

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEA HOČEVAR

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEA HOČEVAR

**IZDELAVA IN FIZIKALNO-KEMIJSKO VREDNOTENJE HITOSANSKIH
NANODELCEV S HEPARINOM**

**PREPARATION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF
CHITOSAN/HEPARIN NANOPARTICLES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm. in v kemični tovarni Melamin d.d. Kočevje.

ZAHVALA

Za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi in pisanju diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar. Velika zahvala gre tudi asist. Mirjam Gosenca za prijaznost in pomoč pri izvajanju poskusov citotoksičnosti. Hvala tudi Tatjani Hrovatič, tehnični sodelavki, za pomoč pri delu v laboratoriju.

Velika zahvala gre moji mami za neprecenljivo pomoč pri izdelavi diplome in za vse koristne nasvete. Predvsem pa hvala, ker si verjela vame.

Zahvaljujem se tovarni Melamin d.d. Kočevje, ki mi je omogočil izvedbo določitve gostote naboja.

Hvala tudi stricu Robertu in prijateljici Marjeti za pomoč pri urejanju in oblikovanju diplomske naloge.

Nenazadnje se zahvaljujem tudi mojemu Iztoku, sestri Katji in atiju za podporo in vse spodbudne besede v času celotnega študija. Bile so še kako dobrodošle.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Ljubljana, november 2011

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK.....	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD	1
1.1 Nanodelci.....	1
1.1.1 Fizikalno vrednotenje nanodelcev	2
1.2 Hitosan.....	6
1.3 Antikoagulantni	8
1.3.1 Intravenski antikoagulantni	8
1.4 Polielektrolitni kompleksi	10
1.4.1 Polielektrolitni nanokompleksi iz hitosana in heparina.....	11
1.4.2 Polielektrolitni kompleksi iz hitosana, heparina in TPP	13
2 NAMEN DELA.....	15
3 EKSPERIMENTALNI DEL	16
3.1 Materiali	16
3.2 Naprave.....	17
3.3 Postopki in metode	18
3.3.1 Izdelava nanodelcev iz hitosana in heparina	18
3.3.2 Vpliv masnega razmerja heparin/hitosan na fizikalne lastnosti nanodelcev	19
3.3.3 Spremljanje fizikalne stabilnosti disperzij nanodelcev	20
3.3.4 Vpliv koncentracije polimerov v disperziji na fizikalne lastnosti nanodelcev ..	20
3.3.5 Vpliv postopka priprave raztopine hitosana na fizikalne lastnosti nanodelcev ..	21
3.3.6 Izdelava nanodelcev iz hitosana, heparina in TPP	22
3.3.6.1 Iskanje optimalnega masnega razmerja nizkomolekularni hitosan/TPP	22
3.3.6.2 Iskanje optimalnega masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan	22
3.3.7 Preverjanje citotoksičnosti nanodelcev	23
3.3.7.1 Vpliv celičnega medija na lastnosti disperzij nanodelcev	24
3.3.7.2 Ugotavljanje citotoksičnosti disperzij nanodelcev	25
3.3.8 Vrednotenje nanodelcev - metode	26
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	30
4.1 Gostota naboja raztopin polimerov	30
4.2 Vpliv masnega razmerja heparin/hitosan na fizikalne lastnosti nanodelcev	31
4.2.1 Nanodelci iz heparina in hitosanijevega klorida Protasan.....	31
4.2.2 Nanodelci iz heparina in hitosanijevega hidroklorida	36
4.2.3 Nanodelci iz heparina in nizkomolekularnega hitosana	40
4.2.4 Primerjava fizikalnih lastnosti disperzij nanodelcev iz različnih hitosanov.....	44
4.3 Spremljanje fizikalne stabilnosti disperzij nanodelcev	46
4.4 Vpliv koncentracije polimerov v disperziji na fizikalne lastnosti nanodelcev	47
4.4.1 Nanodelci iz heparina in hitosanijevega hidroklorida v masnem razmerju 1:1 ..	47
4.4.2 Nanodelci iz heparina in nizkomolekularnega hitosana v razmerju 1:1.....	49
4.5 Vpliv postopka priprave raztopine hitosana na fizikalne lastnosti nanodelcev	50
4.6 Izdelava nanodelcev iz hitosana, heparina in TPP	52
4.6.1 Iskanje optimalnega masnega razmerja nizkomolekularni hitosan/TPP	52
4.6.2 Iskanje optimalnega masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan	52
4.7 Preverjanje citotoksičnosti nanodelcev	56
4.7.1 Vpliv celičnega medija na lastnosti disperzij nanodelcev	56

4.7.2 Ugotavljanje citotoksičnosti disperzij nanodelcev	56
5 SKLEP	59
6 LITERATURA	62

POVZETEK

Nanodelci imajo kot dostavni sistem številne prednosti, in sicer sposobnost prehajanja bioloških barier, zaščita makromolekul pred razgradnjo in dostava učinkovin na tarčno mesto. Heparin, intravenski antikoagulant za preprečevanje in zdravljenje krvnih strdkov, se zaradi visokega negativnega naboja in velikosti molekule slabo absorbira iz gastrointestinalnega trakta, zato ga apliciramo parenteralno. Ugotovljeno je, da se z vgradnjo heparina v nanodelce iz hitosana poveča njegova biološka uporabnost po peroralni aplikaciji.

V okviru diplomske naloge smo izdelali disperzije nanodelcev iz heparina in hitosana z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosan (1:0,5; 1:0,75; 1:1; 1:2; 1:3, 1:4 in 1:5) z metodo polielektrolitnega kompleksiranja ter jih fizikalno-kemijsko ovrednotili z določitvijo velikosti delcev, polidisperznega indeksa, zeta potenciala, gostote naboja in pH vrednosti. Pri izdelavi nanodelcev smo uporabili tri vrste hitosana s kationskim nabojem in dobrimi bioadhezivnimi lastnostmi, in sicer hitosanijev klorid Protasan, hitosanijev hidroklorid in nizkomolekularni hitosan. Med seboj se razlikujejo v stopnji deacetilacije oziroma gostoti kationskega naboja.

Naš cilj je bil izbrati najbolj optimalno masno razmerje med heparinom in hitosanom, ki daje čim manjše nanodelce s kationskim karakterjem, homogeno porazdelitvijo velikosti ($PDI < 30$) in dobro fizikalno stabilnostjo ($ZP > 30$ mV). Ugotovili smo, da je za hitosanijev klorid Protasan in hitosanijev hidroklorid najbolj optimalno masno razmerje heparin /hitosan 1:1, za nizkomolekularni hitosan pa 1:0,75, ker ima le-ta višjo gostoto kationskega naboja.

Ugotovili smo tudi, da z naraščajočo koncentracijo polimerov v disperziji velikost delcev narašča in da predpriprava raztopine hitosana (ultrazvok, centrifugiranje in filtracija) v primeru dobre vodotopnosti hitosanijevega hidroklorida ni potrebna.

Dodatek pentanatrijevega tripolifosfata (TPP) zniža velikost nanodelcev pri vseh masnih razmerjih heparin/hitosan, ker se poveča število interakcij med hitosanom in negativno nabitimi komponentami. TPP zaradi anionskega naboja zniža ZP disperzije in kationski naboj nanodelcev in ne pripomore k večji pH stabilnosti disperzije nanodelcev.

V zadnjem delu diplomske naloge smo preverili potencialno citotoksičnost nekaterih disperzij nanodelcev. Rezultati so pokazali, da disperzije nanodelcev za keratinocite niso citotoksične.

ABSTRACT

As a delivery system nanoparticles have various advantages such as the capacity to cross the biological barriers, the protection of macromolecules from degradation and the delivery of drugs to the target site. Heparin, an intravenous anticoagulant for the prevention and treatment of blood clots, is poorly absorbed in the gastrointestinal tract due to a high negative charge and large molecular size; therefore it is applied parenterally. It has been found out that with the incorporation of heparin into nanoparticles from chitosan its bioavailability is increased when applied perorally.

Within the graduation thesis we produced the nano-dispersions from heparin and chitosan with different mass ratio heparin/chitosan (1:0,5; 1:0,75; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 and 1:5) with the method polyelectrolite complexation and evaluated them in a physicochemical way with determining the particle size, polydispersity index, zeta potential, and the charge density and pH value. When producing nanoparticles we used three types of chitosan with a cationic charge and good bioadhesive characteristics and as such chitosan chloride Protasan, chitosan hydrochloride and low molecular weight chitosan. They differ among themselves in a degree of deacetylation or the density of cationic charge.

Our goal was to choose the most optimal mass ratio between heparin and chitosan that gives as little as possible nanoparticles with a cationic character, a homogeneous distribution of size ($PDI < 30$) and good physical stability ($ZP > 30mV$). We found out that for chitosan Protasan and chitosan hydrochloride the most optimal mass ratio is heparin/chitosan 1:1, for low molecular weight chitosan 1:0,75 because it has a higher density of cationic charge.

We have also found out that with an increasing concentration of polymers in a dispersion the particles size increases and that a pre-preparation of chitosan solution (ultra sound, centrifugation and filtration) in case of good water solubility of chitosan hydrochloride is not necessary.

An addition of pentasodium tripolyphosphate (TPP) lowers the nanoparticles size with all mass ratio heparin/chitosan because the number of interactions between chitosan and negatively charged components increases. Due to anionic charge the TPP lowers ZP dispersions and cationic charge of nanoparticles and does not contribute to a higher pH stability of nanoparticles dispersions.

In the last part of the graduation thesis we have tested a potential cytotoxicity of some nanoparticles dispersions. The results have shown that nano-dispersions for keratinocytes are not cytotoxic.

SEZNAM OKRAJŠAV

AT III	antitrombin III
d	povprečni premer
DLS	dinamično sipanje laserske svetlobe
LDV	lasersko Dopplerjevo merjenje hitrosti
MM	molekulska masa
MTS test	test aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze
ND	nanodelci
PBS	fosfatni pufer
PDI	polidisperzni indeks
PEG-TMC	polietilenglikol-trimetil hitosan
PEK	polielektrolitni kompleksi
PES-Na	natrijev polietilensulfonat
PCD	detektor naboja delcev
Poly-DADMAC	poli-dialildimetilamonijev klorid
TMC	trimetil hitosan
TPP	pentanatrijev tripolifosfat
ZP	zeta potencial

1 UVOD

1.1 Nanodelci

V zadnjem obdobju postajajo nanodelci kot dostavni sistemi predmet številnih raziskav, predvsem zaradi sposobnosti dostave širokega spektra učinkovin na različna področja človeškega telesa. So trdni koloidni delci velikosti 10-1000 nm. Nanometrski dostavni sistemi lahko izboljšajo topnost učinkovin, vplivajo na sproščanje, spremenijo njihovo porazdeljevanje v organizmu, jih usmerijo do želenih celic in tkiv. Njihova prednost pred mikro- ali makrosistemi je nanometrski velikost, ki omogoča drugačne interakcije z biološkim okoljem. So prodornejši, potujejo globlje v tkiva, prehajajo skozi epitelij ali vstopajo v celice (1,2).

Zgrajeni so iz nosilnega ogrodja, ki je sestavljeno iz fiziološko sprejemljivih polimernih makromolekul, ki omogočajo nastanek polimernih nanodelcev ali iz trdnih lipidov, iz katerih pripravimo trdne lipidne nanodelce. Glede na razporeditev nosilnega ogrodja jih delimo na nanosfere in nanokapsule. Nanosfere imajo ogrodje razporejeno po celotnem volumnu, medtem ko nanokapsule predstavljajo filmsko obliko nanodelcev s polimerno oblogo kot lupino in tekočo ali trdno notranjo sredico. Učinkovina je v ogrodju nanodelcev raztopljena, vanj vključena ali adsorbirana na njegovo površino (1).

Uspešnost vgradnje učinkovine v nanodelce je odvisna od kemične sestave polimera, molekulske mase, interakcij polimer-učinkovina in prisotnosti funkcionalnih skupin (esterskih ali karboksilnih). V nanodelce iz hidrofobnih polimerov lažje vgrajujemo lipofilne učinkovine, medtem ko vgradnja hidrofilnih učinkovin predstavlja izziv predvsem zaradi uhajanja učinkovine v zunanjo vodno fazo. Obstajajo številne možnosti optimizacije vgradnje hidrofilnih učinkovin: izbira postopka izdelave, dodatek pomožnih snovi, ustrezna pH vrednost, neionizirana in ionizirana oblika učinkovine, molekulska masa polimera (3).

Poznamo različne metode za izdelavo polimernih nanodelcev: prečno zamreženje makromolekul, polimerizacija monomernih enot in obarjanje polimerov. Večina teh metod zahteva ostre pogoje za njihovo izdelavo, ki lahko škodijo sami učinkovini, ki jo vgrajujemo, in njeni biološki aktivnosti. Izbor metode in pogojev izdelave je potrebno razviti za vsako posamezno proteinsko učinkovino.

Čedalje več avtorjev se pri izdelavi nanodelcev odloča za blage metode brez uporabe škodljivih organskih topil, intenzivnega mešanja in segrevanja. Med slednje spada tudi metoda polielektrolitnega kompleksiranja polimerov v polielektrolitne komplekse (1,2).

1.1.1 Fizikalno vrednotenje nanodelcev

Velikost delcev

Velikost delcev je pomembna lastnost sistema, saj je le-ta velikokrat ključnega pomena za obnašanje koloidnih sistemov v *in vitro* ali/in *in vivo* sistemih. Pri razvoju koloidnih dostavnih sistemov je izrednega pomena, da lahko pravilno določimo velikost delcev, predvsem ko gre za delce nanometrskih velikosti. Poznamo različne metode, s katerimi lahko vrednotimo velikost nanodelcev, to so predvsem metode, ki temeljijo na sipanju svetlobe ter elektronska mikroskopija (4).

Pri našem eksperimentalnem delu smo uporabili aparat Zetasizer Nano ZS, ki meri velikost delcev na podlagi dinamičnega sipanja laserske svetlobe (DLS). Osnova DLS je Brownovo gibanje, ki predpostavlja, da delci, dispergirani v tekočini, niso nikoli stacionarni, ampak so zaradi naključnih trkov z okoliškimi molekulami topila stalno podvrženi gibanju. Zetasizer Nano meri stopnjo nihanja intenzitete sipane svetlobe na delcih ter na podlagi teh meritev izračuna velikost delcev. Pomembno je vedeti, da se majhni delci gibljejo hitreje, večji pa počasneje. Torej je hitrost nihanja intenzitete sipane svetlobe pri večjih delcih manjša (5).

