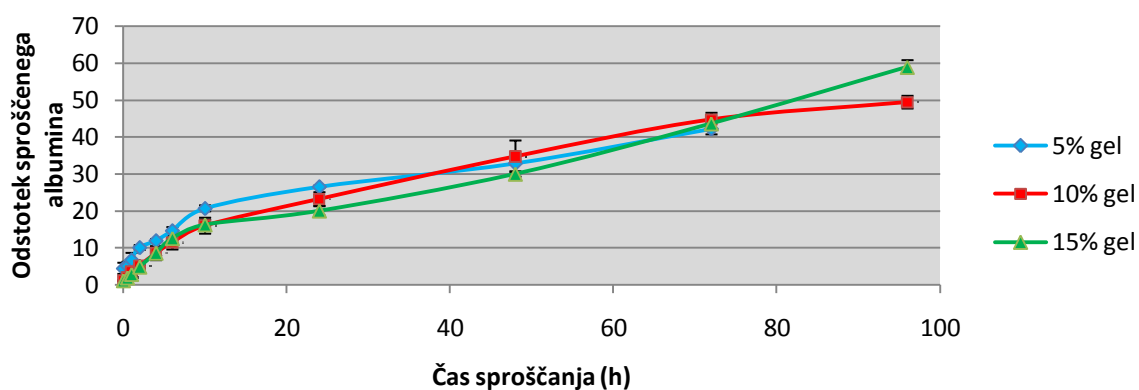
Slika 33: Profil sproščanja albumina iz 15% PVA hidrogelov iz Mowiola® 20-98 narejenih z enim, dvema, tremi in štirimi cikli zamrzovanja in odtajevanja.

Zaključimo lahko, da so 5% hidrogeli iz Mowiola® 20-98 prešibke strukture in ne izkazujejo nobenih razlik v sproščanju. Pri 10% hidrogelih opazimo razlike, največje pa so pri 15% hidrogelih, za katere lahko trdimo, da večanje števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja znatno zmanjša hitrost in obseg sproščanja. Prav tako pri 10 in 15% hidrogelih praktično ne zaznamo »burst« efekta.

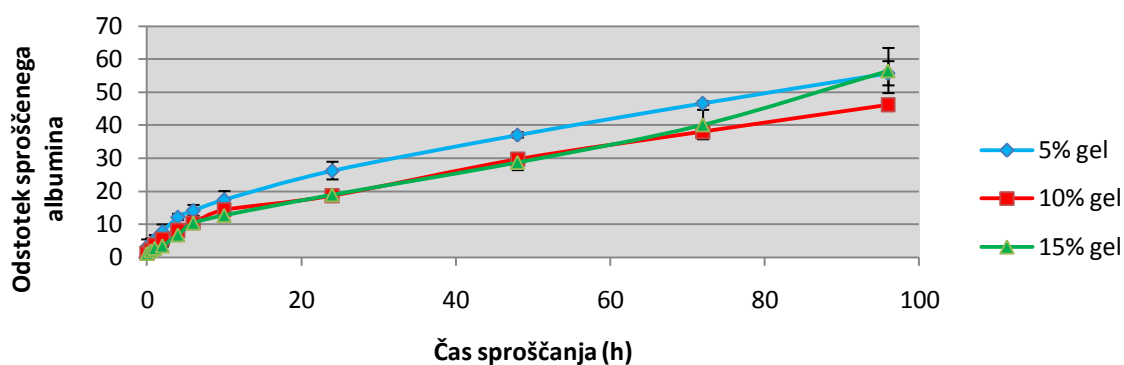
#### 6.2.2.2. Vpliv koncentracije polivinil alkohola na sproščanje albumina iz hidrogelov

##### A. Hidrogeli iz Mowiola® 10-98

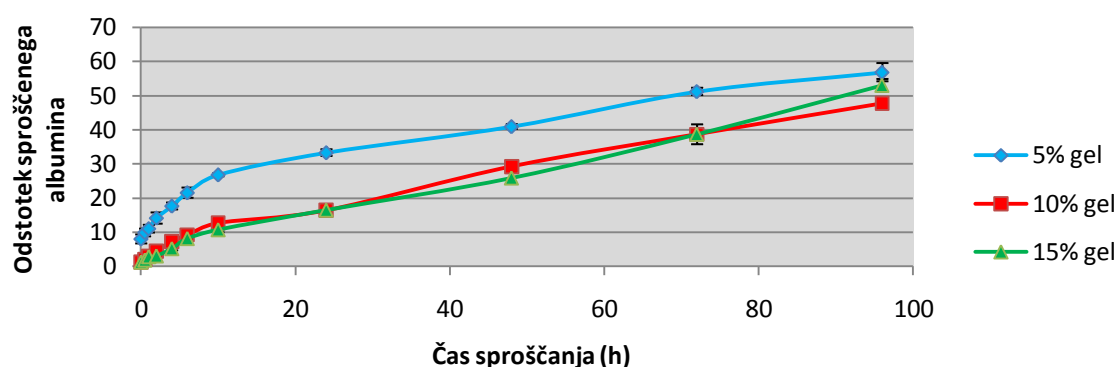
A



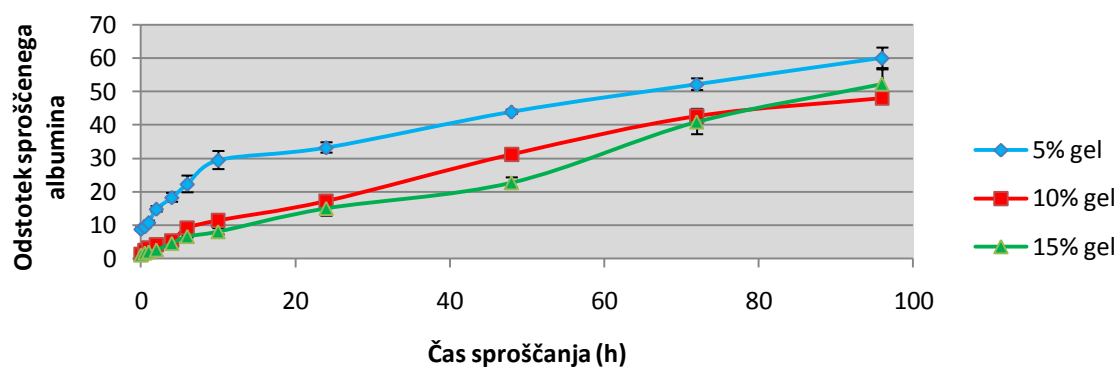
B



C



D



Slika 34: Sproščanje albumina iz 5%, 10% in 15% hidrogela iz Mowiola® 10-98 narejenega z enim (A), dvema (B), tremi (C) in štirimi (D) cikli zamrzovanja in odtajevanja.

Pri enem ciklu zamrzovanja in odtajevanja je razlika v profilu sproščanja z ozirom na različno koncentracijo PVA v hidrogelu minimalna (Slika 34A). Pri 5% hidrogelu je nekoliko večja začetna hitrost sproščanja kot pri 10 in 15%, ki imata na začetku praktično identičen profil, vendar pa so si po deseti uri sproščanja vsi profili zelo podobni.

Hidrogeli pripravljene z dvema cikloma zamrzovanja in odtajevanja (Slika 34B) se prav tako po profilu sproščanja znatno ne razlikujejo. 5% hidrogel ima sicer nekoliko hitrejšo začetno sproščanje, vendar pa se po štiriindvajsetih urah hitrost izenači z 10% hidrogelom in profila potekata praktično vzporedno. Do 72 ure sta profila 10 in 15% hidrogela praktično identična (točke se prekrivajo), nato pa se hitrost sproščanja iz 15% hidrogela nenavadno poveča. Temu je lahko vzrok nabrekanje hidrogela, ki je povzročilo, da je rob hidrogela odtopil od dna in se privihal navzgor, saj je čaša po širini postala premajhna za hidrogel, posledično večja površina izpostavljena mediju za sproščanje.