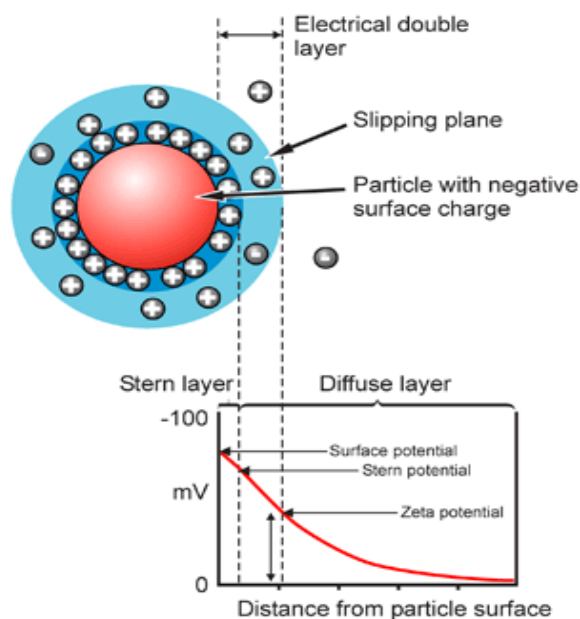
Zeta potencial (ZP)

Predstavljajmo si nabit delec v raztopini. Zaradi površinskega naboja ta delec privlači ione z nasprotnim nabojem. Na ta način se okoli delca oblikuje tako imenovan Sternov sloj. V Sternovem sloju so predvsem ioni nasprotnega naboja in ti so relativno trdno vezani na površino delca. V bližini zunanje meje Sternovega sloja imamo tako neko porazdelitev pozitivno in negativno nabitih ionov, ki glede na okolico izkazujejo nek električni potencial. Protiioni nevtralizirajo površinski naboj delca. Zmanjšanje površinskega potenciala bo seveda tem večje, čim večja bo razpoložljiva koncentracija protiionov v raztopini. Na določeni oddaljenosti od delca se nato naboji v tekočini prisotnih anionov in kationov zopet izenačijo. To razdaljo privzamemo kot zunanji rob drugega sloja, ki ga imenujemo difuzni sloj. Sternov in difuzni sloj skupaj imenujemo električni dvosloj. Znotraj difuznega sloja obstaja meja, do katere delec in ioni tvorijo stabilno entiteto. Ko se

delec giblje, se ioni do te meje gibljejo z njim, ostali pa se odstranijo. Potencial, ki obstaja na tej meji se imenuje zeta potencial (slika 1).

Pri merjenju zeta potenciala izkoriščamo metodo, ki se imenuje lasersko Dopplerjevo merjenje hitrosti (LDV). Zetasizer Nano pri merjenju zeta potenciala izkorišča pojav elektroforeze. Hitrost gibanja delcev je odvisna od jakosti električnega polja, dielektrične konstante, viskoznosti medija in zeta potenciala (Henryjeva enačba). Električni potencial, ki ga delci izkazujejo glede na okolico, povzroča mobilnost delcev v električnem polju. Nabiti delci v električnem polju potujejo k nasprotno nabiti elektrodi. Viskozne sile na delec bodo temu gibanju nasprotovale. Ko pa bo doseženo ravnotežje med tema nasprotujočima se silama, bo delec potoval s konstantno hitrostjo (6, 7).

Vrednost zeta potenciala nam poda informacijo o fizikalni stabilnosti koloidnih disperzij. V primeru, ko imajo delci v raztopini močno negativen ali pozitiven naboj, se bodo le-ti med seboj odbijali in ne bodo težili k flokulaciji. Če pa imajo delci nizko absolutno vrednost zeta potenciala, ni prisotnih sil, ki bi delcem preprečile združevanje in posledično flokulacijo. Za disperzije, ki imajo zeta potencial večji od +30 mV ali manjši od -30 mV velja, da so fizikalno stabilne. Delci se odbijajo drug od drugega, kar omogoči stabilnost disperzije. Kadar se zeta potencial približuje vrednosti 0 mV, se delci med seboj več ne odbijajo in možnost njihove agregacije narašča. Najpomembnejši faktor, ki vpliva na zeta potencial je pH. V kislem so delci bolj pozitivno nabiti, v bazičnem pa negativno. Koloidni sistem je najmanj stabilen pri tisti pH vrednosti, kjer je zeta potencial enak 0 (izoelektrična točka) (8, 9).



Slika 1: Shematski prikaz zeta potenciala (9).

Gostota naboja

Pomembna skupina disperzij so elektrostatsko stabilizirani sistemi delcev, katerih ravnovesje naboja je določeno z ionskimi skupinami na površini. Za karakterizacijo takšnih sistemov je potrebno uporabiti več različnih analiznih postopkov, kot so na primer konduktometrična in potenciometrična titracija, titracija motnosti za določitev kritične koncentracije koagulacije, določitev velikosti delcev in zeta potencial.

Zeta potencial kot kriterij stabilnosti koloidov nam da samo delni odgovor, saj nam ničesar ne pove o dovzetnosti koloida glede na vnos motečih snovi. Povsem nizek naboj lahko povzroči visok zeta potencial, ki se poruši že pri dodatku nizkih količin motečih snovi. V praksi šele merjenje gostote naboja omogoči uporabno oceno stabilnosti koloida. Kvantitativno določitev gostote naboja tako v koloidnih sistemih kot tudi v raztopinah polielektrolitov lahko z veliko natančnostjo izvedemo z aparaturo za detekcijo naboja delcev imenovano PCD (particle charge detector) (10).

PCD dopolnjuje zetameter, ker je z njim mogoče določati naboj v vodi raztopljenih snovi, torej površinski naboj delcev v disperznih sistemih. Zetameter pa kaže le naboj v vodi dispergiranih delcev, to je električni naboj na mejnih površinah.

S PCD lahko določimo kvantitativno le naboj nič. Določitev naboja preko titracije ničelne točke je mogoča tudi z zetametrom, tako da množino naboja disperzije postopno zmanjšujemo z dodatkom titrne raztopine in vsakič določimo pripadajoči ZP. Nasprotno pa z nevtralizacijo naboja s PCD aparaturo izvedemo določitev množine naboja titrimetrijsko v eni delovni operaciji (10).

Način delovanja aparature PCD

Cilindrična merilna celica in vpet spodrivni bat tvorita osrednji del aparature. Ko merilno celico PCD detektorja napolnimo s preiskovano raztopino vzorca, se visoko molekularni raztopljeni delci ali polimerne molekule kot nosilci naboja zaradi van der Waalsovih sil adsorbirajo na površino celice in s tem imobilizirajo.

Z osciliranim premikanjem bata doteka vzorec na stene merilne celice, ustvari se hiter tok nasprotno nabitih ionov k površini merilne celice, pri čemer se inducira tako imenovani tokovni potencial. Dve elektrodi iz plemenite kovine merita tokovni potencial, ki se prikaže na ekranu aparature v mV (začetni potencial). Ionski karakter preiskovanega nosilca naboja se prikaže preko dveh lučk (zelena – kationski, rdeča – anionski karakter).

Električni signal izgine, ko polimerne molekule niso več nabite. To nevtralno točko naboja lahko PCD prepozna z veliko občutljivostjo. Tako kvantitativna določitev gostote naboja temelji na odstranitvi naboja (razelektrenju) disperzije s polielektrolitno titracijo. Vzorcju dovajamo nasprotno nabit titracijski polielektrolit in sicer tako dolgo, dokler vzorec navzven ne kaže nobenega naboja. Ta nevtralna točka naboja (0 mV) odgovarja stanju destabilizacije koloidnega sistema.

Iz porabe titracijske raztopine, ki je potrebna za doseganje nevtralne točke naboja disperznega sistema, lahko nazaj sklepamo na celotno gostoto naboja vzorca.

Primerni reagenti za kvantitativno določitev gostote naboja koloidnih sistemov so polielektroliti (npr. PES-Na, Poly-DADMAC), ki se zaradi visoke molekulske mase učinkovito adsorbirajo na površino merilne celice. Torej lahko s PCD aparaturo preiskujemo vse sisteme, katerih nosilci naboja se adsorbirajo na stene merilne celice in s tem povzročijo nastanek merilnega signala (tokovnega potenciala) (10).

Selektivnost postopka

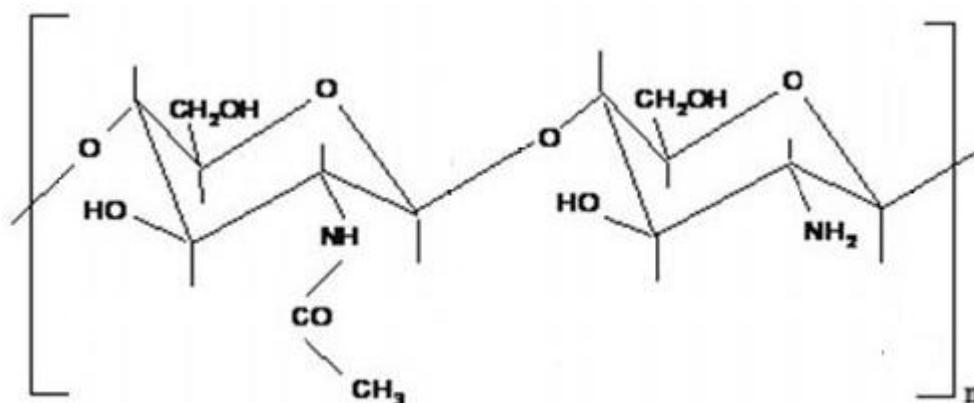
Ko se nosilci naboja adsorbirajo na stene merilne celice, se pri tem preiskovani vzorec ne spremeni, saj površina merilne celice služi le za njihovo imobilizacijo. Ker se samo velike molekule ali delci z molekulsko maso ≥ 1000 zadostno adsorbirajo na stene merilne celice, je aparatura PCD selektivna za visokomolekularne sisteme, kar pomeni, da nizkomolekularne nosilce naboja (ione) metoda ne zajame. Zaradi izločitve nizkomolekularnih ionov je PCD (slika 2) bolj primeren za karakterizacijo sistemov delcev kot npr. konduktometrične metode, ki zajemajo vse nosilce naboja, to pomeni tudi nizkomolekularne ione (10).



Slika 2: Aparatura za določitev gostote naboja PCD (11).

1.2 Hitosan

Hitosan je kemijsko kopolimer glukozamina in N-acetilglukozamina, ki sta med seboj povezana z $\beta(1-4)$ vezjo (slika 3). Je netoksičen, bioadheziven in biokompatibilen kationski polisaharid. Pridobivajo ga z delnim deacetiliranjem polimera hitina, ki je sestavljen iz N-acetilglukozaminskih enot in je za celulozo drugi najbolj razširjen polisaharid v naravi. Nahaja se v oklepih rakov, nekaterih insektih in gobah. Hitin je v vodnih raztopinah zelo slabo topen, zato je za industrijsko uporabo veliko bolj primeren hitosan, vendar je tudi ta topen le v kislih raztopinah, v alkalnem in nevtralnem pH območju je netopen. (12) Poznamo več vrst hitosana, ki se med sabo razlikujejo v molekulski masi, viskoznosti in stopnji deacetilacije. Z anorganskimi in organskimi kisljinami, kot so glutaminska, klorovodikova, mlečna in očetna kislina, tvori soli. Viskoznost disperzij hitosana narašča z nižanjem temperature, z večanjem koncentracije in z večanjem stopnje deacetiliranja (13).



Slika 3: Strukturna formula hitosana (14).

(n = število sladkornih enot polimera)

Hitosan ima majhno peroralno toksičnost, saj je LD₅₀ pri podganah 16g/kg telesne teže. Toksičnost je odvisna od stopnje deacetiliranja, molekulske mase, čistosti hitosana ter od načina aplikacije. Za humano uporabo se priporoča le hitosan z najvišjo stopnjo čistosti.

Hitosan učinkovito poveča permeabilnost različnih sluznic. Sposobnost hitosana za pospeševanje absorpcije so dokazali pri številnih učinkovinah (insulin, lososov kalcitonin, hidrokortizol, rastni faktor TGF-β in aciklovir). Prav tako izkazuje dobre bioadhezivne lastnosti, ki so predvsem posledica tvorbe vodikovih in ionski vezi med pozitivno nabitimi amino skupinami polimera ter negativno nabito sialično kislino, ki je prisotna v glikoproteinih na površini sluznice. Hitosan se lahko adherira na trda in mehka tkiva, je pa njegova bioadhezija omejena s topnostjo posameznih derivatov tega polimera.

Hitosan se uporablja v različnih oblikah, najpogosteje v obliki glutamata ali klorida. Na sposobnost obeh soli, da povečata permeabilnost, vpliva pH vrednost disperzije hitosana. Hitosan vstopa v interakcije z negativno nabitimi mesti na celični membrani preko pozitivno nabitih amino skupin. pKa hitosana je okoli 6,5. Večja gostota naboja pri nižjem pH omogoči hitosanu boljši stik z epitelijsko membrano. Poleg omenjenih dve hitosanov se kot pospeševalci absorpcije uporabljajo še drugi derivati hitosana. Delno kvaterniziran N-trimetil hitosan je v enakih koncentracijah manj učinkovit kot hitosan v obliki klorida in hkrati bolj topen pri pH 7,4 od zgoraj omenjenih hitosanov. Uporabljajo se tudi mono-N-karboksimetil hitosan in tiohitosani, ki zavirajo encim protein tirozin-fosfatazo, katera vpliva na uravnavanje odprtosti tesnih stikov.

Zaradi dobrih bioadhezivnih lastnosti se hitosan pogosto uporablja v razvoju novih dostavnih sistemov. Ti sistemi izboljšajo biološko uporabnost vgrajenih učinkovin v primerjavi s klasičnimi dostavnimi sistemi, saj podaljšajo čas zadrževanja učinkovine na mestu adhezije ter omogočijo tesnejši stik farmacevtske oblike s sluznico, skozi katero se učinkovina absorbira. Pri načrtovanju novih dostavnih sistemov se izkorišča tudi sposobnost hitosana, da poveča absorpcijo učinkovin skozi različne sluznice (poročajo o njegovi sposobnosti odprtja tesnih stikov). Uporablja se pri izdelavi mikro in nanodelcev ter liposomov. V te dostavne sisteme se lahko vgrajujejo polarne učinkovine, proteini, antigeni in DNK fragmenti. Uporablja se lahko tudi v dostavnih sistemih za kolon, kjer se izkorišča njegova razgradnja z bakterijskimi encimi v kolonu. Hitrost razgradnje je odvisna od molekulske mase in stopnje deacetiliranja. Hitosan se uporablja v pripravkih za znižanje telesne mase, vsakodnevno jemanje hitosana zniža nivo holesterola in trigliceridov ter poveča izločanje žolčnih kislin in maščob z blatom, pospeševal naj bi celjenje ran in zaviral rast ter razmnoževanje bakterij (13).

1.3 Antikoagulant

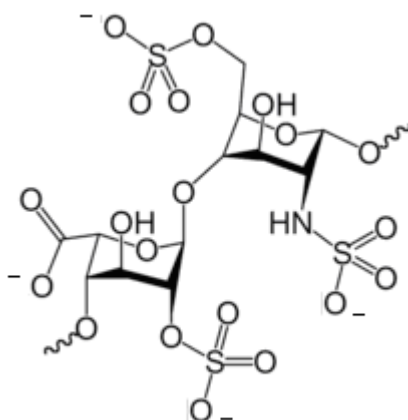
Antikoagulant so skupina zdravilnih učinkovin, ki se uporabljajo za zdravljenje in preprečevanje trombotičnih in tromboemboličnih zapletov, ki imajo lahko za posledico miokardni infarkt, kap, globoko vensko trombozo ali pljučno embolijo. Za te namene se uporabljajo intravenski antikoagulant (heparin in novejši inhibitorji trombina) in peroralni antikoagulant (varfarin in njemu podobne učinkovine) (15).

1.3.1 Intravenski antikoagulant

Heparin

Heparin ni samo ena spojina, ampak gre za skupino sulfoniranih glikozaminoglikanov (mukopolisaharidov). Komercialno dostopnega pridobivajo z ekstrakcijo iz govejih pljuč ali iz črevesne sluznice goveda, svinje ali ovce. Molekula heparina ima tri vrste kislih funkcionalnih skupin: sulfatne, sulfamidne in karboksilne skupine (slika 4). Uporablja se za preprečevanje krvnih strdkov, njihovo rast, širjenje ter posledično zamašitev žil. Z njim preprečujemo in zdravimo nastajanje krvnih strdkov v ožilju po operacijah, pri bolnikih, ki so zaradi bolezni dalj časa negibni in pri drugih bolezenskih stanjih, kjer je treba njihovo

nastajanje preprečiti. Uporabljamo ga tudi za preprečevanje strjevanja krvi med hemodializo in med operativnimi posegi z zunajtelesnim obtokom (15,16).



Slika 4: Strukturna formula heparina (17).

Mehanizem delovanja

Heparin preprečuje strjevanje krvi, tako da aktivira antitrombin III (AT III). AT III inhibira trombin (IIa) in druge faktorje, ki sodelujejo pri strjevanju krvi (IXa, Xa, XIa in XIIa), tako da se veže na aktivno mesto serina. Aktiviran AT III se pospešeno veže na zgoraj omenjene koagulacijske faktorje, ki tako postanejo neaktivni.

Nizkomolekularni heparini delujejo enako kot standardni heparin, razlikujejo se le po tem, da le-ti delujejo predvsem na faktor Xa, na trombin pa imajo bistveno manjši vpliv (15).

Farmakokinetika in načini aplikacije

Heparin se zaradi negativnega naboja in velikosti slabo absorbira iz gastrointestinalnega trakta, zato ga apliciramo intravensko ali subkutano (intramuskularna aplikacija lahko povzroči nastanek hematov). V obliki intravenske injekcije bo učinek heparina nastopil takoj, v primeru subkutane aplikacije pa v roku 60 min. Razpolovna doba heparina je 40-90 min. Slaba stran standardnega heparina je nepredvidljiv antikoagulacijski učinek zaradi vezave na plazemske proteine.

Nizkomolekularne heparine apliciramo subkutano. Njihova razpolovna doba je daljša v primerjavi s standardnim. Njihove prednosti so bolj predvidljivi antikoagulacijski učinki, manj pogosto odmerjanje in manjša pojavnost krvavitev (15).

Možni neželeni učinki

Pri zdravljenju s heparinom zelo pogosto pride do krvavitev, zvišane so lahko vrednosti določenih jetrnih encimov. Priporočljivo je preverjanje števila trombocitov pred začetkom zdravljenja in vsak drugi ali tretji dan zdravljenja. Pogosto se po globoki podkožni injekciji pojavijo na mestu vboda rdečina, bolečina, podkožna krvavitev ali kožna razjeda. Med občasnimi neželenimi učinki je tudi plešavost. Redko pride do preobčutljivostnih reakcij, katerih znaki so mrzlica, povišana telesna temperatura, koprivnica, oteženo dihanje, izcedek iz nosu, solzenje, glavobol, slabost in bruhanje. Med dolgotrajnim zdravljenjem se lahko prehodno zmanjša gostota kosti (osteoporoza), vendar po prenehanju zdravljenja ti znaki izginejo (16).

1.4 Polielektrolitni kompleksi

Številne metode, ki jih uporabljamo za izdelavo nanodelcev, vključujejo uporabo organskih topil, močno segrevanje ali agresivno mešanje. Vse to pa lahko potencialno škodi oziroma vpliva na spremembe občutljivih biomolekul. Tem neugodnim okoliščinam se lahko izognemo z uporabo milejših metod, med katere spada tudi metoda polielektrolitnega kompleksiranja (19).

Polielektrolitni kompleksi se preučujejo kot dostavni sistemi za različne zdravilne učinkovine (insulin, heparin), proteine, peptide in DNA. Nastanejo s spontanim združevanjem nasprotno nabitih ionov v raztopini, pri čemer pride do tvorbe intermolekularnih vezi (H-vez, ionska vez, van der Waalsova vez). Na njihov nastanek in stabilnost lahko vplivamo s spreminjanjem parametrov, kot so stopnja ionizacije, gostota naboja, koncentracija polimera, molekulska masa polimera, razmerje med posameznimi polimeri, ionska moč in pH disperznega medija (20).

Na podlagi strukturnih značilnosti izhodnih polielektrolitov razlikujemo dve vrsti PEK: stehiometrične in nestehiometrične

- Nestehiometrični PEK nastanejo v primeru, ko imamo opraviti s šibkimi polielektroliti. Ti se med seboj razlikujejo v molekulski masi in so združeni v nestehiometričnem razmerju, tako da imamo presežek enega od nabojev. Sestavljeni so iz dolgih verig osnovnega polielektrolita, ki je kompleksiran s

krajšimi verigami polielektrolita z nasprotnim nabojem. Nastale strukture so v večini primerov vodotopne.

- Pri močnih elektrolitih, ki imajo podobno molekulsko maso in so združeni v stehiometričnem razmerju, pa nastanejo stehiometrični PEK. V tem primeru je neto naboj enak nič. Ponavadi so netopni ali pa se med procesom izdelave oborijo (20,21).

1.4.1 Polielektrolitni nanokompleksi iz hitosana in heparina

Nizkomolekularni heparini so po peroralni poti skoraj neučinkoviti in zahtevajo intravensko aplikacijo, ki je za pacienta manj prijazna. Poleg tega je njihova uporaba omejena na ambulantno raven. V ta namen so se številni strokovnjaki začeli ukvarjati z razvojem novega dostavnega sistema, ki bi omogočil peroralno aplikacijo heparinov. Nanometrski dostavni sistemi za hidrofilne makromolekule so bili predmet številnih raziskav, saj omogočajo zaščito učinkovin pred kislinsko in encimsko razgradnjo v želodcu, zaradi njihove majhnosti je povečana permeabilnost skozi membrane, večja je absorpcija vgrajene učinkovine.

Wei Sun in sodelavci so pripravili nanodelce iz derivatov hitosana in enoksaparina. Preučevali so vpliv različnih fizikalno-kemijskih parametrov, ki vplivajo na tvorbo PEK. Pri študiji so uporabljali različne derivate hitosana in sicer hitosane z različnimi molekulskimi masami, tiohitosan, derivate trimetil hitosana (TMC) ter kopolimer polietilenglikola in trimetil hitosana (PEG-TMC). PEK med različnimi derivati hitosana in enoksaparinom so pripravili z metodo polielektrolitnega kompleksiranja, pri čemer je prišlo do interakcij med pozitivno nabitimi molekulami hitosana in negativno nabitimi molekulami enoksaparina (22).

Ugotovili so, da ima tiohitosan v primerjavi z običajnim hitosanom boljše mukoadhezivne lastnosti in boljšo permeabilnost predvsem na račun tvorbe kovalentne vezi med sulfidnimi skupinami polimera in cisteinskimi podenotami glikoproteinov v mukusu. TMC ima veliko boljšo topnost, saj je topen v vodi pri zelo širokem pH območju, medtem ko je hitosan topen le v kislem okolju. Dokazali so izboljšano absorpcijo TMC v nevtralnem in bazičnem okolju. V primeru kopolimerov PEG-TMC so dobili boljšo topnost, manjšo velikost delcev in boljšo stabilnost v primerjavi s standardnim hitosanom.

Preučevali so tudi vpliv pH sistema na lastnosti nastalih PEK. Da pride do nastanka PEK, morata biti oba polimera v ionizirani obliki in imeti nasproten naboj. To pomeni, da lahko pride do interakcije le v bližini pKa intervala obeh polimerov (pKa hitosana 6,5; pKa heparina 3,1). Zato so opazovali velikost nastalih PEK v območju od pH 3 do 7. Rezultati so pokazali, da velikost nastalih PEK ni odvisna samo od MM hitosana, ampak tudi od pH sistema. Le-ta pa v končni fazi vpliva na fizikalno stabilnost samega koloidnega sistema. V začetni fazi je z naraščanjem pH velikost delcev padala (pH 3,0-4,5), sledil je plato v območju od pH 4,5-6,5. Nato pa je velikost delcev začela naraščati, nad pH 7 so delci začeli agregirati. Rezultati so posledica dejstva, da je hitosan v kislem mediju visoko pozitivno nabit in medsebojni odboj protoniranih amino skupin povzroči, da je struktura hitosana močno raztegnjena, kar omogoča tvorbo večjih kompleksov z negativno nabitim enoksaparinom. Z naraščanjem pH sistema se pozitivni naboj hitosana zmanjšuje, manjša se odbojna sila in tvorijo se nanodelci manjših velikosti. Ko pH naraste nad 6,5, je manj kot 50% amino skupin hitosana pozitivno nabitih, zmanjša se tako topnost hitosana kot tudi elektrostatski odboj med delci. Sistem postane nestabilen in teži h koacervaciji, nad pH 7 pride do obarjanja. Do enakih ugotovitev je prišel tudi Yu-Hsin Lin s sodelavci (23).

Masno razmerje polimer/enoksaparin ima prav tako pomemben vpliv na končne lastnosti PEK. Avtorji so ta vpliv spremljali tako, da so različne raztopine hitosana titrirali z raztopino enoksaparina. S pomočjo DLS so spremljali velikost nastalih nanodelcev in vrednosti intenzitete sipane svetlobe. V začetni fazi titracije je prišlo do nastanka večjih delcev, verjetno se je ena molekula enoksaparina močno povezala z večjih številom molekul hitosana. Sledil je padec povprečne velikosti delcev vse do platoja, intenziteta sipane svetlobe je signifikantno porasla, saj je prišlo do nastanka večjega števila delcev. Z nadaljnjim povečevanjem koncentracije enoksaparina so dosegli kritično točko, pri kateri je začela velikost delcev intenzivno naraščati, intenziteta sipane svetlobe pa je ostala konstantna. Ta točka je bila izbrana za izračun optimalnega masnega razmerja med hitosanom in enoksaparinom, ki je v primeru hitosana z MM 50 kDa znašalo 2:1. Z nadaljevanjem titracije je velikost delcev še bolj narasla, prišlo je do flokulacije. Dokazali so, da je stehiometrično razmerje odvisno od same strukture polimera, saj so v primeru različnih hitosanov dobili različna optimalna razmerja (tiohitosan/enoksaparin 2:1, TMC/enoksaparin 0,3:1, PEG-TMC/enoksaparin 1:1). Iz tega pa sledi, da je optimalno masno razmerje v prvi vrsti odvisno od gostote naboja uporabljenega polimera. Avtorji so

ugotovili, da z naraščajočim masnim razmerjem hitosan/enoksaparin velikost delcev narašča.

S poskusom, v katerem so uporabili hitosane z različnimi molekulskimi masami pri optimalnem masnem razmerju hitosan/enoksaparin, so dokazali, da z naraščanjem molekulske mase hitosana narašča tudi velikost pripravljenih nanodelcev. Hitosan z MM 400 kDa je tvoril nanodelce v velikosti približno 700 nm, hitosan z MM 10kDa pa 240 nm. Pri istem masnem razmerju je pri hitosanu z manjšo MM struktura bolj zavita in izpostavljenih je več kationskih skupin, kar olajša nastanek PEK. Molekulska masa hitosana je imela le manjši vpliv na površinski naboj nastalih PEK. Z zmanjšanjem MM hitosana je prišlo do rahlega padca vrednosti ZP. Pripravljeni nanodelci so imeli pozitiven ZP in sicer delci s hitosanom 400 kDa $7,5 \pm 1,2$ mV, s hitosanom 10 kDa pa $4,7 \pm 0,3$ mV (22). Vpliv molekulske mase polimera na velikost nastalih nanodelcev so potrdili tudi Tianzhi Yang in sodelavci (24).

Lastnosti nanodelcev so prav tako odvisne od koncentracije uporabljenega polimera. Velikost delcev PEK je naraščala z naraščajočo koncentracijo hitosana neodvisno od njegove MM. Pri hitosanu z MM 50 kDa je bila velikost delcev $232,1 \pm 5,8$ nm pri koncentraciji 0,5 mg/ml in $811,6 \pm 35,3$ nm pri koncentraciji 3 mg/ml. Pri konstantnem masnem razmerju hitosan/enoksaparin je z naraščajočo koncentracijo polimera naraščalo število nastalih nanodelcev, s tem pa tudi njihova težnja k agregaciji. Možno je tudi, da je ena molekula enoksaparina interagirala z več kot eno molekulo hitosana, kar je povzročilo naraščanje velikosti nastalih delcev. Ugotovili so tudi, da je stopnja povečanja velikosti delcev odvisna od MM hitosana. Velikost nastalih PEK je manj občutljiva na spremembo koncentracije polimera v primeru hitosana z manjšo MM kot v primeru hitosana z večjo MM (22).

1.4.2 Polielektrolitni kompleksi iz hitosana, heparina in TPP

Motlekar in njegovi sodelavci so pripravili nanodelce iz hitosana, heparina in TPP v vlogi prečnega premreževalca oziroma stabilizatorja. Njihov namen je bil ugotoviti, kakšen vpliv ima dodatek TPP na končne lastnosti nanodelcev, namenjenih za peroralno aplikacijo. Nanodelce brez oziroma s TPP so pripravili s spontanim združevanjem nasprotno nabitih polimerov. Raztopini hitosana so med mešanjem z magnetnim mešalom počasi dodajali raztopino heparina z dodanim TPP ali brez. Nanodelci so imeli različna masna razmerja

hitosan/heparin in sicer 1:0,1; 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6 in 1:0,8. Pripravljenim disperzijam so izmerili velikost delcev na podlagi dinamičnega sipanja laserske svetlobe.

Ugotovili so, da velikost nastalih nanodelcev brez TPP pada z naraščajočo koncentracijo heparina. Delci so bili veliki od 200 do 1000 nm. Dodatek TPP je izrazito zmanjšal velikost nastalih delcev, tudi za 300 nm. V primeru masnega razmerja hitosan/heparin 1:0,1 so bili delci brez dodanega TPP veliki približno 1000 nm, z dodatkom TPP pa se je njihova velikost zmanjšala na 400 nm. TPP kot prečni premreževalec poveča število interakcij s hitosanom, posledica so manjši delci. Dobljeni rezultati so zelo spodbudni, saj je velikost delcev lahko omejujoč dejavnik pri uporabi določenega dostavnega sistema (25).

Tudi Boonsongrit je s sodelavci preučeval vpliv dodanega TPP na velikost delcev, zeta potencial in gostoto naboja. Mikro/nanodelce so pripravili na enak način kot zgoraj, le da so v tem primeru namesto heparina uporabili insulin. Disperzije so enkrat pripravili z in drugič brez dodatka TPP. Dodatek TPP ni povzročil signifikantne razlike v velikosti nastalih delcev. Delci z dodanim TPP so imeli manjši ZP in manjšo gostoto naboja v primerjavi z delci brez TPP. Z naraščajočo koncentracijo TPP je prišlo do padca vrednosti ZP in nastanka večjih delcev (26).