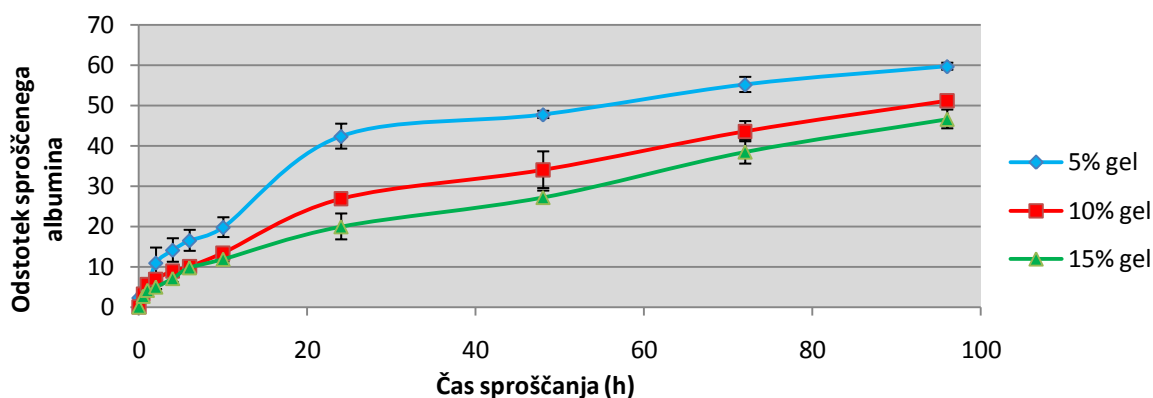
Pri treh ciklih zamrzovanja in odtajevanja (Slika 34C) smo opazili večjo razliko med hidrogeli. Sproščanje iz 10 in 15 % hidrogelov je počasnejše kot iz 5% hidrogela. Prav tako kot po dveh ciklih se tudi po treh ciklih zamrzovanja in odtajevanja hitrost sproščanja iz 15% hidrogela na koncu poveča. Podobno obnašanje opazimo tudi po štirih ciklih zamrzovanja in odtajevanja (Slika 34D).

Rezultati so tako pokazali, da se z višanjem koncentracije PVA v hidrogelu zmanjša začetni porast koncentracije albumina. Prav tako je sproščanje iz hidrogelov po 3 ali 4 ciklih počasnejše pri bolj koncentriranih hidrogelih.

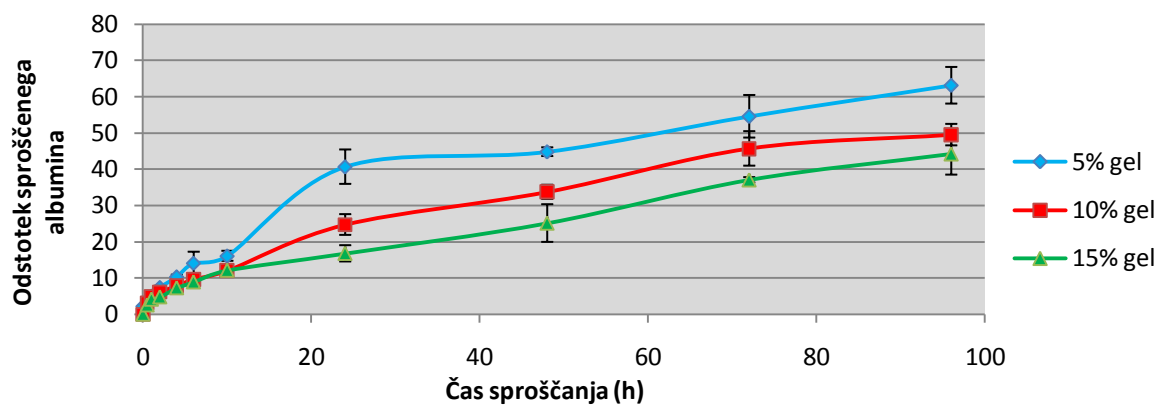
#### B. Hidrogeli iz Mowiola® 20-98

Spodnji grafi prikazujejo razlike v sproščanju albumina iz hidrogelov za različno koncentracijo enakega polimera z enakim številom ciklov zamrzovanja in odtajevanja.

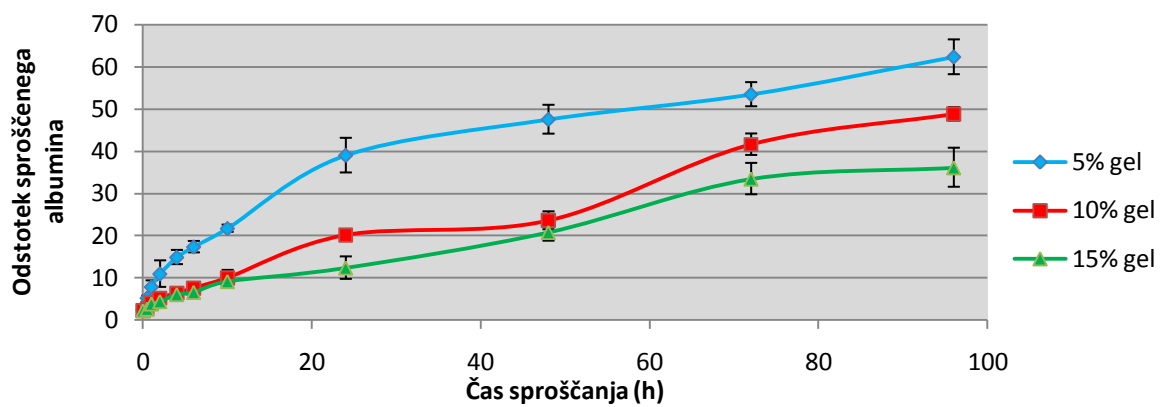
A



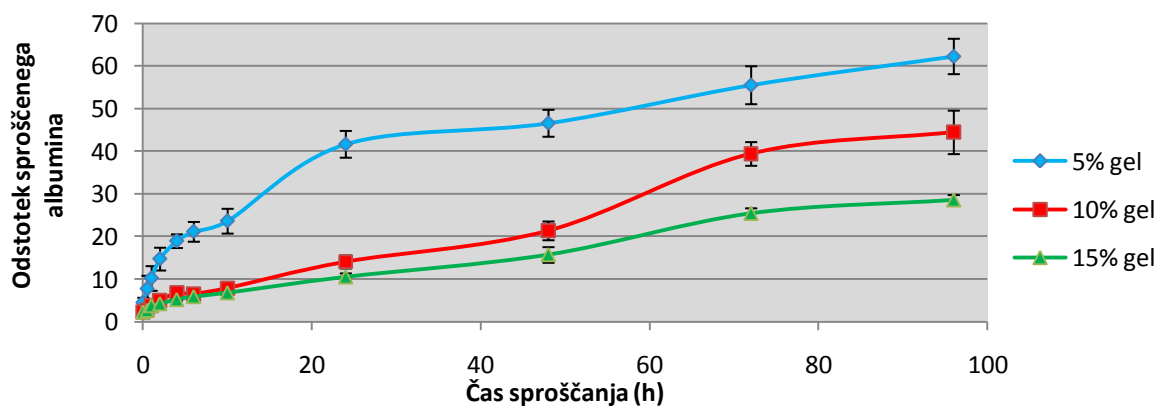
B



C



D



Slika 35: Sproščanje albumina iz 5%, 10% in 15% hidrogela narejenega z enim (A), dvema (B), tremi (C) in štirimi (D) cikli zamrzovanja in odtajevanja.



Z višanjem koncentracije PVA (Slika 35 A, B, C, D) je sproščanje albumina iz hidrogelov počasnejše ne glede na število ciklov zamrzovanja in odtajevanja. Ta razlika je med 5 in 10% hidrogelom večja kot med 10 in 15% hidrogelom, saj število ciklov zamrzovanja in odtajevanja na 5% hidrogele iz PVA bistveno ne vpliva, kot smo to opisali že pod točko A.

Začetno sproščanje iz hidrogelov je nekoliko večje le pri 5% hidrogelu, ko se v prvih šestih urah sprostijo do 20% celotnega albumina. Pri 10 in 15% hidrogelu je začetno hitro sproščanje manj opazno, saj se po enem in dveh ciklih v šestih urah sprostijo do 10% albumina, po treh in štirih ciklih zamrzovanja in odtajevanja pa "burst" efekta skoraj ne opazimo več.

Z večanjem števila ciklov se povečuje tudi razlika v količini sproščenega albumina iz hidrogelov, razen iz 5% hidrogela, kjer se ne glede na število ciklov sprostijo približno 62% albumina. Iz 10 in 15% hidrogelov se z večanjem števila ciklov količina sproščenega albumina zmanjšuje (pri 10% se zmanjša iz 51,1% po prvem ciklu na 44,5% po četrtem ciklu, pri 15% hidrogelih pa iz 46,6% po prvem na 28,5% po četrtem ciklu zamrzovanja in odtajevanja). Tako so z večanjem števila ciklov razlike v sproščenem albuminu pri različnih koncentracijah PVA v hidrogelu povečujejo.