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge bo izdelati hitosanske nanodelce s heparinom ter jih fizikalno-kemijsko ovrednotiti.

V prvem delu diplomske naloge bomo z metodo polielektrolitnega kompleksiranja pripravili disperzije nanodelcev iz hitosana in heparina. Uporabili bomo tri različne hitosane, in sicer hitosanijev klorid Protasan, hitosanijev hidroklorid in nizkomolekularni hitosan. Nanodelce z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosan bomo pripravili tako, da bomo v raztopino hitosana med mešanjem z magnetnim mešalom z avtomatsko pipeto počasi dodajali raztopino heparina. Izdelanim nanodelcem bomo s pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS izmerili velikost delcev, zeta potencial in polidisperzni indeks. S pomočjo teh parametrov bomo za posamezen hitosan določili optimalno masno razmerje heparin/hitosan. S polielektrolitno titracijo bomo določili tudi gostoto naboja osnovnim raztopinam hitosana in heparina ter pripravljenim disperzijam nanodelcev. S pomočjo avtomatskega titratorja bomo spremljali vpliv pH na stabilnost nastalih disperzij nanodelcev. Da bi ugotovili, ali so disperzije nanodelcev stabilne skozi daljše časovno obdobje, bomo zgoraj omenjene parametre spremljali 14 dni. Pogledali bomo tudi, kakšen vpliv ima skupna koncentracija polimerov na končne lastnosti nanodelcev.

V drugem delu bomo nanodelce pripravili tako, da bomo poleg hitosana in heparina uporabili še natrijev tripolifosfat (TPP) kot stabilizator oziroma premreževalec. Najprej bomo določili optimalno masno razmerje med hitosanom in TPP, nato pa le-tega uporabili pri izdelavi nanodelcev z različnim masnim razmerjem heparin/hitosan. Pogledali bomo, če dodatek TPP vpliva na končne lastnosti nanodelcev.

V zadnjem delu diplomske naloge bomo preverili, ali so pripravljene disperzije nanodelcev citotoksične. Kot modelne celice bomo uporabili keratinocite.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Materiali

Materiali za pripravo nanodelcev

- hitosanijev hidroklorid, Kraeber & Co GmbH, Nemčija
MM 30 – 400 kDa , stopnja deacetilacije 88,8%
- hitosanijev klorid, Protasan UP CL 212, Pronova, Norveška
MM $\geq$ 50kDa, stopnja deacetilacije 87%
- nizkomolekularni hitosan, BioChemika, Fluka, Švica
- heparin, 5.000 i.e./1ml raztopina za injiciranje, Krka, Novo mesto, Slovenija
- pentanatrijev tripolifosfat ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), 90-95%, Sigma-Aldrich, ZDA
- očetna kislina, brezvodna 100%, Merck KGaA, Nemčija
- prečiščena voda

Materiali za določanje gostote naboja

- **anionski polielektrolit:** 0,001 M PES-Na (pripravimo ga tako, da zatehtamo 0,131 g koncentrata PES-Na v 1000 ml bučko ter dopolnimo z destilirano vodo)
PES-Na – natrijev polietilensulfonat, prah konc. 99,5 %, BTG Mütek GmbH, Nemčija
- **kationski polielektrolit:** 0,001 M Poly-DADMAC (pripravimo ga tako, da zatehtamo 0,374 g koncentrata Poly-DADMAC v 1000 ml bučko ter dopolnimo z destilirano vodo)
Poly-DADMAC - poli-dialildimetilamonijev klorid, tekočina konc. 41 %, BTG Mütek GmbH, Nemčija

Materiali za avtotitracijo pripravljenih disperzij nanodelcev

- 0,1 M NaOH, Merck, Nemčija
- 0,01 M NaOH, Merck, Nemčija

Materiali za preverjanje citotoksičnosti nanodelcev

- celična kultura: Keratinociti (NCTC2544), ICLC, Univerza v Genovi, Italija

- medij za gojenje keratinocitov: MEM (Minimum essential medium), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- tripsin (0,25% (v/v)) x EDTA, Promega Corporation, ZDA
- MTS reagent: CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent, Promega Corporation, ZDA
- 70% etanol

Reagenti za pripravo medija za gojenje keratinocitov

Končen medij za gojenje keratinocitov smo pripravili tako, da smo k že pripravljenemu mediju za gojenje keratinocitov MEM dodali še:

- fetalni goveji serum, Gibco[®] - Invittogen, ZDA
- neesencialne aminokisline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- 2mM L-glutamin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- antibiotik (penicilin in streptomycin) in antimikotik (amfotericin B), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- fosfatni pufer (PBS) s pH 7,4

Reagenti za pripravo PBS pufra

- natrijev klorid (NaCl), Merck, Darmstadt, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt, Nemčija
- kalijev klorid (KCl), Merck, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Merck, Darmstadt, Nemčija
- klorovodikova kislina (HCl), Merck, Darmstadt, Nemčija
- bidestilirana voda

3.2 Naprave

- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- avtomatska pipeta, 50-1000 μl , Biohit, Finska
- avtomatska pipeta, 20-100 μl , Biohit, Finska
- centrifuga Centric 322A, Tehnica, Slovenija
- detektor naboja delcev PCD 03, BTG Mutek GmbH, Nemčija
- filtri Minisart hidrofilni (1,20 μm), Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija
- hemocitometer, Neubauer 0,0025 mm^2 , BRAND, Nemčija

- inkubator, Sorvall® Heraeus, Kendro Laboratory Products, Nemčija
- invertni svetlobni mikroskop, Olympus CKX41, Japonska
- komora z laminarnim pretokom zraka (LAF), Iskra PIO, tip M 12 (pretok zraka 0,4 m/s, dimenzija filtra 1220x610x69 mm, zagotavlja čiste pogoje dela razreda 4 po ISO 14644-1)
- magnetno mešalo, Variomag Poly, Thermo Scientific, Komet, Nemčija
- magnetno mešalo, IKA-WERKE Ro 15 power, Nemčija
- mikrotitrski čitalec Safire2™, Tecan, Švica
- mikrotitrne plošče s 96-imi vdolbinicami, TPP® Techno Plastic Products, Transadingen, Švica
- pH meter, SevenMulti, Mettler Tolledo, Schwerzenbach, Švica
- polistirenske plošče za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm², TPP® Techno Plastic Products, Transadingen, Švica
- titrator MPT-2, Malvern, Velika Britanija
- ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija
- Zetasizer Nano ZS, Malvern, Velika Britanija

3.3 Postopki in metode

3.3.1 Izdelava nanodelcev iz hitosana in heparina

Priprava raztopin hitosana

Pripravili smo raztopine treh različnih hitosanov (hitosanijev klorid Protasan, hitosanijev hidroklorid in nizkomolekularni hitosan) z osnovno koncentracijo 0,6 mg/ml. Zatehtali smo 60 mg posameznega hitosana in ga kvantitativno prenesli v 100 ml bučko ter jo do oznake dopolnili s prečiščeno vodo. Izjema je nizkomolekularni hitosan, pri katerem smo 100 ml bučko dopolnili z 0,25% očetno kislino in ga tako raztopili. Bučke smo dali v ultrazvočno kadičko in počakali, da se je ves hitosan raztopil. Raztopine hitosana smo nato prelili v 50 ml centrifugirke in jih centrifugirali 20 min pri 3500 obr/min. Sledilo je še filtriranje raztopin skozi filter z velikostjo por 1,20 µm. Na ta način smo odstranili morebitne prisotne nečistote. Tako pripravljenim raztopinam hitosana smo s polielektrolitno titracijo določili gostoto naboja in pH vrednost.

Priprava raztopine heparina

Pripravili smo raztopino heparina s koncentracijo 1 mg/ml. Izhajali smo iz osnovne raztopine heparina 5000 i.e./ml, kar ustreza koncentraciji 50 mg/ml. V 50 ml bučko smo odpipetirali 1 ml osnovne raztopine heparina, dopolnili do oznake s prečiščeno vodo in dobro premešali. Osnovni raztopini smo določili gostoto naboja in pH vrednost.

Izdelava nanodelcev

Nanodelce iz vseh treh vrst hitosanov in heparina smo pripravili z metodo polielektrolitnega kompleksiranja nasprotno nabitih polimerov. Uporabili smo različna masna razmerja heparin/hitosan 1:0,5; 1:0,75; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 in 1:5. V čaše smo odmerili ustrezen volumen raztopine hitosana s koncentracijo 0,6 mg/ml in med mešanjem na magnetnem mešalu (900 vrtljajev/min) počasi z avtomatsko pipeto dodajali ustrezen volumen raztopine heparina koncentracije 1 mg/ml. Odmerjeni volumni raztopin obeh polimerov so podani v tabeli 1. Čaše smo prekrili s parafilmom in tako preprečili izhlapevanje topila. Vzorce smo na magnetnem mešalu mešali eno uro.

Tabela 1: Volumni raztopin hitosana in heparina pri različnih masnih razmerjih.

Masno razmerje heparin/hitosan	Volumen raztopine hitosana (0,6 mg/ml) (ml)	Volumen raztopine heparina (1 mg/ml) (ml)
1:0,5	6,667	8,000
1:0,75	6,667	5,333
1:1	6,667	4,000
1:2	6,667	2,000
1:3	10,000	2,000
1:4	13,333	2,000
1:5	16,667	2,000

3.3.2 Vpliv masnega razmerja heparin/hitosan na fizikalne lastnosti nanodelcev

Vsem vzorcem nanodelcev z različnim masnim razmerjem heparin/hitosan, pripravljenih po postopku opisanem v točki 3.1.1, smo izmerili pH, povprečno velikost delcev, polidisperzni indeks (PDI), zeta potencial (ZP) in gostoto naboja. S pH titracijo smo ugotavljali vpliv spremembe pH na stabilnost disperzij nanodelcev.

3.3.3 Spremljanje fizikalne stabilnosti disperzij nanodelcev

Iz vseh treh hitosanov in heparina smo izdelali nanodelce z masnim razmerjem 1:1. Tako smo dobili tri različne vrste PEK. Disperzijam nanodelcev smo izmerili pH, povprečno velikost delcev, PDI in ZP, in sicer 1., 2., 3., 7. in 14. dan po pripravi.

3.3.4 Vpliv koncentracije polimerov v disperziji na fizikalne lastnosti nanodelcev

Priprava raztopin hitosana

Pri tem poskusu smo uporabili hitosanijev hidroklorid in nizkomolekularni hitosan. Pripravili smo raztopine obeh hitosanov različnih koncentracij (0,6; 0,8; 1,0 in 1,2 mg/ml) tako, da smo zatehtali ustrezne količine hitosana (60 mg, 80 mg, 100 mg in 120 mg) in jih kvantitativno prenesli v 100 ml bučke. Pri uporabi hitosanijevega hidroklorida smo bučke dopolnili do oznake s prečiščeno vodo, pri nizkomolekularnem hitosanu pa z 0,25 % očetno kislino. Postopek priprave raztopin hitosana smo nadaljevali po postopku opisanem v točki 3.3.1.

Izdelava nanodelcev

Disperzije nanodelcev smo izdelali iz heparina in hitosanijevega hidroklorida oziroma nizkomolekularnega hitosana z masnim razmerjem heparin/hitosan 1:1 po postopku opisanem v točki 3.3.1, le da smo pri tem uporabili raztopine hitosana različnih koncentracij (0,6; 0,8; 1,0 in 1,2 mg/ml). Raztopina heparina je imela vedno enako koncentracijo in sicer 1 mg/ml. Odmerjeni volumni raztopin obeh polimerov in koncentracije polimerov v končnih disperzijah so podane v tabeli 2. Pripravljenim disperzijam smo nato izmerili pH, povprečno velikost delcev, PDI in ZP takoj po pripravi in nato še drugi dan.

Tabela 2: Volumni raztopin polimerov ter koncentracije polimerov v disperziji ND pri masnem razmerju heparin/hitosan 1:1 v odvisnosti od začetne koncentracije razt. hitosana.

Koncentracija razt. hitosana (mg/ml)	Volumen raztopine hitosana (ml)	Volumen raztopine heparina (1 mg/ml) (ml)	Konc. polimerov v disperziji ND (mg/ml)
0,6	6,667	4,000	0,750
0,8	5,000	4,000	0,889
1,0	4,000	4,000	1,000
1,2	4,167	5,000	1,091

3.3.5 Vpliv postopka priprave raztopine hitosana na fizikalne lastnosti nanodelcev

Priprava raztopine hitosanijevega hidroklorida

Poskus smo izvedli le s hitosanijevim hidrokloridom, ker je le-ta v primerjavi z ostalima dvema hitosanoma dobro topen v prečiščeni vodi. Hitosanijev klorid Protasan in nizkomolekularni hitosan sta v vodi slabše topna, zato je predpriprava raztopine hitosana nujno potrebna. Zanimalo nas je, ali postopek priprave raztopine hitosanijevega hidroklorida vpliva na fizikalne lastnosti nastalih nanodelcev. Zato smo primerjali ND, pri katerih smo za izdelavo uporabili raztopino hitosanijevega hidroklorida brez posebne predpriprave s tistimi, kjer smo uporabili raztopino hitosanijevega hidroklorida predhodno izpostavljeno ultrazvoku, centrifugirano in filtrirano. V ta namen smo pripravili raztopino hitosanijevega hidroklorida s koncentracijo 0,6 mg/ml, tako da smo zatehtali 60 mg hitosanijevega hidroklorida, ga kvantitativno prenesli v 100 ml bučko in jo dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

Izdelava nanodelcev

Disperzije nanodelcev smo izdelali iz raztopine hitosanijevega hidroklorida pripravljene po zgoraj opisanem postopku in iz raztopine heparina koncentracije 1 mg/ml v masnih razmerjih podanih v tabeli 3 po standardnem postopku opisanem v točki 3.3.1. Končnim disperzijam smo izmerili pH, povprečno velikost delcev, PDI in ZP.

Tabela 3: Volumni raztopin polimerov pri pripravi nanodelcev v odvisnosti od masnega razmerja heparin/hitosanijev hidroklorid.

Masno razmerje heparin/hitosanijev hidroklorid	Volumen razt. hitosanijevega hidroklorida (0,6 mg/ml) (ml)	Volumen raztopine heparina (1 mg/ml) (ml)
1:0,5	6,667	8,000
1:0,75	6,667	5,333
1:1	6,667	4,000
1:2	6,667	2,000
1:3	10,000	2,000
1:4	13,333	2,000
1:5	16,667	2,000

3.3.6 Izdelava nanodelcev iz hitosana, heparina in TPP

Priprava raztopine TPP

Pripravili smo raztopino TPP (pentanatrijev tripolifosfat) s koncentracijo 1 mg/ml. Zatehtali smo 100 mg TPP, ga kvantitativno prenesli v 100 ml bučko, jo dopolnili do oznake s prečiščeno vodo ter dobro premešali.

3.3.6.1 Iskanje optimalnega masnega razmerja nizkomolekularni hitosan/TPP

Raztopini heparina s koncentracijo 1 mg/ml smo dodali ustrezen volumen raztopine TPP s koncentracijo 1 mg/ml. Tako pripravljeno raztopino smo počasi dodajali v raztopino nizkomolekularnega hitosana koncentracije 0,6 mg/ml. Masno razmerje med heparinom in nizkomolekularnim hitosanom je bilo 1:0,75. Spreminjali smo le masno razmerje med hitosanom in TPP. Odmerjeni volumni posameznih komponent so prikazani v tabeli 4. Na koncu smo pripravljene disperzije nanodelcev še fizikalno ovrednotili z določitvijo pH, povprečne velikosti delcev, PDI in zeta potenciala.

Tabela 4: Volumni raztopin polielektrolitov pri izdelavi ND v odvisnosti od masnega razmerja nizkomolekularni hitosan/TPP (heparin/nizkomolekularni hitosan 1:0,75).

Masno razmerje hitosan/TPP	Volumen raztopine hitosana (0,6 mg/ml) (ml)	Volumen raztopine heparina (1 mg/ml) (ml)	Volumen raztopine TPP (1 mg/ml) (ml)
1:1	6,667	5,333	4,000
2:1	6,667	5,333	2,000
3:1	6,667	5,333	1,333
4:1	6,667	5,333	1,000
5:1	6,667	5,333	0,800

3.3.6.2 Iskanje optimalnega masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan

V tem primeru smo ohranjali najbolj ugodno masno razmerje med hitosanom in TPP (5:1), spreminjali pa smo masno razmerje med heparinom in nizkomolekularnim hitosanom. Primerjali smo fizikalne lastnosti nanodelcev (velikost delcev, zeta potencial, gostota naboja) ter fizikalno stabilnost disperzij ND z in brez dodanega TPP. Odmerjeni volumni posameznih polielektrolitov so prikazani v tabeli 5.

Tabela 5: Volumni raztopin polielektrolitov pri izdelavi ND v odvisnosti od masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan (hitosan/TPP 5:1).

Masno razmerje heparin/nizkomolekularni hitosan	Volumen razt. hitosana (0,6 mg/ml) (ml)	Volumen razt. heparina (1 mg/ml) (ml)	Volumen razt. TPP (1 mg/ml) (ml)
1:0,5	6,667	8,000	0,800
1:0,75	6,667	5,333	0,800
1:1	6,667	4,000	0,800
1:2	6,667	2,000	0,800
1:3	10,000	2,000	1,200
1:4	13,333	2,000	1,600
1:5	16,667	2,000	2,000

3.3.7 Preverjanje citotoksičnosti nanodelcev

Gojenje in presajanje celic

Pri delu s celicami moramo zagotoviti aseptične pogoje, zato je delo potekalo v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF). Pred začetkom dela smo notranje površine komore in ves potreben material za delo prebrsali s 70% raztopino etanola.

Kot modelne celice smo uporabili keratinocite. Inkubirali smo jih v mediju za gojenje keratinocitov na polistirenski plošči s površino 75 cm^2 pri 37°C in 5% CO_2 . Ko so celice zasedle približno 80-90% razpoložljivega prostora na plošči, smo jih presadili (dvakrat tedensko). S celične kulture keratinocitov smo odlili medij ter površino plošče dvakrat sprali z 2 ml PBS. Nato smo dodali 1 ml tripsina, ki je odlepil celice od podlage. Počakali smo 1 minuto in nato preverili pod mikroskopom, ali so se celice res odlepile (vidni krogci). Dodali smo 4 ml svežega medija z dodanim fetalnim govejim serumom, ki inaktivira tripsin. S pomočjo hemocitomera smo pod invertnim mikroskopom prešteli celice in izračunali njihovo koncentracijo (število celic/ml). Celice smo kvantitativno prenesli v 15 ml centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 1300 obr/min. Po končanem centrifugiranju smo supernatant nad celicami odlili, dodali 1 ml svežega medija in celice dobro premešali. Tako pripravljene celice smo nasadili ali v novo ploščo za gojenje celic ali pa v vdolbinice plošče za poskuse. Na koncu smo pod mikroskopom preverili, ali je število celic glede na predhodno izračunano koncentracijo celic ustrezno.

Priprava disperzij nanodelcev za poskuse na celicah

Za poskuse na celicah smo pripravili dve disperziji nanodelcev po standardnem postopku opisanem v točki 3.3.1. Uporabili smo disperzijo heparin/nizkomolekularni hitosan 1:0,75 in heparin/hitosanijev hidroklorid 1:1.

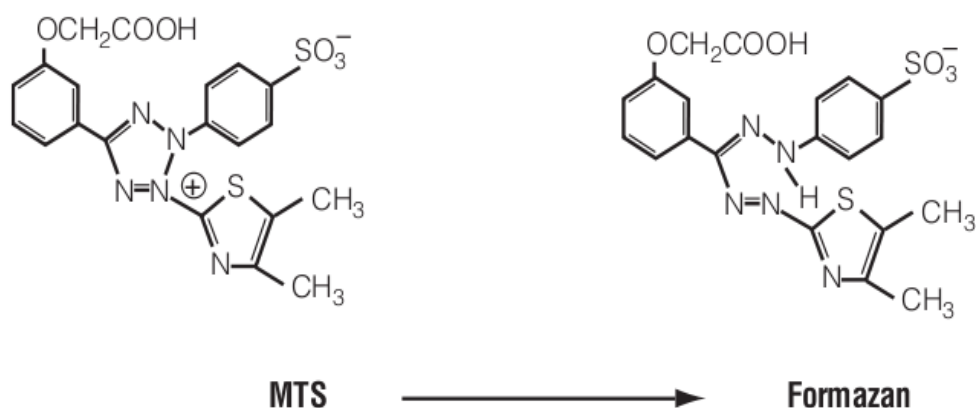
3.3.7.1 Vpliv celičnega medija na lastnosti disperzij nanodelcev

Pred določanjem citotoksičnosti nanodelcev smo preverili, ali celični medij vpliva na fizikalne lastnosti ND v disperziji. V čašo smo odmerili ustrezne volumne celičnega medija in nato dodali ustrezen volumen pripravljenih disperzij nanodelcev. Vzorce smo pripravili v različnih volumskih razmerjih in sicer disperzija nanodelcev/celični medij 1:1, 1:5, 1:10 in 1:20. Vzorce smo spremljali vizualno ter jim pomerili velikost in zeta potencial.

Ugotavljanje proliferacije celic s testom aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze

S testom mitohondrijske dehidrogenaze smo proučevali proliferacijo keratinocitov po 4-urni oziroma 24-urni izpostavitvi nanodelcem.

MTS test temelji na kolorimetričnemu določanju števila živih celic pri študijah citotoksičnosti in proliferacije. Žive celice reducirajo MTS reagent, ki je kemijsko 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol, v obarvan formazan. Pretvorbo omogočata NADPH ali NADH, ki ju tvorijo dehidrogenazni encimi v metabolno aktivnih celicah. Izmerjena absorbanca je tako premosorazmerna številu živih celic v kulturi (27).



Slika 5 : Kemijski formuli MTS reagenta in formazana, ki nastane po pretvorbi.

3.3.7.2 Ugotavljanje citotoksičnosti disperzij nanodelcev

V mikrotitrsko ploščo s 96-imi vdolbinicami smo v treh vrstah nasadili 4 vdolbinice z $0,5 \times 10^4$ celicami v 50 μl medija, v naslednje štiri vdolbinice smo dodali samo 50 μl medija. Celotno ploščo smo inkubirali 24 h pri 37°C in 5% CO₂, da so se celice pritrdile na podlago. Nato smo v vdolbinice prvih dveh vrst dodali ustrezno količino predhodno pripravljenih disperzij ND, in sicer v prvo vrsto disperzije ND z nizkomolekularnim hitosanom, v drugo pa ND s hitosanijevim hidrokloridom (prve 4 vdolbinice za določitev absorbance celic po dodatku vzorca, naslednje 4 za določitev absorbance medija po dodatku vzorca). V tretjo vrsto smo dodal le medij in sicer enak volumen, kot je bil volumen dodanih nanodelcev (prve 4 vdolbinice za določitev absorbance kontrolnih celic, naslednje 4 za določitev absorbance medija). Za ugotavljanje citotoksičnosti smo izvedli tri eksperimente.

Eksperiment 1

V epico smo odmerili 500 μl celičnega medija in dodali 100 μl pripravljene disperzije nanodelcev tako, da je bilo volumsko razmerje med medijem in disperzijo ND 5:1. Nato smo odmerili 50 μl tako pripravljene disperzije ND in jo dodali v vdolbinice na mikrotitrski plošči s 96-imi vdolbinicami, v katerih je že bilo 50 μl celičnega medija z ali brez celic. Pri tem poskusu je bil faktor redčenja 12. Po eni uri od dodatka disperzije nanodelcev smo v vsako vdolbinico dodali 10 μl MTS reagenta in nato čez tri ure z mikrotitrskim čitalcem izmerili absorbance pri valovni dolžini 490 nm.

Eksperiment 2

V tem primeru disperzije nanodelcev predhodno nismo redčili. K 50 μl medija s celicami ali brez smo v posamezne vdolbinice dodali 10 μl pripravljene disperzije nanodelcev. Tako je bilo njuno volumsko razmerje 5:1. V tem primeru je bil faktor redčenja 6. Po eni uri od dodatka disperzije ND smo dodali 6 μl MTS reagenta in nato čez tri ure izmerili absorbance.

Eksperiment 3

Eksperiment je bil enak eksperimentu 2 s to razliko, da smo MTS reagent dodali po 21-ih urah in nato čez tri ure pomerili absorbanco. S tem eksperimentom smo želeli ugotoviti, ali je kakšna razlika v citotoksičnosti nanodelcev po 24-urni izpostavitvi keratinocitom.

Rezultate celične viabilnosti (preživelosti) smo podali relativno glede na kontrolo tj. celice, ki jih nismo izpostavili testiranim sistemom (Enačba 1).

Preživelost celic smo izračunali po enačbi:

$$\text{Celična viabilnost (preživelost)} = (A_S - A_{S0}) / (A_C - A_{C0}) \quad \text{Enačba 1}$$

A_S absorbanca celic po dodatku vzorca

A_{S0} absorbanca medija po dodatku vzorca

A_C absorbanca kontrolnih celic

A_{C0} absorbanca medija

3.3.8 Vrednotenje nanodelcev - metode

Disperzije nanodelcev smo ovrednotili z merjenjem pH vrednosti, povprečne velikosti delcev, polidisperznega indeksa, zeta potenciala in gostote naboja. S pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS smo izmerili povprečno velikost delcev, PDI in ZP. Raztopinam polimerov kot tudi nekaterim disperzijam nanodelcev smo z napravo PCD določili gostoto ionskega naboja. Pri določenih masnih razmerjih heparin/hitosan smo izvedli tudi pH titracijo. Pred vsako meritvijo smo vzorce vizualno pregledali, če so v njih prisotni vidni delci ali če je prišlo do obarjanja.

Merjenje velikosti delcev in polidisperznega indeksa

Velikost delcev smo določali z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (Zetasizer Nano ZS). Povprečni premer je merilo za povprečno velikost nanodelcev, polidisperzni indeks pa za širino porazdelitve velikosti nanodelcev. PDI lahko zavzame vrednosti od 0 do 1. Vrednost 0 pomeni, da so delci enakih velikosti (monodisperzni sistem), 1 pa zelo nehomogeno porazdelitev velikosti delcev. V primeru spremljanja fizikalne stabilnosti disperzij ND smo vzorce med posameznimi meritvami shranjevali v hladilniku.

Pogoji merjenja

- temperatura: 25 °C
- viskoznost disperznega medija (voda): $\eta = 0,8872$ mPas
- lomni količnik disperznega medija (voda): $RI = 1,330$
- valovna dolžina laserske svetlobe (He-Ne laser): $\lambda = 633$ nm
- kot merjenja: 173°
- kiveta: DTS0012

Merjenje zeta potenciala

Zeta potencial smo določili z metodo laserske Dopplerjeve elektroforeze (Zetasizer Nano ZS).

Pogoji merjenja

- temperatura: 25 °C
- viskoznost disperznega medija (voda): $\eta = 0,8872$ mPas
- lomni količnik disperznega medija (voda): $RI = 1,330$
- dielektrična konstanta disperznega medija (voda): $\epsilon = 78,5$
- model: Smoluchowski
- kapilarna celica: DTS1060C

Avtotitracija (pH titracija)

Avtotitracijo disperzij ND smo izvajali s pomočjo večnamenskega titratorja MPT-2, kateri je preko kapilarne celice povezan z napravo Zetasizer Nano ZS. Titrator je sestavljen iz predela, kjer so titranti, in predela, kjer je vzorec, ki ga želimo titrirati. V epruveto smo odmerili 10 ml pripravljene disperzije nanodelcev, dodali magnet in epruveto vpeli v titrator. V predel, ki je namenjen titrantom, smo vpeli dve epruveti z 0,1 M in 0,01 M NaOH. Titrator je postopoma dodajal majhne volumne raztopin NaOH, dokler ni dosegel želene pH vrednosti, ki jo je izmeril s pH elektrodo. Po vsakem dodatku titranta je Zetasizer Nano ZS izmeril zeta potencial in intenziteto sipane svetlobe. S pH titracijo smo dobili podatek, kako sprememba pH vpliva na ZP oziroma na fizikalno stabilnost disperzije nanodelcev.

Pogoji merjenja

- začetna pH vrednost: pH disperzije nanodelcev
- končna pH vrednost: 10
- temperatura: 23 °C
- število titracijskih točk: 14 oziroma 15

Merjenje gostote naboja

Postopek kvantitativne določitve gostote ionskega naboja (kationskega ali anionskega) polimerov temelji na t.i. polielektrolitni titraciji. Vzorec, ki mu želimo določiti gostoto naboja, titriramo z nasprotno nabitim polielektrolitom do ekvivalentne točke titracije, ko potencial doseže vrednost 0 mV. Kot titracijska polielektrolita se uporabljata 0,001 M standardna raztopina PES-Na (anionski polielektrolit) in 0,001 M standardna raztopina Poly-DADMAC-a (kationski polielektrolit).

Aparatura za določanje gostote naboja PCD (particle charge detector) je sestavljena iz detektorja PCD-03 in titratorja PCD-T3, ki omogoča avtomatsko vodenje titracij. Ključni del detektorja je teflonska merilna celica z batom in elektrodi. Rezultat meritve je poraba titracijske raztopine in izračunana gostota naboja (28).

Priprava vzorca

Vzorec, ki mu želimo določiti gostoto naboja, najprej ustrezno razredčimo. Razredčitev vseh osnovnih raztopin polimerov (heparin, hitosan, TPP) je bila enaka, 1 g/100 ml. Na analitski tehtnici smo zatehtali 1 g raztopine polimera na štiri mesta natančno, jo kvantitativno prenesli v 100 ml merilno bučko, dodali 50 ml destilirane vode, dobro premešali in dopolnili bučko z destilirano vodo do oznake.