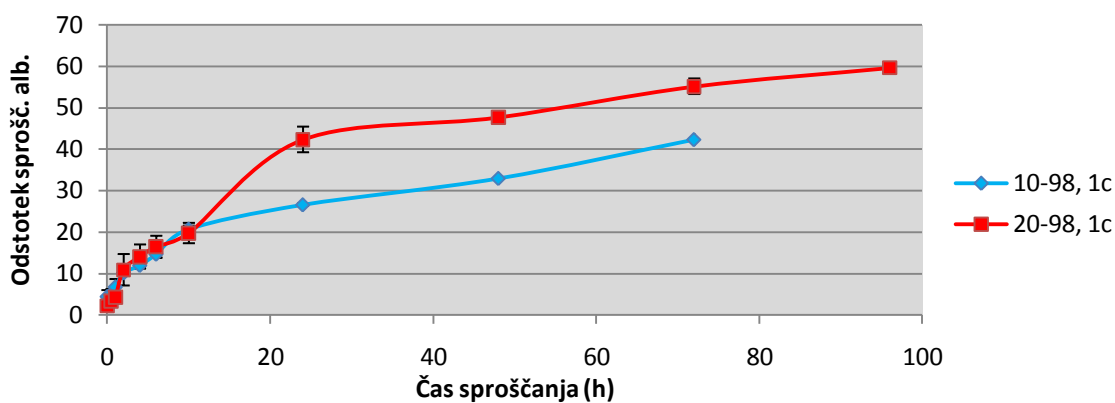
#### 6.2.2.3. Vpliv molekulske mase polivinil alkohola na sproščanje albumina iz hidrogelov

Molekulska masa PVA vpliva na lastnosti hidrogela. Če je molekulska masa polimera prenizka, nastanejo zelo šibki hidrogeli oziroma sploh ne nastanejo, medtem ko se z večanjem molekulske mase poveča delež v gel strukturiranih področij (manj sol in več gel frakcije v hidrogelu). Enak pojav pa je mogoče opaziti tudi z večanjem števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja (35).

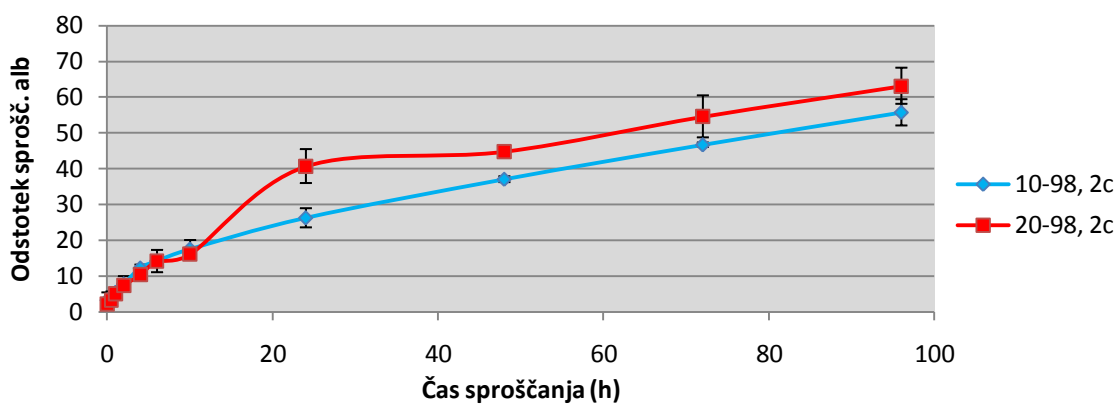
Na sliki 36 vidimo vpliv razlik v molekulski masi polimera na sproščanje albumina. Hidrogeli so izdelani z enakim številom ciklov zamrzovanja in odtajevanja in v enaki koncentraciji.

➤ 5% hidrogeli

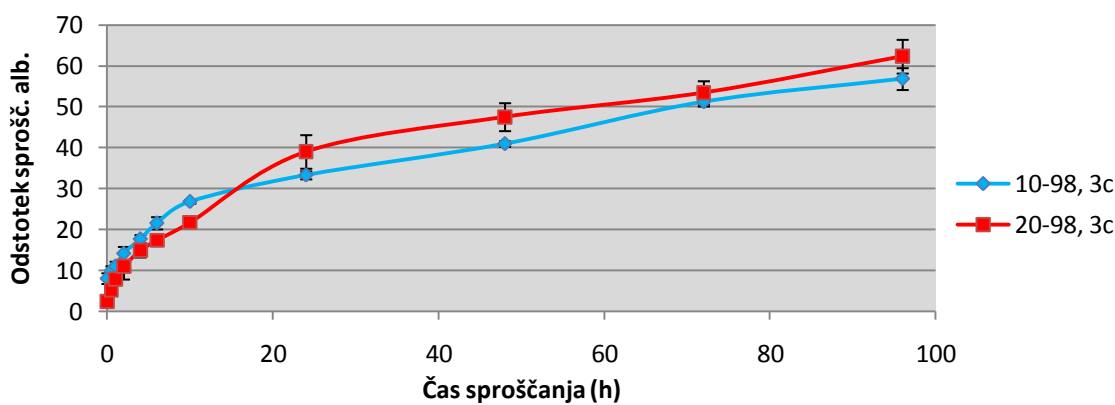
A



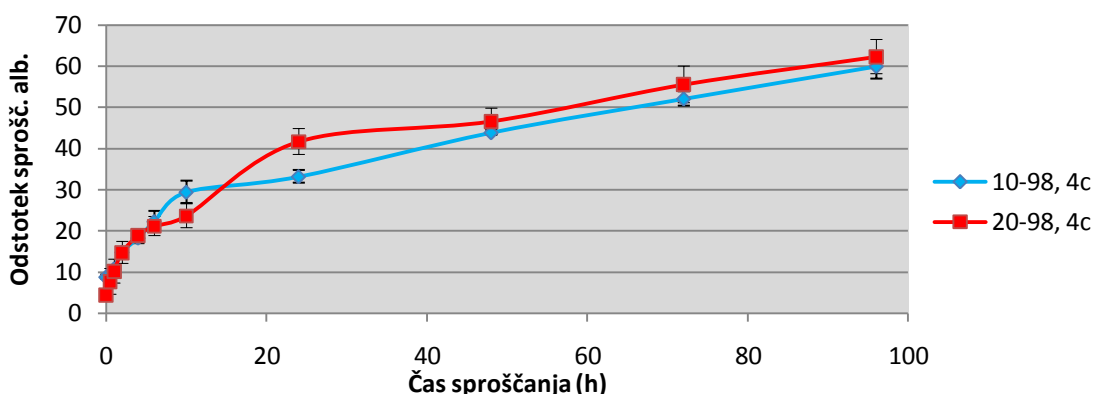
B



C



D



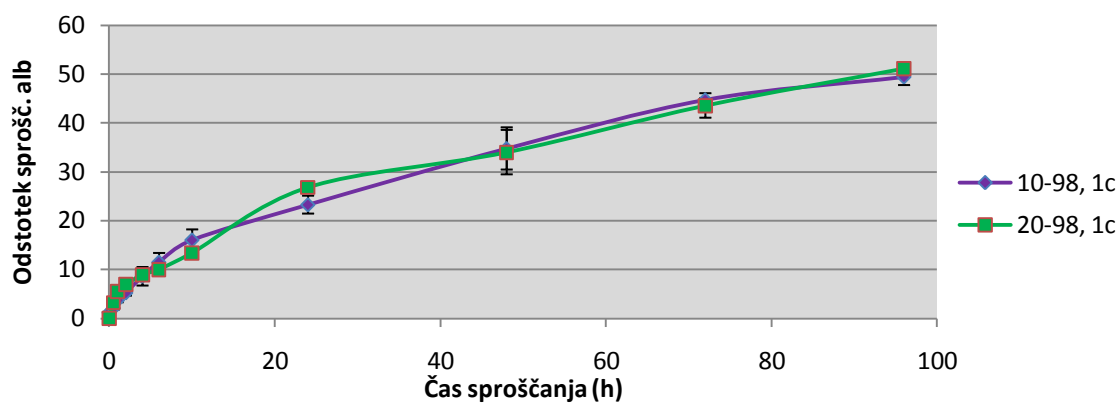
Slika 36: Primerjava sproščanja 5% hidrogelov z enakim postopkom izdelave, vednar z različno molekulsko maso polivinil alkohola. A - 1 cikel, B - 2 cikla, C - 3 cikli, D - 4 cikli zamrzovanja in odtajevanja.

Primerjava 5% hidrogelov izdelanih iz PVA različnih molekulskih mas (Mowiol® 10-98 61 kDa, Mowiol® 20-98 125 kD) kaže, da je sproščanje albumina hitrejše iz hidrogelov izdelanih s PVA višje molekulske mase, kar pa je pravzaprav v nasprotju s pričakovanji. Sproščanje do desete ure je iz hidrogelov različnih molekulskih mas sicer podobno, vendar pa nato kasneje postane sproščanje iz Mowiola® 20-98 precej hitrejše, pri čemer je največja razlika opazna med deseto in štiriindvajseto uro sproščanja. Razlik med profili sproščanja po 3. in 4. ciklu praktično ni. Na koncu pa se ne glede na molekulsko maso in število ciklov zamrzovanja in odtajevanja iz 5% PVA hidrogelov sprosti okrog 60% albumina.