Disperzije nanodelcev smo razredčili tako, da smo 5 ml disperzije odmerili v 100 ml bučko in jo dopolnili z destilirano vodo do oznake ter dobro premešali.

Postopek določitve gostote naboja

S polnilno pipeto smo odmerili 10 ml razredčenega vzorca v merilno celico, vanjo vstavili bat in zunanost merilne celice osušili z mehkim papirjem. Merilno celico z batom smo previdno vstavili na predvideno mesto detektorja ter vklopili stikalo za motor, ki povzroči osciliranje bata. Na zaslonu se je pojavila vrednost začetnega potenciala v mV z ustreznim predznakom (+ pomeni vzorec s kationskim nabojem, - pomeni vzorec z anionskim

nabojem). Na nastavek titratorja smo namestili bireto s standardno raztopino polielektrolita, s katero smo titriral. Ko je bil dosežen potencial 0 mV, se je na zaslonu izpisal rezultat, in sicer poraba titracijske raztopine v ml in gostota naboja v mmol/g. Naredili smo 3-5 paralelk (28).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Gostota naboja raztopin polimerov

Tabela 6: Gostota naboja osnovnih raztopin polimerov.

Polimer	Začetni potencial (mV)	$\bar{V}^*$ titracijske razt. (ml)	Gostota naboja (mmol/g)
Heparin	- 760	0,35	- 3,5
Hitosanijev klorid Protasan	+ 230	0,10	+ 1,7
Hitosanijev hidroklorid	+ 340	0,32	+ 5,3
Nizkomolekularni hitosan	+ 450	0,45	+ 7,5

$\bar{V}^*$ je povprečna vrednost 3 paralelnih določitev.

S polielektrolitno titracijo z nasprotno nabitim polielektrolitom lahko opredelimo ionski karakter polimera in mu kvantitativno določimo gostoto naboja. Heparin ima anionski karakter, vsi trije vzorci hitosana pa kationski karakter (tabela 6).

Uporabljeni hitosani imajo različne fizikalno-kemijske lastnosti (molekulska masa, stopnja deacetilacije, viskoznost, topnost). Posamezen hitosan ima definirano stopnjo deacetilacije, kar pomeni, koliko acetilnih skupin hitosana se je hidroliziralo in posledično, koliko protoniranih amino skupin je nastalo. Hitosanijev klorid Protasan ima stopnjo deacetilacije 87% (29), hitosanijev hidroklorid pa 88,8% (30). Za nizkomolekularni hitosan proizvajalec teh podatkov ne navaja. Le-ta je v primerjavi z drugima dvema oblikama hitosanov najmanj kemijsko čist in komercialno najbolj dostopen zaradi nizke cene v primerjavi s ceno ostalih dveh. Ugotovili smo, da se stopnja deacetilacije posameznega hitosana ujema z našimi meritvami gostote kationskega naboja. Večja kot je stopnja deacetilacije, večja bo gostota naboja. Rezultati so pokazali, da ima najvišjo gostoto naboja nizkomolekularni hitosan, sledi hitosanijev hidroklorid (stopnja deacetilacije 88,8%), najmanjšo gostoto naboja in s tem tudi stopnjo deacetilacije pa ima hitosanijev klorid Protasan (87%). Iz izmerjenih gostot naboja lahko sklepamo, da je stopnja deacetilacije nizkomolekularnega hitosana največja, saj ima največjo gostoto naboja.

4.2 Vpliv masnega razmerja heparin/hitosan na fizikalne lastnosti nanodelcev

Disperzije nanodelcev iz heparina in treh različnih vrst hitosanov, pripravljene z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosan, smo fizikalno ovrednotili z določitvijo pH vrednosti, povprečne velikosti delcev, zeta potenciala, polidisperznega indeksa in gostote naboja. Na osnovi dobljenih rezultatov smo za posamezno vrsto hitosana izbrali optimalno masno razmerje.

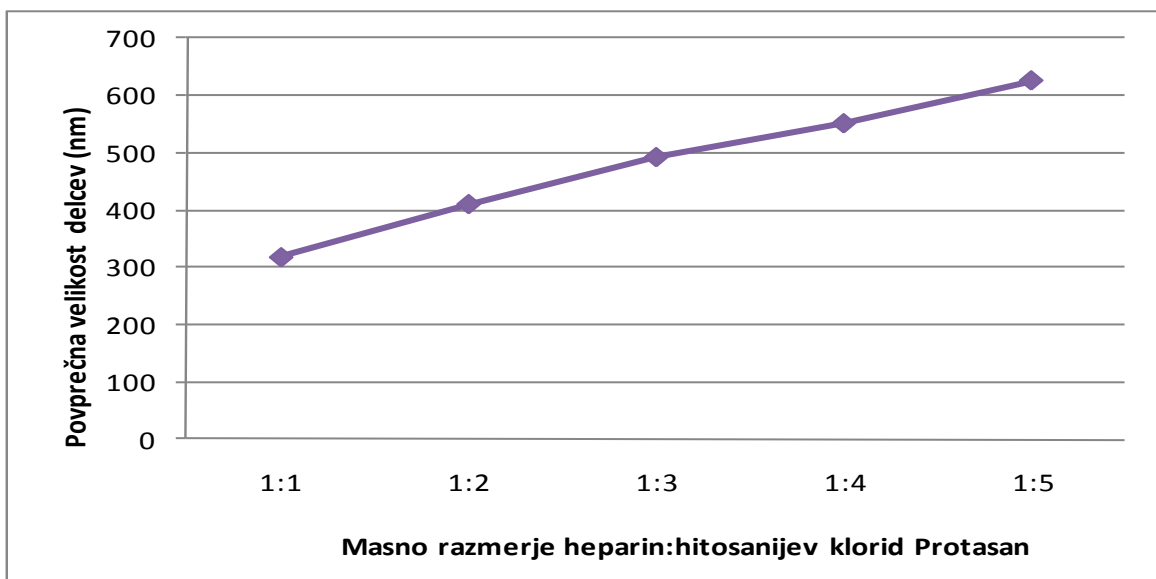
4.2.1 Nanodelci iz heparina in hitosanijevega klorida Protasan

Tabela 7: pH, povprečna velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial v odvisnosti od masnega razmerja heparin/hitosanijev klorid Protasan.

Masno razmerje heparin/hitosanijev klorid Protasan	pH vrednost	Povprečna velikost delcev (nm)	Polidisperzni indeks	Zeta potencial (mV)
1:0,5	7,15	2641	0,47	- 45,1
1:0,75	7,02	vidni delci	0,18	- 37,9
1:1	5,65	317,0	0,47	45,9
1:2	4,96	409,9	0,53	62,3
1:3	4,60	492,1	0,50	64,7
1:4	4,36	551,2	0,62	66,8
1:5	3,92	626,2	0,60	71,2

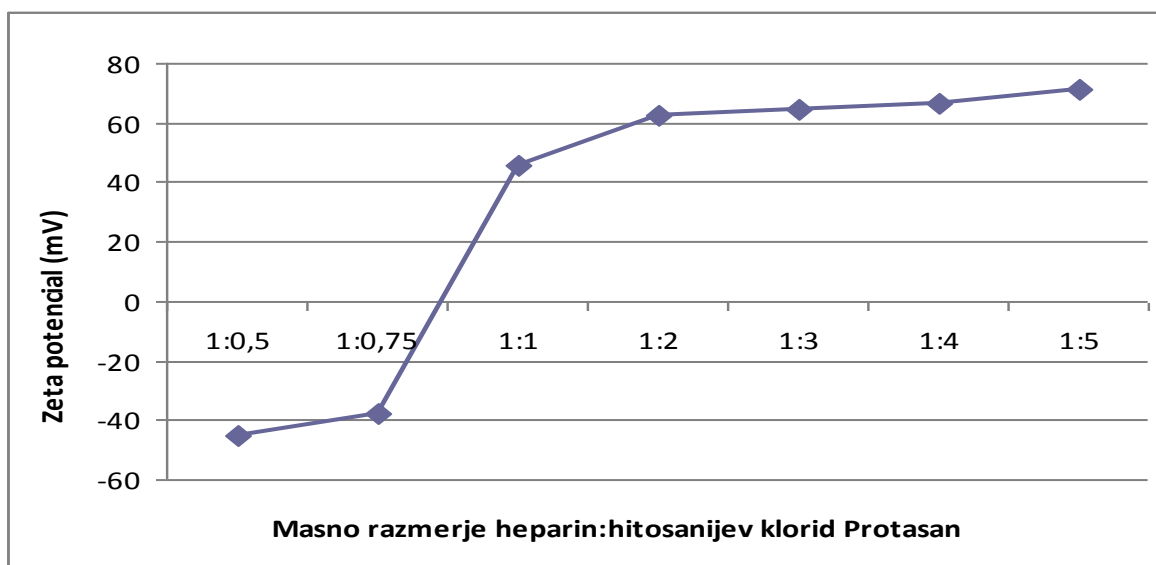
Z naraščajočim deležem hitosana v masnem razmerju heparin/hitosanijev klorid Protasan je pH pripravljenih disperzij nanodelcev padal, in sicer od 7,15 pri masnem razmerju heparin/hitosanijev klorid Protasan 1:0,5 pa vse do 3,92 pri masnem razmerju 1:5 (tabela 7). Tako velik razpon pH vrednosti pripravljenih disperzij je posledica različnih volumnov raztopine hitosana, ki ima v primerjavi z osnovno raztopino heparina nižjo pH vrednost. Osnovna raztopina heparina je imela pH približno 7,5, osnovna raztopina hitosanijevega klorida Protasan pa približno 4.

Polidisperzni indeks je merilo za porazdelitev velikosti delcev v vzorcu. Zaželeno je, da so vrednosti PDI manjše od 0,3, kar pomeni, da so delci podobne velikosti, oziroma da je vzorec homogen. V našem primeru so bile vrednosti PDI med 0,47 in 0,62, kar kaže na heterogenost disperzij (tabela 7). Pri masnem razmerju 1:0,75 smo dobili najnižji PDI, vendar so v tem primeru nastali delci mikrometrskih velikosti.



Slika 6: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od masnega razmerja heparin/hitosanijev klorid Protasan.

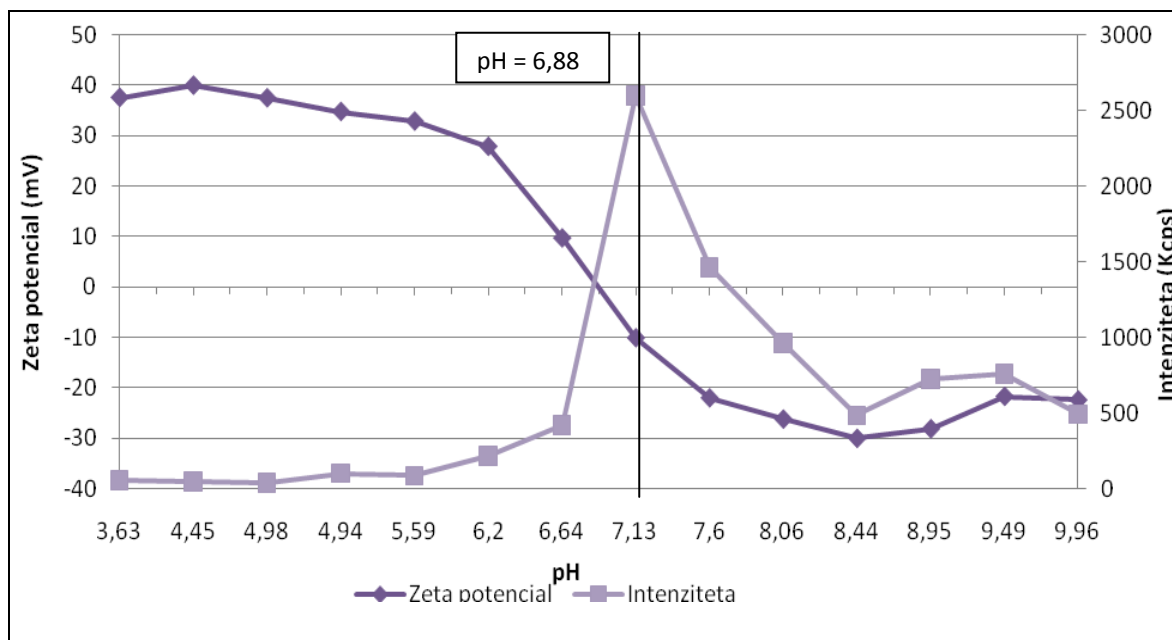
Slika 6 prikazuje povprečno velikost delcev v odvisnosti od masnega razmerja heparin/hitosanijev klorid Protasan. Pri masnem razmerju 1:0,5 in 1:0,75 so nastali delci mikrometrskih velikosti. Teh podatkov zaradi boljšega pregleda nismo vključili v sliko 6. Pri ostalih masnih razmerjih so nastali delci nanometrskih velikosti. Njihove povprečne velikosti so bile od 320 nm pri masnem razmerju 1:1, pa vse do 620 nm pri masnem razmerju 1:5. S slike 6 je razvidno, da z naraščanjem hitosana v masnem razmerju heparin/hitosan nastajajo večji delci. Molekule heparina se obdajo z večjim številom molekul hitosana in posledično nastanejo večji delci (22).



Slika 7: Zeta potencial delcev v odvisnosti od masnega razmerja heparin/hitosanijev klorid Protasan.

Slika 7 prikazuje odvisnost ZP od masnega razmerja heparin/hitosanijev klorid Protasan. Razvidno je, da pozitiven zeta potencial narašča z naraščanjem hitosana v masnem razmerju heparin/hitosan. Najvišji ZP imajo ND z masnim razmerjem 1:5, in sicer 71 mV. Pri visoki vrednosti ZP se delci zaradi velikega kationskega naboja na površini med seboj odbijajo, kar omogoči večjo fizikalno stabilnost disperzije nanodelcev. Nanodelci z masnim razmerjem heparin/hitosanijev klorid Protasan 1:0,5 in 1:0,75 imajo negativen ZP. V disperziji so prisotne proste anionske skupine heparina zaradi primanjkljaja pozitivnih amino skupin hitosana. Manj je hitosana v masnem razmerju heparin/hitosan, več je prostih anionskih skupin heparina, višja je absolutna vrednost negativnega ZP.

Vsi PEK iz heparina in hitosanijevega klorida Protasan imajo izmerjene vrednosti zeta potenciala večje od 30 mV oz. manjše od -30 mV, kar kaže na njihovo dobro fizikalno stabilnost.



Slika 8: Zeta potencial delcev in intenziteta sipane svetlobe v odvisnosti od pH pri masnem razmerju heparin/hitosanijev klorid Protasan 1:2.

S pomočjo avtotitracije smo dobili odvisnost zeta potenciala in intenzitete sipane svetlobe od pH vrednosti disperzije ND (slika 8). S pH titracijo smo želeli ugotoviti, kako sprememba pH vpliva na fizikalno stabilnost PEK. V ta namen smo pripravljeno disperzijo nanodelcev z masnim razmerjem heparin/hitosanijev klorid Protasan 1:2 in pH vrednostjo 3,6 titrirali z 0,1 oziroma 0,01 M NaOH. Spremljali smo zeta potencial in intenziteto sipane svetlobe.