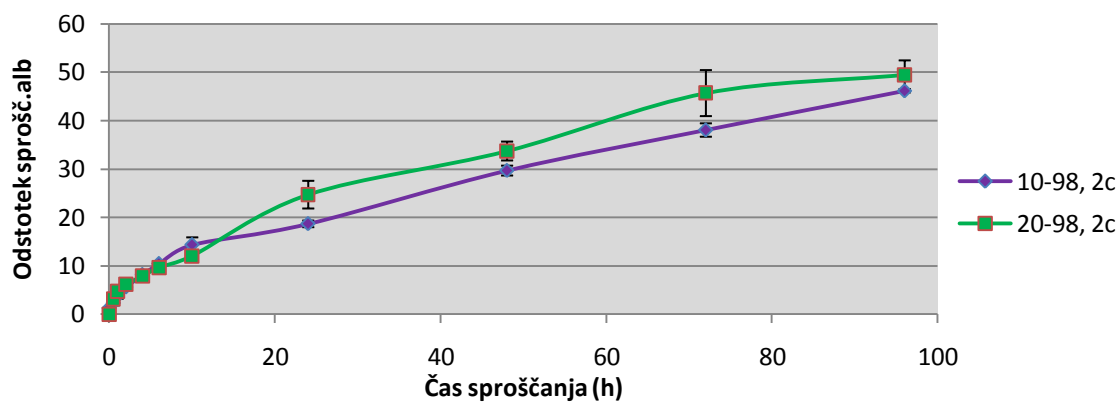
Rezultate lahko razložimo s kombinacijo interakcij med polimeri in polimerom in albuminom. V primeru višje stopnje polimerizacije oziroma PVA z večjo molekulsko maso, so verige PVA daljše, zato se poveča tvorba inter- in intramolekularnih H vezi (15). Na proste verige PVA pa se s H vezmi veže albumin. Ker je pri nižjem številu ciklov zamrzovanja in odtajevanja nižjemolekularni PVA manj premrežen, se na te molekule lahko veže več albumina, zato je sproščanje počasnejše. Pri večanju števila ciklov se ta efekt zmanjša, saj je pri obeh MM večji delež PVA vključen v kristalizacijska področja. Višanje molekulske mase polimera ima podoben vpliv kot višanje koncentracije polimera.

➤ **10% hidrogeli**

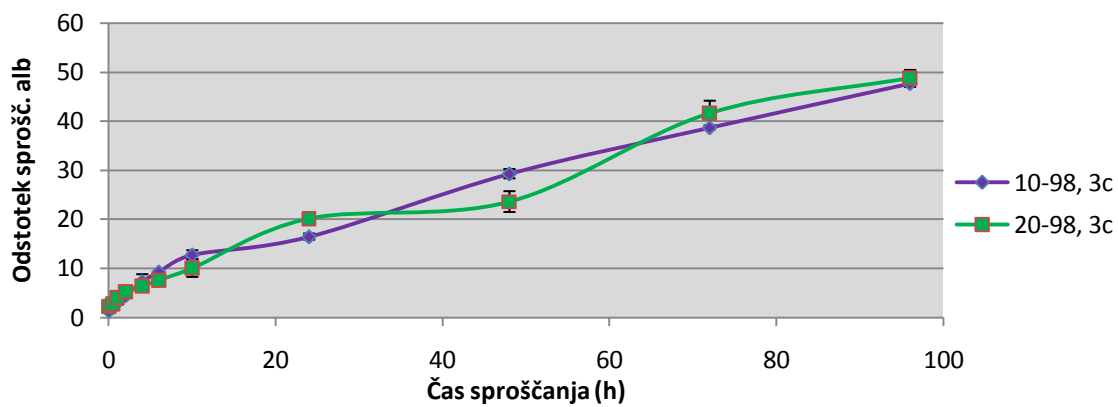
A



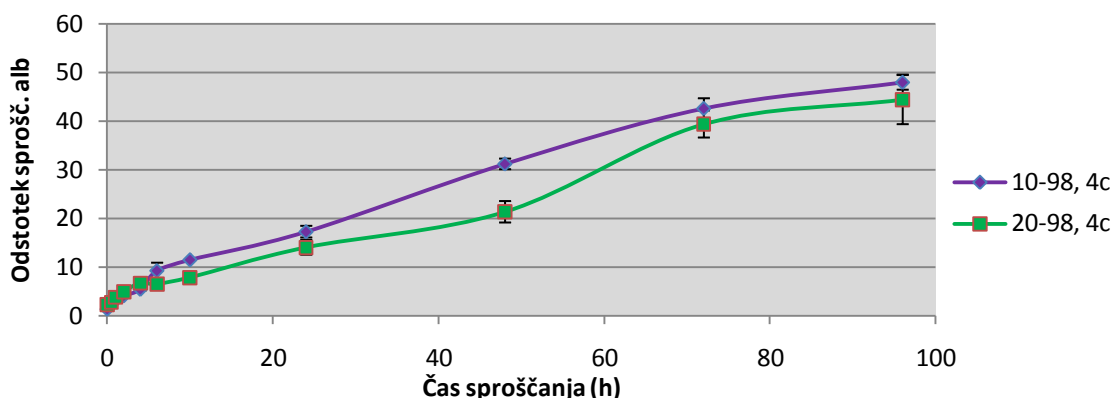
B



C



D



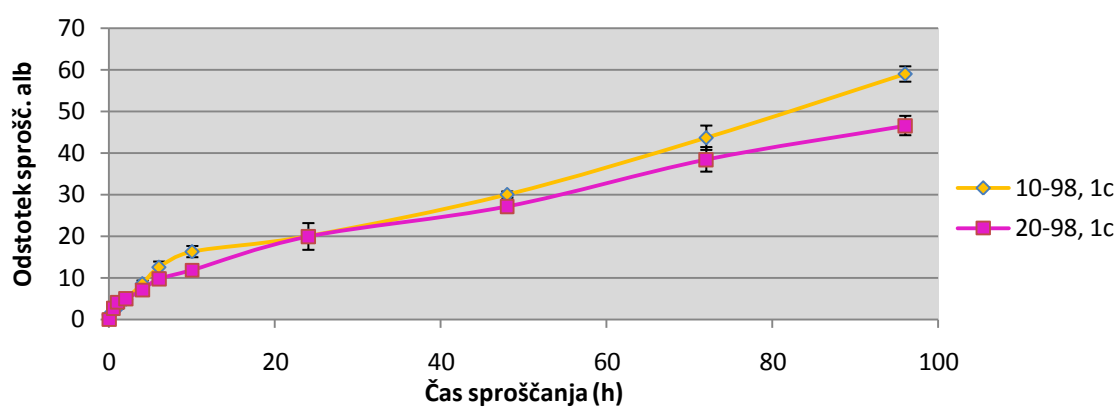
Slika 37: Primerjava sproščanja 10% hidrogelov z enakim postopkom izdelave, vendar z različno molekulsko maso polivinil alkohola. A - 1 cikel, B - 2 cikla, C - 3 cikli, D - 4 cikli zamrzovanja in odtajevanja.

Primerjava profilov sproščanja glede na molekulsko maso iz 10% hidrogelov kaže, da so v sproščanju razlike majhe, kadar uporabimo PVA različnih molekulskih mas. hidrogeli (Slika 37 A-D). Prav tako ne moremo govoriti o nekem trendu oziroma povezavi med molekulsko maso PVA in številom ciklov ter hitrostjo sproščanja.

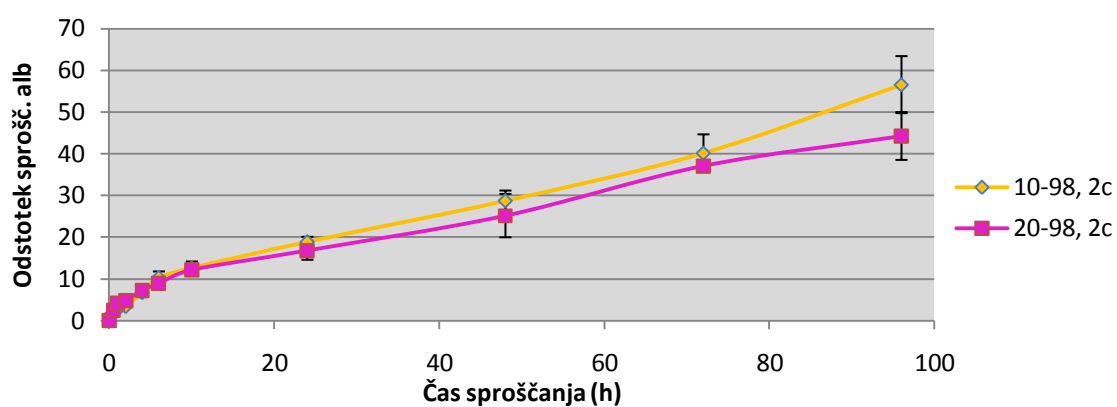
#### ➤ 15% hidrogeli

Z razliko od 10% hidrogelov pa je pri 15% hidrogelih opazen vpliv molekulske mase na sproščanje albumina iz hidrogelov, zlasti iz hidrogelov izpostavljenim štirim ciklom zamrzovanja in odtajevanja (Slika 38). Sproščanje iz hidrogela iz PVA z nižjo molekulsko maso je hitrejše kot iz hidrogelov z višjo molekulsko maso polimera. S časom sproščanja se razlika v sproščenem albuminu povečuje, prav tako se razlika povečuje z večanjem števila ciklov. Eden od možnih razlogov je tudi ta, da je koncentracija polimera že tako visoka, da je vezava albumina na PVA praktično zanemarljiva, in je sproščanje proteina pogojeno le s hitrostjo difuzije skozi polimerni matriks. Ta pa je, kot smo pokazali pri reoloških meritvah, pri višji molekulske masi občutno čvrstejši in predstavlja večjo oviro za sproščanje.

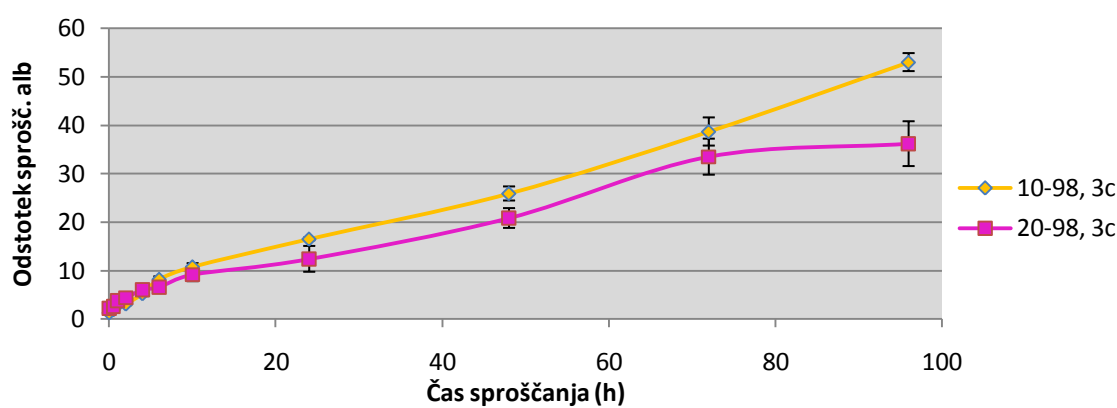
A



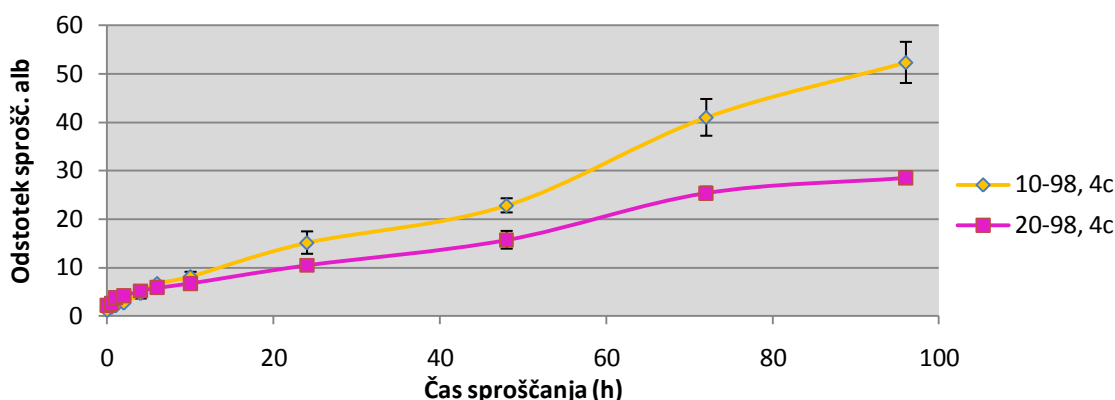
B



C



D

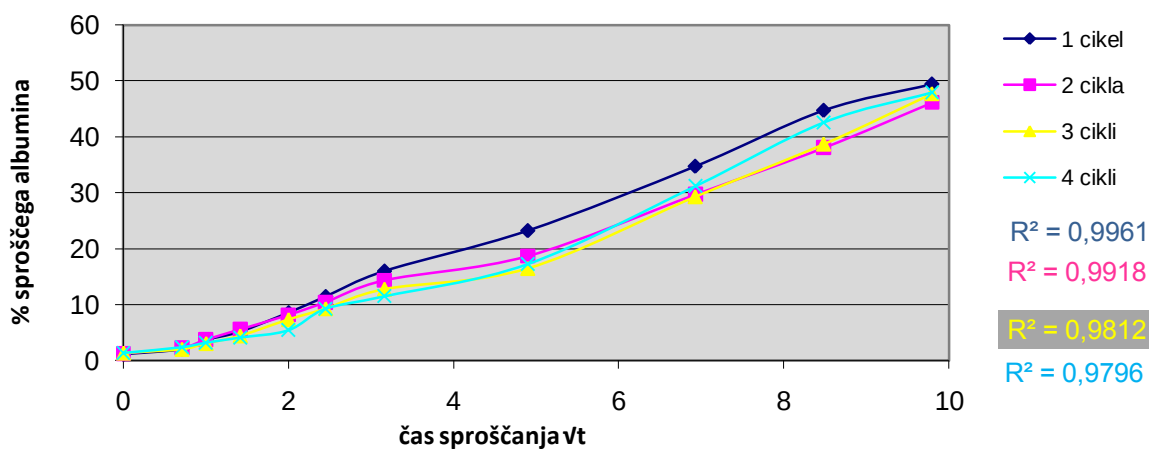


Slika 38: Primerjava sproščanja 15% hidrogelov z enakim postopkom izdelave, vendar z različno molekulsko maso polivinil alkohola. A - 1 cikel, B - 2 cikla, C - 3 cikli, D - 4 cikli zamrzovanja in odtajevanja.

#### 6.2.2.4. Fickova kinetika sproščanja jajčnega albumina

Kot lahko opazimo iz grafov sproščanja albumina, je pri večini kinetika sproščanja na začetku hitrejša, nato pa se upočasni. Zaradi tega smo preizkusili, ali sproščanje poteka po Fickovem modelu kinetike sproščanja, za katerega je značilno, da je hitrost sproščanja sorazmerna s kvadratnim korenom iz časa (37).

Za hidrofilne gelske strukture je značilno, da se s prodiranjem vode vanje, tvori hidrofilna gelska plast, ki ovira sproščanje. Debelina te plasti določi dolžino poti učinkovine do medija sproščanja. Kadar je le difuzija omejujoč faktor za sproščanje učinkovine, takrat hitrost sproščanja sledi t.i. Higuchijevi kinetiki (37).



Slika 39: Sproščanje albumina iz 10% hidrogela iz Mowiola® 10-98 po Fickovi kinetiki.

*Tabela 1: Izračun korelacijskega faktorja  $R^2$  za krivulje sproščanja po Fickovem modelu kinetike sproščanja.*

|       | Koncentracija PVA | Molekulska masa | 1 cikel | 2 cikla | 3 cikli | 4 cikli |
|-------|-------------------|-----------------|---------|---------|---------|---------|
| $R^2$ | 5%                | 10//98          | 0,9876  | 0,9957  | 0,9925  | 0,9881  |
|       |                   | 20//98          | 0,9718  | 0,9768  | 0,9892  | 0,9848  |
|       | 10%               | 10//98          | 0,9961  | 0,9918  | 0,9819  | 0,9796  |
|       |                   | 20//98          | 0,9941  | 0,9916  | 0,9543  | 0,9317  |
|       | 15%               | 10//98          | 0,9647  | 0,9621  | 0,9534  | 0,9338  |
|       |                   | 20//98          | 0,9887  | 0,9821  | 0,9581  | 0,9558  |

Po predhodnih raziskavah (1) so ugotovili, da sproščanje albumina (uporabili so BSA) poteka po Fickovi kinetiki skozi 19 dni, torej da je pogojeno z difuzijo skozi hidrogel. Glede na izračun  $R^2$ , ki je vselej nad 0,93, lahko ugotovimo, da sproščanje res poteka po Fickovem modelu. Je pa res, da lahko to trdimo le do 96 ure sproščanja oziroma do približno 60% sproščenega albumina, saj vzorcev dlje nismo testirali. Bilo bi smiselno, da se testiranje sproščanja izvede tudi skozi daljši čas dokler se ne sprosti celotna količina albumina. Šele takrat bi lahko trdili, da je sproščanje zagotovo po Fickovem modelu kinetike sproščanja.