Disperzija ND je imela začetni ZP okoli 40 mV. Z naraščanjem pH sistema se je pozitivni zeta potencial PEK zmanjševal, saj se je zmanjševal pozitivni naboj hitosana. Izoelektrično točko (ZP = 0 mV) smo dosegli pri pH 6,88, kar je v bližini pKa samega hitosana (pKa = 6,5). Tu je sistem najmanj fizikalno stabilen, topnost hitosana se zmanjša in le-ta se obori. PEK razpade, zaradi prostih anionskih skupin heparina preide ZP v negativno območje in se z nadaljnjim dodajanjem raztopine NaOH zniža do vrednosti ca. -30 mV.

Če pogledamo intenziteto sipane svetlobe, se ta do približno pH 6 ni skoraj nič spremenila, kar kaže na to, da so delci do te pH vrednosti približno konstantne velikosti in se z njimi v smislu fizikalne stabilnosti nič ne dogaja. Tudi ZP je do pH 6 nad 30 mV, kar kaže na fizikalno stabilnost sistema. Ko se pH sistema začne približevati izoelektrični točki, začne intenziteta sipane svetlobe naraščati. Ker se začne zmanjševati elektrostatski odboj med nanodelci, delci agregirajo, večji delci pa sipajo več svetlobe. Z nadaljnjim povečevanjem pH sledi padec intenzitete, ki je posledica sedimentacije nastalih agregatov. Njihov nastanek in posledično sedimentacijo smo v epruveti opazili tudi vizualno po končani titraciji.

Zaključimo lahko, da je uporabljena disperzija nanodelcev stabilna samo v kislem (do pH 6, ZP > 30 mV) (22, 23).

Tabela 8: Gostota naboja disperzij nanodelcev z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosanijev klorid Protasan.

Masno razmerje heparin/hitosanijev klorid Protasan	Začetni potencial (mV)	$\bar{V}^*$ titracijske razt. (ml)	Gostota naboja (mmol/l)
1:5	+ 400	0,75	+1,50
1:4	+ 367	0,61	+1,22
1:3	+ 350	0,59	+1,18
1:2	+ 246	0,42	+0,84
1:1	+ 160	0,22	+0,44
1:0,75	- 50	0,05	-0,10
1:0,50	- 620	0,30	- 0,61

$\bar{V}^*$ je povprečna vrednost 3 paralelnih določitev.

Disperzijam ND z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosanijev klorid Protasan smo določili tudi gostoto naboja (tabela 8). Pozitiven začetni potencial PEK pomeni, da so v disperziji prisotne funkcionalne skupine s kationskim nabojem (disperzije z masnim razmerjem heparin/hitosanijev klorid Protasan od 1:5 do 1:1), negativen začetni potencial

pa pomeni prisotnost funkcionalnih skupin z anionskim nabojem (disperzije z masnim razmerjem heparin/hitosanijev klorid Protasan 1:0,75 in 1:0,5). Višja je absolutna vrednost začetnega potenciala, višja je gostota naboja.

Največjo gostoto kationskega naboja ima disperzija nanodelcev pri masnem razmerju heparin/hitosanijev klorid Protasan 1:5, saj je v tem primeru prebitek kationskega hitosana največji. Z nižanjem deleža hitosana v razmerju heparin/hitosanijev klorid Protasan gostota kationskega naboja disperzij pada vse do masnega razmerja 1:1, ker se delež kationskega hitosana v disperziji zmanjšuje.

Pri masnem razmerju heparin/hitosanijev klorid Protasan 1:0,75 in 1:0,5 prevladujejo v disperziji delci z anionskim nabojem in sicer, nižji je delež kationskega hitosana, večja je gostota anionskega naboja. Pri obeh razmerjih je kationskih amino skupin premalo, da bi prišlo do elektrostatske interakcije z vsemi anionskimi skupinami heparina. Tako v disperziji ostajajo proste anionske skupine heparina.

Dobljeni podatki o gostoti naboja disperzij potrjujejo izmerjene vrednosti ZP. Z zniževanjem hitosana v masnem razmerju heparin/hitosanijev klorid Protasan je padal pozitiven zeta potencial in pri masnem razmerju 1:0,75 in 1:0,5 prešel v negativno območje enako kot gostota naboja.

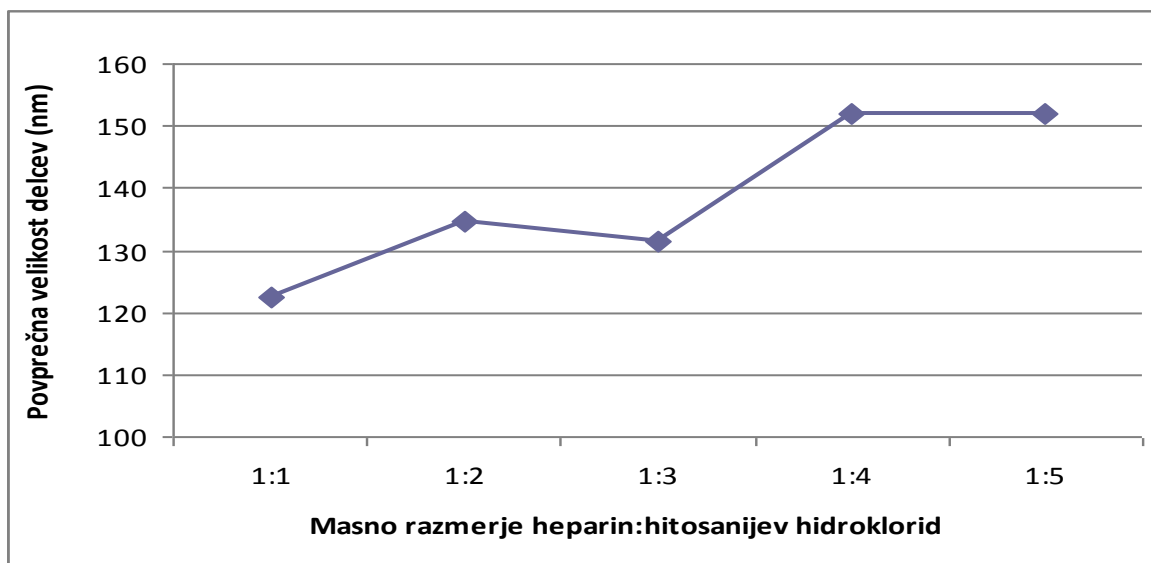
Na osnovi izmerjenih vrednosti velikosti delcev, ZP in gostote naboja smo ugotovili, da je za nastanek ND iz heparina in hitosanijevega klorida Protasan najbolj optimalno masno razmerje obeh polimerov 1:1. Pri tem masnem razmerju smo dobili najmanjšo povprečno velikost delcev (320 nm) in zeta potencial nad 30 mV (45,9 mV), kar pomeni, da je nastala disperzija fizikalno stabilna in sistem ne teži k agregaciji. Na osnovi pozitivnega površinskega naboja delcev disperzije predvidevamo, da je prišlo do elektrostatske interakcije vseh anionskih skupin heparina z nasprotno nabitimi amino skupinami hitosana. Cilj poskusov je bil, da definiramo masno razmerje obeh polimerov, pri čemer heparin v največji meri elektrostatsko interagira s hitosanom in ga tako v disperziji ostane čim manj prostega. Po drugi strani pa želimo, da je prebitek hitosana čim manjši, ker so delci v tem primeru manjši, pomembno vlogo pa ima tudi cena hitosana.

4.2.2 Nanodelci iz heparina in hitosanijevega hidroklorida

Tabela 9: pH, povprečna velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial v odvisnosti od masnega razmerja heparin/hitosanijev hidroklorid.

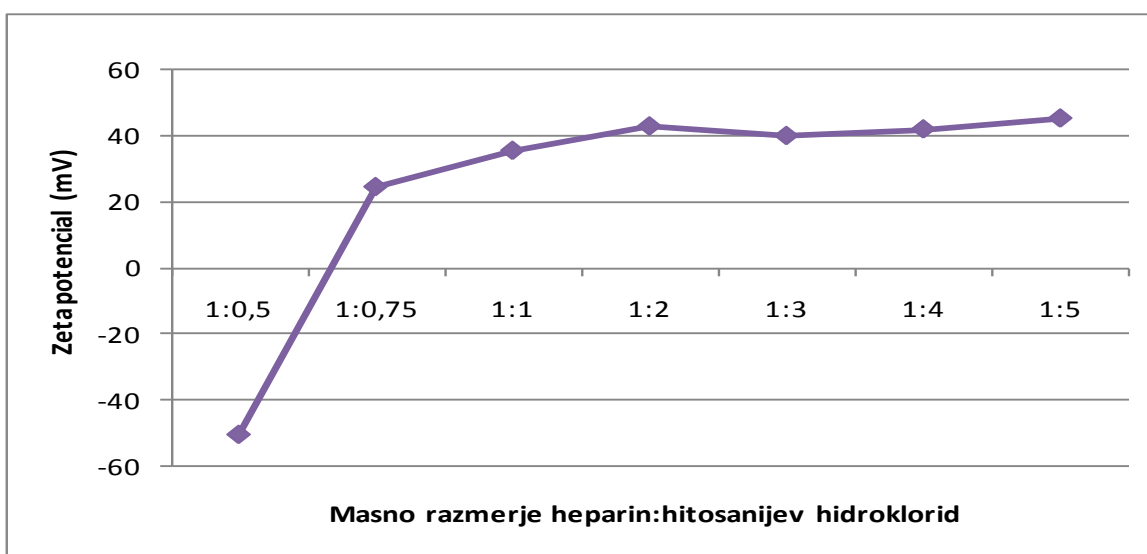
Masno razmerje heparin/hitosanijev hidroklorid	pH vrednost	Povprečna velikost delcev (nm)	Polidisperzni indeks	Zeta potencial (mV)
1:0,5	7,32	4233	0,48	- 50,7
1:0,75	7,02	1886	1,00	24,5
1:1	5,65	122,6	0,22	35,5
1:2	4,96	134,6	0,23	42,9
1:3	4,60	131,4	0,22	40,0
1:4	4,36	152,1	0,25	42,0
1:5	4,20	152,1	0,22	45,3

Tudi v primeru hitosanijevega hidroklorida je z naraščanjem hitosana v masnem razmerju heparin/hitosanijev hidroklorid pH pripravljenih disperzij nanodelcev padal. Vrednosti so se gibale med 7,3 pri masnem razmerju 1:0,5 in 4,2 pri masnem razmerju 1:5 (tabela 9). Osnovna raztopina hitosanijevega hidroklorida je imela pH okoli 4,4, raztopina heparina pa 7,5. Polidisperzni indeksi so bili pri uporabi hitosanijevega hidroklorida nižji kot v primeru hitosanijevega klorida Protasan. Pri masnih razmerjih heparin/hitosanijev hidroklorid 1:1 do 1:5 so bile vrednosti PDI manjše od 0,3, kar pomeni dobro homogenost in s tem boljšo stabilnost vzorcev. Le pri masnih razmerjih 1:0,5 in 1:0,75, ko so nastali delci mikrometrskih velikosti, sta bili vrednosti PDI višji, v disperziji so bili prisotni delci različnih velikosti.



Slika 9: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od masnega razmerja heparin/hitosanijev hidroklorid.

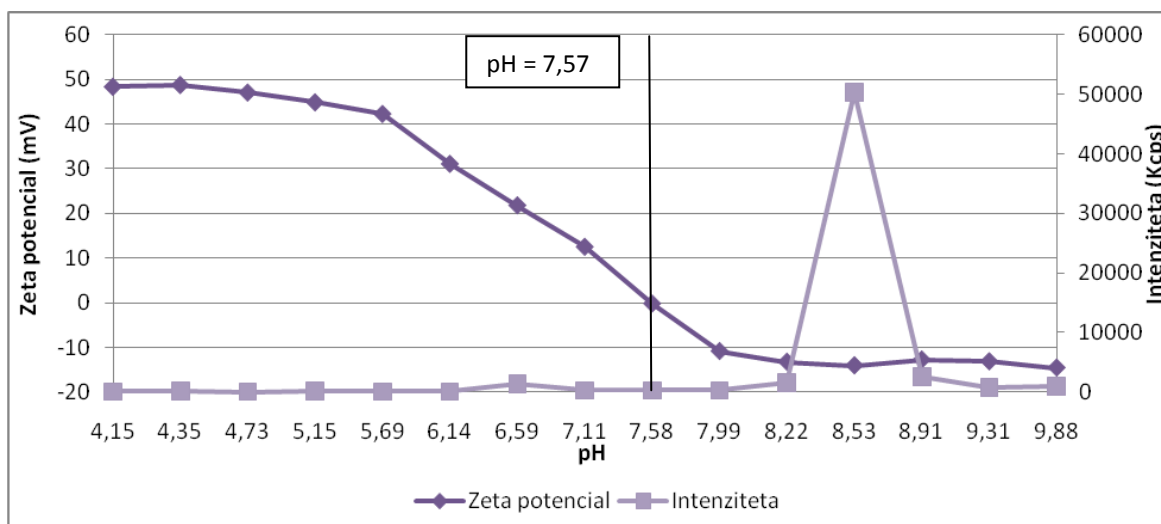
Slika 9 prikazuje povprečno velikost delcev v odvisnosti od masnega razmerja heparin/hitosanijev hidroklorid. Tudi v primeru hitosanijevega hidroklorida so pri masnem razmerju heparin/hitosanijev hidroklorid 1:0,5 in 1:0,75 nastali delci mikrometrskih velikosti (podatki niso vključeni v sliko 9). Pri vseh ostalih razmerjih so nastali delci nanometrskih velikosti. Povprečne velikosti delcev so se gibale od 123 nm pri masnem razmerju 1:1 do 152 nm pri masnem razmerju 1:5. Z naraščajočim deležem hitosana velikost delcev narašča.



Slika 10: Zeta potencial delcev v odvisnosti od masnega razmerja heparin/hitosanijev hidroklorid.

Rezultati s slike 10 kažejo, da zeta potencial narašča z naraščanjem deleža hitosana v masnem razmerju heparin/hitosanijev hidroklorid. Najvišji ZP imajo nanodelci z masnim razmerjem 1:5, in sicer 45 mV. Negativen ZP so imeli le ND z masnim razmerjem heparin/hitosanijev hidroklorid 1:0,5 zaradi prostih anionskih skupin heparina. Za razliko od hitosanijevega klorida Protasan smo pri hitosanijevem hidrokloridu dobili pri masnem razmerju heparin/hitosanijev hidroklorid 1:0,75 pozitiven ZP, kar pomeni prebitek pozitivnih amino skupin hitosana na račun večje gostote kationskega naboja hitosanijevega hidroklorida (hitosanijev hidroklorid + 5,3 mmol/g in hitosanijev klorid Protasan + 1,7 mmol/g).

Disperzije pripravljenih nanodelcev so pri vseh masnih razmerjih fizikalno stabilne, saj so izmerjene vrednosti zeta potenciala večje od 30 mV oz. manjše od -30 mV. Izjema je le masno razmerje 1:0,75, kjer je vrednost ZP 24 mV. Ta sistem teži k agregaciji, kar smo tudi vizualno opazili.