### **6.2.3. Nabrekanje hidrogelov med testiranjem sproščanja**

Hidrogeli so že med testiranjem vidno spreminjali svojo strukturo na različen način glede na koncentracijo in število ciklov zamrzovanja in odtajevanja. Nekateri so se zmanjševali, drugi pa so se precej povečali.



*Tabela 2: Odstotek nabrekanja hidrogelov iz Mowiola® 10-98 po sproščanju jajčnega albumina.*

| Število ciklov | pred sproščanjem (g) | po sproščanju (g) | masa albumina v hidrogelu (mg) | % nabrekanja |
|----------------|----------------------|-------------------|--------------------------------|--------------|
| 5% hidrogeli   |                      |                   |                                |              |
| 1              | 5,11                 | 5,51              | 24,7                           | 8,24         |
| 2              | 5,09                 | 4,45              | 23,1                           | -12,05       |
| 3              | 5,11                 | 3,96              | 23,8                           | -22,05       |
| 4              | 5,1                  | 3,61              | 24                             | -28,73       |
| 10% hidrogeli  |                      |                   |                                |              |
| 1              | 5,19                 | 6,55              | 21,1                           | 26,63        |
| 2              | 5,19                 | 5,91              | 27,8                           | 14,4         |
| 3              | 5,18                 | 5,5               | 28,4                           | 6,72         |
| 4              | 5,18                 | 5,39              | 30                             | 4,63         |
| 15% hidrogeli  |                      |                   |                                |              |
| 1              | 5,26                 | 7,55              | 29,5                           | 44,12        |
| 2              | 5,26                 | 6,72              | 28,3                           | 28,29        |
| 3              | 5,26                 | 6,27              | 26,5                           | 19,72        |
| 4              | 5,25                 | 5,98              | 26,2                           | 14,4         |

Pred in po končanem sproščanju smo vse hidrokele stehtali. Nato smo izračunali % spremembe mase, pri tem smo upoštevali količino sproščenega albumina. Iz tabele 1 je razvidno, da se 5% hidrogelom po enem ciklu zamrzovanja in odtajevanja masa poveča, medtem ko se ostalim 5% hidrogelom masa zmanjša. Razlog je najverjetneje ta, da hidrogel s samo enim ciklom sploh ni nastal, ampak je ostal v obliki nabreklih polimernih verig povezanih z intramolekularnimi povezavami, kar smo opazili že pri reoloških meritvah tovrstnih hidrogelov. Ko smo tak vzorec stehtali, smo skupaj s polimerom stehtali tudi del medija, saj ločevanje hidrogelov od medija ni bilo popolno.

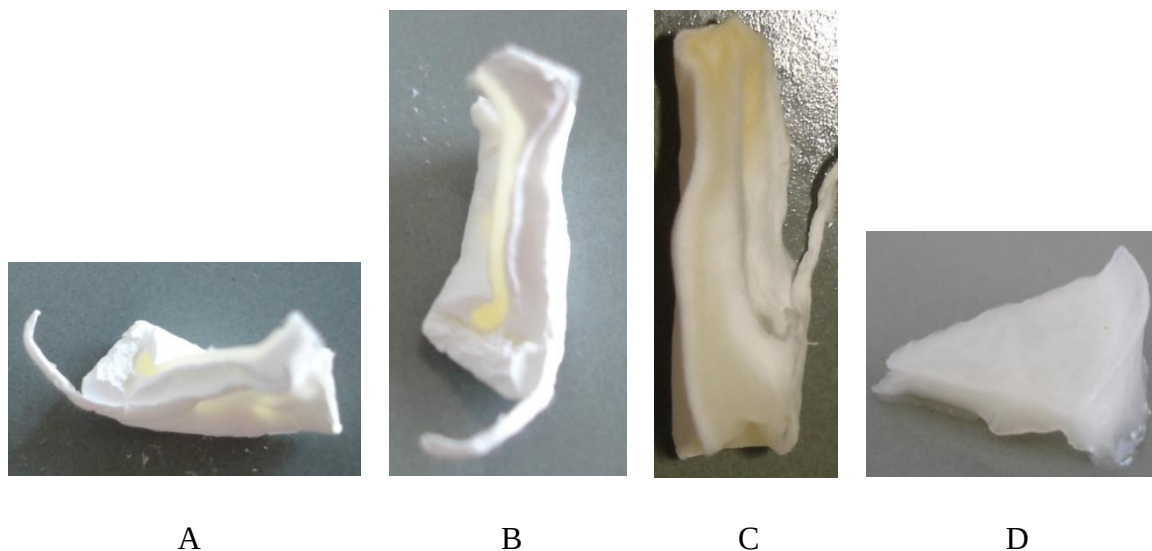
5% hidrogelom po dveh, treh in štirih ciklih zamrzovanja in odtajevanja, pa se masa po končanem sproščanju zmanjša zaradi erozije, ki je obilna zaradi majhega deleža premreženosti PVA verig. Nekoliko presenetljiva je največja erozija po štirih ciklih, vendar je verjetno posledica eksperimentalne napake. 5% hidrogeli so namreč zelo rahle strukture, zato je osuševanje pred tehtanjem praktično nemogoče, razen pri štirih ciklih zamrzovanja in odtajevanja, kar se odraža na rezultatih.

10% in 15% hidrogelom se masa po sproščanju glede na začetno maso poveča. Najbolj se poveča hidrogelom po enem ciklu zamrzovanja in odtajevanja, nato pa je z večanjem števila ciklov porast mase manjši. To lahko razložimo na sledeč način. Hidrogeli izdelani z manj cikli vsebujejo v strukturi manj kristalizacijskih področij, ki pa so tudi manjša. Tako je več verig PVA prostih in več OH skupin na voljo za interakcije s topilom- vezava medija na polimerne molekule pa mnogo bolj poveča maso vzorca. Z večanjem števila ciklov se vedno več molekul PVA vključuje v medsebojne interakcije, kristalizacijska področja rastejo, interakcije med molekulami PVA pa izpodrivajo interakcije PVA z medijem, zato je porast mase manjši. Opaziti je tudi večje povečanje mase pri 15% hidrogelih kot pri 10% hidrogelih, saj je zaradi višje koncentracije več molekul PVA na voljo za tvorbo H vezi z medijem.

### **6.3. VREDNOTENJE HIDROGELOV PO LIOFILIZACIJI**

#### **6.3.1. Liofilizacija hidrogelov iz Mowiola® 10-98**

Hidrogele smo po zamrznjenju v zamrzovalniku pri -22°C dali v liofilizator za naslednjih 22 ur, vendar se v nasprotju s pričakovanji niso popolnoma posušili, zato smo jih v liofilizatorju pustili še naslednjih 38 ur. Tudi po dodatnem sušenju vsi hidrogeli niso bili popolnoma suhi. Opazili smo, da večja kot je bila koncentracija polimera v hidrogelu, slabše so se le-ti sušili. 5% hidrogeli po enem ali dveh ciklih zamrzovanja so bili popolnoma suhi (Slika 40A), tisti po treh ali štirih ciklih zamrzovanja in odtajevanja pa so bili na površini suhi in beli, v sredini pa je bila vlažna rumenkasta prosojna plast (Slika 40B). Vsi 10% hidrogeli so bili po površini suhi, v sredini pa je bila vlažna in gumijasta struktura (Slika 40C), ki je bila debelejša kot pri 5% hidrogelih. 15% hidrogeli so se slabo posušili, postali so trdi, a še vedno popolnoma prosojni (Slika 40D). Sklepamo torej lahko, da bolj kot je hidrogel gosto premrežen in čvrst, težje se iz strukture odstrani voda. Hidrogel se zato posuši na površini, v sredini pa ostane ujeta voda. Z liofilizacijo smo najverjetneje odstranili le nevezano vodo (primarno sušenje), vezane vode (kapilarna, adsorbirana, voda za nabrekanje) pa nam pod izbranimi pogoji ni uspelo odstraniti. Glede na to, da so se vzorci z višjo koncentracijo PVA in večjim številom ciklov zamrzovanja in odtajevanja slabše sušili, lahko ugotovimo, da vsebujejo več močno vezane vode, ki se z vodikovimi vezmi veže v kristalizacijska področja.



*Slika 40: Liofilizirani hidrogeli iz Mowiola® 10-98 , prerez. A-5% hidrogel, 1 cikel; B-5% hidrogel, 4 cikli; C-10% hidrogel, 3 cikli in D-15% hidrogel, 4 cikli zamrzovanja in odtajevanja.*

Liofilizacija hidrogelov z izbranimi parametri za PVA hidrokele pri višjih koncentracijah in številu ciklov ni bila primerna kot metoda za povečevanje stabilnosti hidrogelov, saj se vzorci niso v celoti posušili. Poleg tega je zamrzovanje hidrogelov iz PVA del postopka povečanja čvrstosti hidrogelov, zato z zamrzovanjem pri liofilizaciji uvedemo dodaten cikel zamrzovanja, kar prvotno ni bilo predvideno.

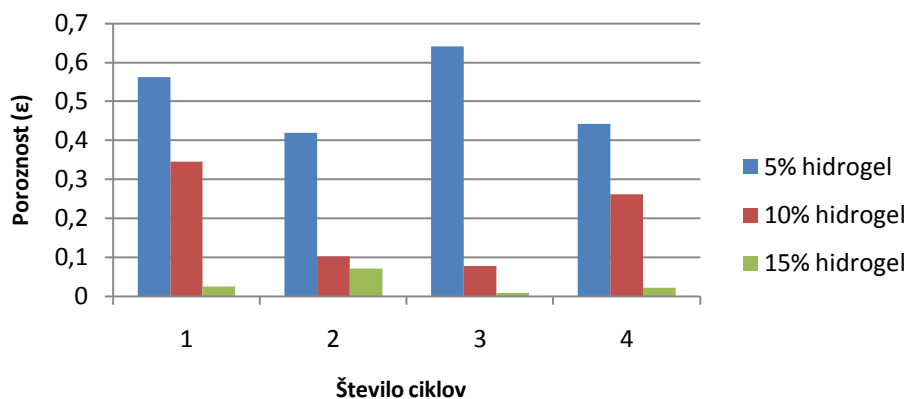
Kljub nepopolnemu sušenju, smo poskusili z rehidracijo liofiliziranih hidrogelov, vendar tudi ta ni potekla v polnem obsegu. Hidrogeli z nižjo koncentracijo PVA in manjšim številom ciklov zamrzovanja in odtajevanja so v svojo strukturo sprejeli več vode kot tisti z višjim številom ciklov in koncentracijo, vendar pa so hidrogeli tudi potem ostali tanki, beli in trdi, njihova gumijasta konsistenca se jim ni povrnila.

### **6.3.2. Izračun poroznosti hidrogelov iz Mowiola® 10-98**

Poroznost smo izračunali po formuli iz točke 4.3.9. iz navidezne in prave gostote, ki smo jo izmerili s Hubardovim in helijevim poknometrom po navodilih iz točk 4.3.8.1. in 4.3.8.2. Za te meritve potrebujemo suhe vzorce, saj voda moti meritve, zato smo uporabili liofilizirane vzorce. Ker vsi niso bili popolnoma suhi, so rezultati meritev lahko zgolj v informacijo.

*Tabela 3: Rezultat meritev gostote in izračunana vrednost poroznosti liofiliziranih hidrogelov.*

| %PVA/št. ciklov | navidezna gostota (g/cm <sup>3</sup> ) | prava gostota (g/cm <sup>3</sup> ) | poroznost |
|-----------------|----------------------------------------|------------------------------------|-----------|
| 5/1             | 0,5811                                 | 1,327                              | 0,5621    |
| 5/2             | 0,6132                                 | 1,0571                             | 0,4199    |
| 5/3             | 0,4514                                 | 1,2588                             | 0,6414    |
| 5/4             | 0,5937                                 | 1,0642                             | 0,4421    |
| 11/1            | 0,8086                                 | 1,2346                             | 0,3450    |
| 10/2            | 1,1629                                 | 1,2954                             | 0,1023    |
| 10/3            | 0,9740                                 | 1,0564                             | 0,0780    |
| 10/4            | 0,9440                                 | 1,2794                             | 0,2622    |
| 15/1            | 1,0548                                 | 1,0817                             | 0,0249    |
| 15/2            | 1,1020                                 | 1,1849                             | 0,0700    |
| 15/3            | 1,2216                                 | 1,2308                             | 0,0075    |
| 15/4            | 1,1888                                 | 1,2149                             | 0,0215    |



*Slika 41: Poroznost hidrogelov glede na število ciklov zamrzovanja in odtajevanja ter masni delež PVA v hidrogelu.*

Ugotovili smo, da poroznost hidrogelov z večanjem masnega deleža polimera pada, kar je v skladu s teorijo, da večja kot je koncentracija polimera, več povezav med verigami PVA lahko nastane, premreženje je bolj gosto in poroznost posledično manjša.

Število ciklov v našem primeru ne izkazuje kakšnega trenda v vplivu na poroznost hidrogelov, kar je najverjetneje posledica prisotnosti vode, ki je motila meritve.

#### 6.4. REZULTATI IZDELAVE NANODELCEV

Po postopku opisanem v točki 5.3.10. smo v eksperimentalnem delu poskusili izdelati nanodelce.

Najprej smo izdelali nanodelce iz 10% raztopine PVA Mowiol® 10-98 z enim in s tremi cikli zamrzovanja. Nastali suspenziji smo dodali aceton, da bi ekstrahirali nanodelce iz silikonskega olja. Vzorce smo nameravali analizirati na zetasizerju, da bi definirali nastali sistem. Prvo meritev smo izvedli takoj po ekstrakciji.

Pri vzorcu iz 10% PVA z enim ciklom zamrzovanja in odtajevanja meritev ni bila možna, saj so bili v vzorcu delci vidni s prostim očesom kljub centrifugiranju pri 4000 rpm 5 minut - torej zagotovo nastali delci niso bili nanodelci. Vzorec smo zato pustili stati v hladilniku en teden, da bi se večji delci posedli in jih nato zopet izmerili. Enak postopek smo izvedli še na 15% hidrogelu. V tem primeru smo že takoj po ekstrakciji lahko izvedli meritve, ponovili pa smo jih tudi po enem tednu. Prva meritev je pokazala, da imamo 74,4% delcev s povprečno velikostjo 4,188 nm ter 25,6% delcev z povprečno velikostjo 464,9 nm, polidisperzni indeks pa je bil 0,860. Po enem tednu pa je bilo 25,4% delcev velikih 2,337 nm ter 66,3% delcev 210,9 nm, ostali pa so bili manjši od enega nm. Polidisperzni indeks je bil v tem primeru 0,283.

Ker smo se želeli prepričati, da smo res dobili nanodelce, smo vzorec pustili na zraku, z namenom da bi aceton izhlapel, nato pa bi posušene nanodelce redispergirali v vodi. Po enem dnevu pa je na dnu čaše ostala oljna plast, kar pomeni, da niso nastali nanodelci, ampak stabilna nanoemulzija silikonskega olja v acetonu. Najverjetneje smo celoten polimer odstranili že med ekstrakcijo suspenzije z acetonom, saj so v acetnu na površini plavali veliki delci gumijaste strukture hidrogela. Nastali so torej delci veliko večji od pričakovanih.

Nato smo poskusili zamenjati oljno fazo z nekim organskim topilom, ki bi omogočal tvorbo nanodelcev PVA, organsko fazo pa bi lažje odstranili. Poskusili smo z uporabo etilacetata, benzilnega alkohola ter butillaktata, vendar po združevanju raztopin polivinil alkohola z izbrano organski fazo homogenizacija z rotor-stator homogenizatorjem ni bila mogoča, nastala je namreč nekakšna lepljiva plastična masa, ki se ni dispergirala.

Nato smo poskusili silikonsko olje zamenjati za olivno olje. Nastala je suspenzija, ki pa se je žal pri ekstrakciji mešala z acetonom, zato ločevanje ni bilo mogoče.

Pri izdelavi suspenzije nanodelcev v silikonskem olju smo po prvem odmrznjenju opazili, da je velik delež polimera na dnu čaše v skupku, nekaj pa v obliki mikrododelcev. Pomislili smo na možnost, da je zamrzovanje silikonskega olja prepočasno, da se pred tem delci polimera že posedejo na dno čaše, zato tvorba nanodelcev ni možna. Iz tega razloga smo postopek poskušali ponoviti še z zamrznjenjem sveže izdelane emulzije s tekočim dušikom. Zamrzovanje emulzije pa v tem primeru ni bilo enakomerno (prej je zamrznila ob steni), po odtajanju suspenzije smo opazili nekakšno mrežo hidrogela po steni čaše. Po ekstrakciji in centrifugiranju (4000 rpm 10 minut) odtaljene suspenzije smo na zetasizerju dobili podobne rezultate kot pri prejšnjih meritvah (86,4% delcev povprečno velikih 345,8 nm ter 13,6% delcev z velikostjo 4,934, polidisperzni indeks 0,154). Dodatno je tudi v tem primeru po izparitvi acetona na dnu ostala oljna plast, ki je nakazovala na nastanek emulzije silikonskega olja v acetonu.

Ugotovili smo, da kljub ponovitvi postopka po publikaciji 34 ta način izdelava nanodelcev ni bil uspešen. Možne so seveda še optimizacije, kjer bi uporabili silikonsko olje z drugo viskoznostjo, morda bolj hlapnega, vendar je to tema že druge diplomske naloge.

## 7. SKLEP

Po končanih raziskavah smo prišli do naslednjih zaključkov o PVA hidrogelih izdelanih z metodo zamrzovanja in odtajevanja:

- Hidrogeli iz PVA so lahko zelo čvrsti in elastični, posebno pri višji koncentraciji PVA in večjem številu ciklov zamrzovanja in odtajevanja
- Minimalna koncentracija PVA za nastanek hidrogela je 5%, pri tem pa sta potrebna vsaj dva cikla zamrzovanja in odtajevanja, da dobimo hidrogel s tridimenzionalno strukturo.
- Povečevanje števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja, večja molekulska masa in večja koncentracija PVA pomenijo večji elastični ( $G'$ ) in plastični ( $G''$ ) modul, ki nakazujeta na bolj čvrste, elastične in strukturirane hidrokele.
- Število ciklov, molekulska masa in koncentracija PVA imajo različen vpliv na hitrost in obseg sproščanja jajčnega albumina: z večanjem števila ciklov se razlike zmanjšujejo, razen če primerjamo vpliv molekulske mase; pri 5% PVA hidrogelu smo opazili izrazito hitrejšo erozijo in začetno sproščanje, zlasti po enem ali dveh ciklih zamrzovanja in odtajevanja
- Parametri izdelave vplivajo na začetni porast koncentracij sproščenega albumina, ki se z večanjem števila ciklov, molekulske mase in koncentracije PVA zmanjšuje.
- Sproščanje albumina iz hidrogelov iz PVA poteka po Fickovi kinetiki sproščanja, gre torej za difuzijsko nadzorovano sproščanje.
- Liofilizacija ni primeren postopek povečevanja stabilnosti hidrogelov iz PVA, saj je voda zelo močno vezana in je na ta način ne moremo popolnoma odstraniti. Z večanjem števila ciklov, molekulske mase in koncentracije PVA se delež vezane vode povečuje in posledično se hidrogeli težje sušijo.
- Z večanjem koncentracije PVA se poroznost hidrogelov zmanjšuje, kakšen pa je vpliv števila ciklov zamrzovanja in odtajevanja pa ne moremo z gotovostjo trditi, saj je zaostala voda vezana v hidrogelu po liofilizaciji najverjetneje motila meritve gostote hidrogelov.
- Izdelava nanodelcev iz PVA z zamrzovanjem in odtajevanjem z emulzijsko metodo ni bila uspešna, nastala je nanoemulzija. Metodo pa bi bilo smiselno optimirati.

## 8. LITERATURA

1. Hassa CM, Peppas NA. Structure and applications of Poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Advances in Polymer Science*, 153; 2000; 37-65
2. Bos GW, Verrijck R et al. Hydrogels for the controlled release of pharmaceutical proteins. *Pharmaceutical technology*, october 2001 ([www.pharmtech.com](http://www.pharmtech.com), dostopano april 2011)
3. Blanci MD, Olmo RM, Teijon JM. Hydrogels. In: Swarbrick J, Boylan JC. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York: Marcel Dekker, 2007; 2021-2036
4. Rošic R: Proučevanje hidrogelov za vlažno celjenje ran z vgrajenim modelnim proteinom. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009
5. Hoffman A. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews* 43; 2002; 3-12
6. Brinker CJ, Scherer. Ch. 6: Aging of gels In: *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. San Diego, Academic press inc., 1990; 358-364
7. Vaje iz fizikalne farmacije, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 1-10; 2007; 19-29
8. Valant AZ. Uvod v reologijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2007; 29-65
9. <http://www.sju.edu/~phabdas/physics/rheo.html>, dostopano 4.2011
10. Ikeda S, Foegeding EA. *Current protocols in food analytical chemistry: Measurement of gel rheology: Dynamic tests*, Unit H3.2; 2003
11. Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug discovery today* 7; 2002; 569-579
12. Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 49; 2008; 1993-2007
13. Specifikacija Mowiol®, Sigma-Aldrich, Nemčija
14. Briscoe B et al. The effects of hydrogen bonding upon the viscosity of aqueous poly(vinyl alcohol) solutions. *Polymer* 41; 1999; 3851-3860
15. Tao J, Effects of molecular weight and solution concentration on electrospinning of PVA, Doktorska naloga, Worcester Polytechnic Institute, 2003; 7-24



16. Ricciardi R, Gaillet C et al. Investigation of the relationships between the chain organization and rheological properties of atactic poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Polymer* 44: 2003; 3375-3380
17. Bonakdar S et al., Comparison of the effect of hydrophilicity on biocompatibility and platelet adhesion of two different kinds of biomaterials, *Iranian journal of pharmaceutical sciences* 4(1); 2008; 37-44
18. Chiellini E. et al., Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials, *Prog. Polym. Sci.* 28; 2003; 963-1014
19. DeMerlis CC, Schoneker DR. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and chemical toxicology* 41; 2003; 319-326
20. Kaneo Y et al., Pharmacokinetics and biodisposition of poly (vinyl alcohol) in rats and mice, *Drug. Metab. Pharmacokinet.* 20(6); 2005; 435-442
21. Davis JR, *Handbook of materials for medical devices: Overview of biomaterials and their use in medical devices*, ASM International, ZDA, 2003; 1-11
22. Hernandez R, Sarafin A et al. Viscoelastic properties of pol(vinyl alcohol) hydrogels and ferrogels obtained through freezing-thawing cycles. *Polymer* 46; 2004; 5543-5549
23. Mishra S et al., Radiation induced crosslinking effect on semi-interpenetrating polymer networks of poly(vinyl alcohol), *Express polymer letters* 1(7); 2007; 407-415
24. Bolto B, Tran T et al. Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes. *Progress in polymer science* 34; 2009; 969-981
25. Hickey AS, Peppas NA. Mesh size and diffusive characteristics of semicrystalline poly(vinyl alcohol) membranes prepared by freezing/thawing techniques. *Journal of membrane science* 107; 1995; 229-237
26. Hatekeyama T, Uno J et al. Gel-sol transition of poly(vinyl alcohol) hydrogels formed by freezing and thawing. *Termochimica Acta* 431;2005; 144-148
27. Millon LE et al.: SANS Characterization of an anisotropic poly(vinyl alcohol) hydrogel with vascular application. *Macromolecules* 40; 2007; 3655-3662
28. Yang H, Cheng R et al. The role of solvation on the conformational change during repeated freezing-thawing treatment to an extremely dilute aqueous solution of poly(vinyl alcohol). *Polymer* 46; 2005; 7557-7562

29. Hassan CM, Stewart JE, Peppas NA. Diffusional characteristics of freeze/thawed poly(vinyl alcohol) hydrogels: Applications to protein controlled release from multilaminate devices. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutocs* 49; 2000; 161-165
30. Photochanachai S, Mehta A, Kitabatake N. Heating of an ovalbumin solution at neutral pH and high temperature. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(8); 2002; 1635-1640
31. Povh B. Osnove liofilizacije (I del). *Vakuumist* 18/4; 1998
32. Dr. Pikal M, Reiter C. Basic theory of freeze drying, 2008 (<http://www.scribd.com/doc/3954988/basic-theory>; dostopano 1. 2011)
33. [http://www.micromeritics.com/Repository/Files/Volume\\_and\\_Density\\_determinations\\_for\\_Particle\\_Technologists\\_0.pdf](http://www.micromeritics.com/Repository/Files/Volume_and_Density_determinations_for_Particle_Technologists_0.pdf), dostopano 4. 2011
34. Li JK, Wang N Wu XS. Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing-thawing process for protein/peptide drug delivery. *Journal of controlled release* 56; 1998; 117-126
35. Stasko J et al.: Poly(vinyl alcohol) hydrogels, *Proceedings of estonian academy of sciences* 58(1); 2009; 63-66
36. Escobar-Chavez JJ et al.: Transdermal nortriptyline hydrochloride patch formulated with a chitosan matrix intended to be used for smoking cessation, *Pharmaceutical development and technology* 16(2); 2011; 162-169
37. Sujja-areevath J. et al.: Relationship between swelling, erosion and drug release in hydrophilic natural gum mini-matrix formulations, *European journal of pharmaceutical sciences* 6; 1998; 207-207