Slika 11: Zeta potencial delcev in intenziteta sipane svetlobe v odvisnosti od pH pri masnem razmerju heparin/hitosanijev hidroklorid 1:2.

Slika 11 prikazuje vpliv pH sistema na zeta potencial in intenziteto sipane svetlobe disperzije nanodelcev z masnim razmerjem heparin/hitosanijev hidroklorid 1:2. Začetni ZP nastalega PEK je bil nekoliko višji kot pri hitosanijevem kloridu Protasan in sicer okoli 50 mV, kar je posledica višjega kationskega naboja hitosanijevega hidroklorida. Z naraščanjem pH sistema je pozitivni ZP padal, ker se je kationski naboj hitosana zmanjševal. Pri pH vrednosti 7,57 smo dosegli izoelektrično točko, v kateri je sistem

najmanj stabilen. PEK iz hitosanijevega hidroklorida imajo višjo izoelektrično točko (7,57) v primerjavi s PEK iz hitosanijevega klorida Protasan (6,88). Zeta potencial potem do pH 8,2 postopno pade na vrednost približno -15 mV, potem pa do pH vrednosti 10 ostane nespremenjen.

Intenziteta sipane svetlobe se do pH 8,2 skoraj ni spreminjala, kar kaže na fizikalno stabilnost disperzije nanodelcev. Kmalu po dosegu izoelektrične točke je intenziteta sipane svetlobe strmo narasla, saj je prišlo do tvorbe agregatov. Sledil je strm padec intenzitete zaradi sedimentacije nastalih agregatov. Sistem je fizikalno stabilen do pH 6 (ZP nad 30 mV) (22, 23).

Tabela 10: Gostota naboja disperzij nanodelcev z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosanijev hidroklorid.

Masno razmerje heparin/hitosanijev hidroklorid	Začetni potencial (mV)	$\bar{V}^*$ titracijske razt. (ml)	Gostota naboja (mmol/l)
1:5	+ 423	1,03	+2,06
1 :4	+ 390	1,01	+2,02
1: 3	+ 380	0,86	+1,72
1:2	+ 320	0,67	+1,34
1:1	+ 260	0,24	+0,48
1:0,75	+ 60	0,07	+ 0,13
1:0,50	- 590	0,26	- 0,53

$\bar{V}^*$ je povprečna vrednost 3 paralelnih določitev.

Tabela 10 prikazuje gostoto naboja disperzij nanodelcev z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosanijev hidroklorid. Tako kot pri hitosanijevem kloridu Protasan tudi pri hitosanijevem hidrokloridu z zniževanjem deleža hitosana v masnem razmerju heparin/hitosan pada gostota kationskega naboja PEK, ker se delež prebitnega kationskega hitosanijevega hidroklorida zmanjšuje. Šele pri masnem razmerju heparin/hitosanijev hidroklorid 1:0,5 se v disperziji nanodelcev pojavi primanjkljaj pozitivno nabitih amino skupin hitosanijevega hidroklorida, potrebnih za elektrostatsko interakcijo z anionskimi skupinami heparina. Zaradi prostih anionskih skupin heparina imajo nanodelci negativen površinski naboj.

Tudi v primeru hitosanijevega hidroklorida je optimalno masno razmerje heparin/hitosanijev hidroklorid 1:1. Povprečna velikost delcev je bila v tem primeru najmanjša (123 nm), ZP pa je bil večji od 30 mV (35,5 mV). Površinski naboj nanodelcev

je pozitiven, kar pomeni, da v disperziji ni prisotne večje količine prostega heparina oziroma so vse anionske skupine heparina vključene v elektrostatsko interakcijo s kationskimi amino skupinami hitosanijevega hidroklorida.

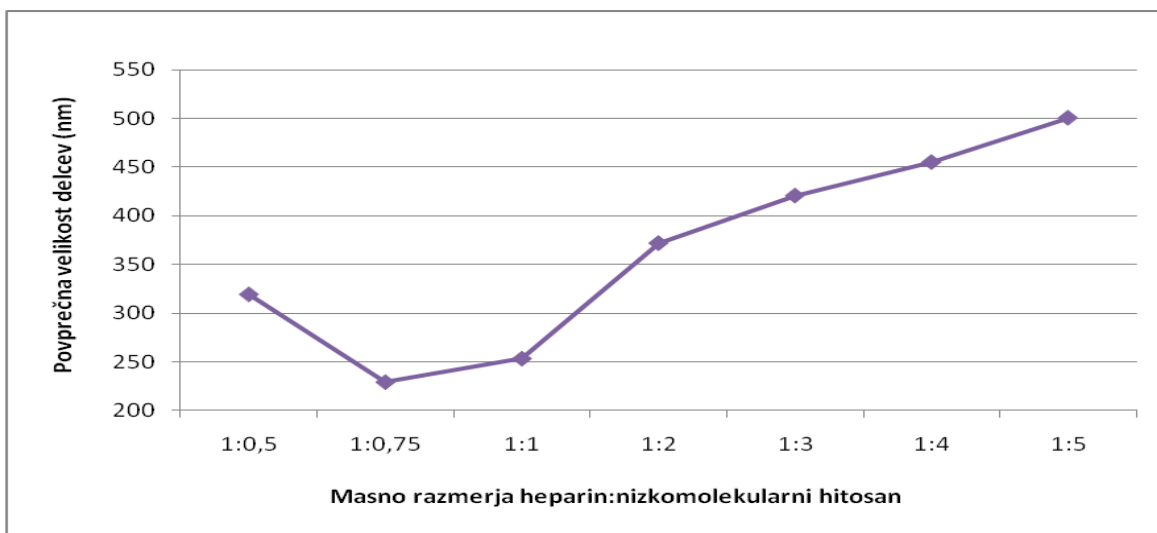
4.2.3 Nanodelci iz heparina in nizkomolekularnega hitosana

Tabela 11: pH, povprečna velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial v odvisnosti od masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan.

Masno razmerje heparin/nizkomolekularni hitosan	pH vrednost	Povprečna velikost delcev (nm)	Polidisperzni indeks	Zeta potencial (mV)
1:0,5	3,45	319,4	0,54	40,4
1:0,75	3,38	229,3	0,39	60,1
1:1	3,36	253,4	0,45	65,1
1:2	3,33	372,0	0,50	76,5
1:3	3,27	420,8	0,53	78,1
1:4	3,26	455,2	0,59	77,9
1:5	3,25	500,7	0,53	80,7

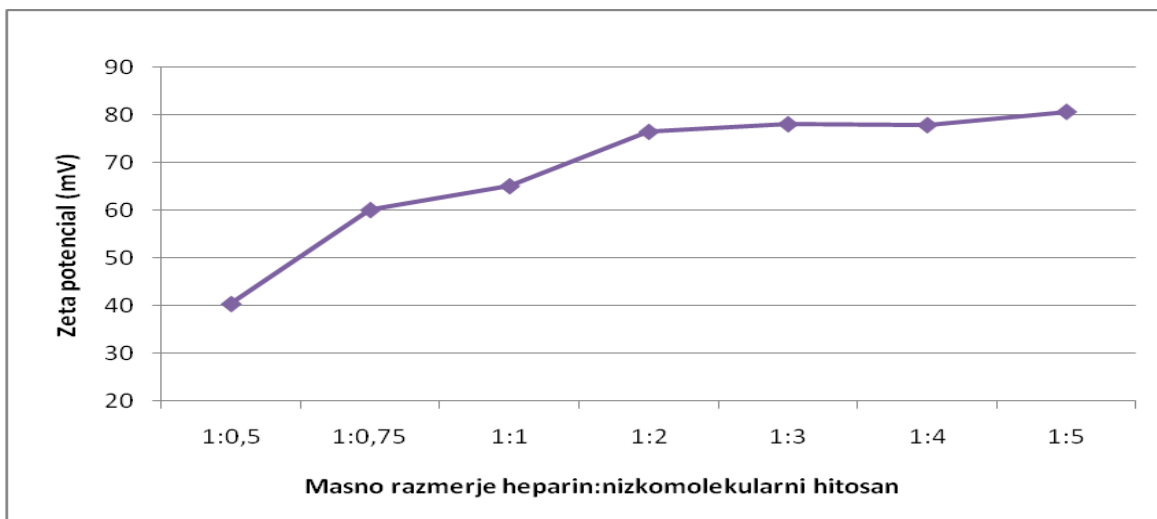
Osnovna raztopina nizkomolekularnega hitosana je imela pH okoli 3,1. Pripravljene disperzije nanodelcev z nizkomolekularnim hitosanom so imele pH vrednost med 3,25 in 3,45 (tabela 11). Le-ta se s spreminjanjem masnega razmerja ni bistveno spreminjala.

PDI se je v vseh pripravljenih disperzijah ND iz heparina in nizkomolekularnega hitosana gibal okoli vrednosti 0,5. Iz tega sklepamo, da so bili v disperzijah prisotni delci različnih velikosti, oziroma smo v primeru uporabe nizkomolekularnega hitosana dobili široko porazdelitev velikosti delcev.



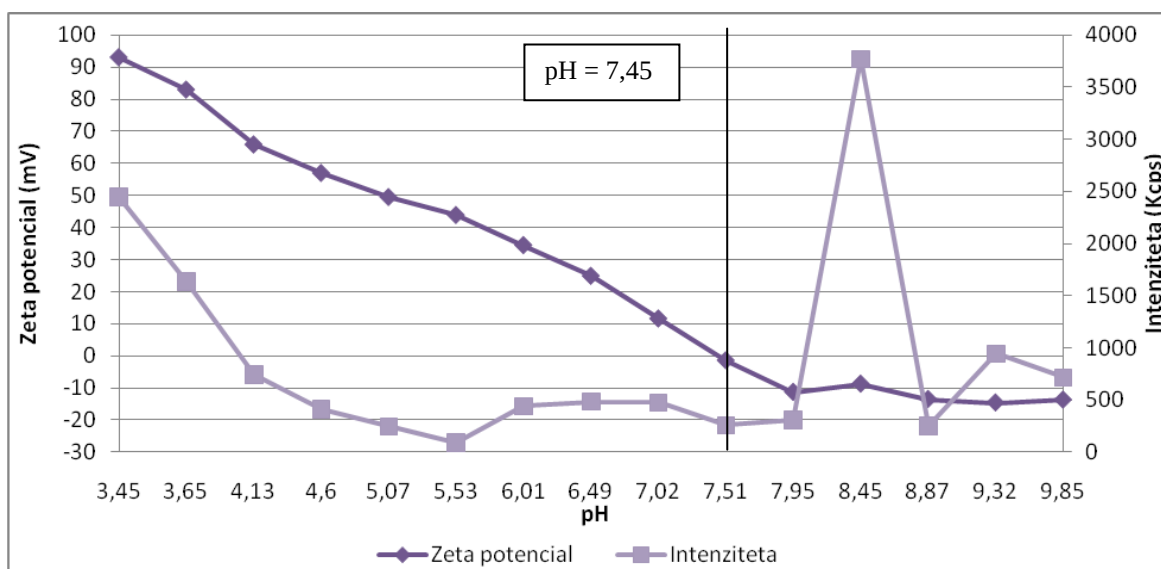
Slika 12: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan.

S slike 12 je razvidno, da so pri vseh masnih razmerjih nastali delci nanometrskih velikosti. Najmanjše delce smo dobili pri masnem razmerju 1:0,75, in sicer 230 nm, največje pa pri masnem razmerju 1:5 (500 nm). Pri masnem razmerju heparin/nizkomolekularni hitosan 1:0,5 in 1:0,75 je velikost delcev najprej nekoliko padla, nato pa je naraščala z naraščajočim deležem hitosana. Naraščanje velikosti delcev lahko pojasnimo z dejstvom, da se molekule heparina z zviševanjem deleža hitosana obdajo z vedno večjim številom kationskih molekul nizkomolekularnega hitosana.



Slika 13: Zeta potencial delcev v odvisnosti od masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan.

S slike 13 je razvidno, da z naraščanjem hitosana v masnem razmerju heparin/nizkomolekularni hitosan ZP narašča. Za razliko od ostalih dveh hitosanov so bile v primeru nizkomolekularnega hitosana vrednosti ZP pri vseh masnih razmerjih pozitivne in nekoliko višje. To se ujema z ugotovitvijo, da ima nizkomolekularni hitosan najvišjo gostoto kationskega naboja, kar pomeni, da lahko molekule nizkomolekularnega hitosana pri enakem masnem razmerju vstopijo v interakcijo z več molekulami heparina kot ostala dva hitosana. Zato je tudi v primeru masnih razmerjih 1:0,5 in 1:0,75 naboj na površini nastalih delcev še vedno pozitiven. Pri vseh masnih razmerjih so bile izmerjene vrednosti ZP večje od 30 mV, disperzije so bile fizikalno stabilne.



Slika 14: Zeta potencial delcev in intenziteta sipane svetlobe v odvisnosti od pH pri masnem razmerju heparin/nizkomolekularni hitosan 1:2.

Tudi v primeru nizkomolekularnega hitosana smo pri pH titraciji uporabili disperzijo nanodelcev z masnim razmerjem heparin/nizkomolekularni hitosan 1:2 (slika 14). Če primerjamo začetne ZP nanodelcev iz vseh treh vrst hitosanov, je bil v primeru uporabe nizkomolekularnega hitosana začetni ZP najvišji (90 mV), kar se ujema z dejstvom, da ima nizkomolekularni hitosan najvišjo gostoto kationskega naboja.

Z naraščanjem pH vrednosti se je pozitiven naboj hitosana zmanjševal in s tem tudi ZP. Izoelektrično točko smo dosegli pri pH 7,45. Tako kot pri ostalih dveh vrstah hitosana je po izoelektrični točki dobil ZP negativen predznak (razpad PEK, proste anionske skupine heparina) in se z nadaljnjim zviševanjem pH vrednosti ustalil na vrednosti med -10 in -20 mV.

Intenziteta sipane svetlobe je močno narasla v bližini izoelektrične točke, kar je posledica nastanka agregatov in obarjanja. Sledil je padec intenzitete sipane svetlobe, ki je posledica sedimentacije. Tudi v primeru nizkomolekularnega hitosana je bila disperzija nanodelcev fizikalno stabilna do pH vrednosti 6 (ZP nad 30 mV) (22, 23).

Tabela 12: Gostota naboja disperzij nanodelcev z različnimi masnimi razmerji heparin/nizkomolekularni hitosan.

Masno razmerje heparin/nizkomolekularni hitosan	Začetni potencial (mV)	$\bar{V}^*$ titracijske razt. (ml)	Gostota naboja (mmol/l)
1:5	+ 600	1,56	+3,12
1:4	+ 550	1,50	+3,00
1:3	+ 480	1,37	+2,74
1:2	+ 440	1,10	+2,20
1:1	+ 350	0,66	+1,32
1:0,75	+ 320	0,44	+ 0,88
1:0,50	+ 280	0,13	+ 0,26

$\bar{V}^*$ je povprečna vrednost 3 paralelnih določitev.

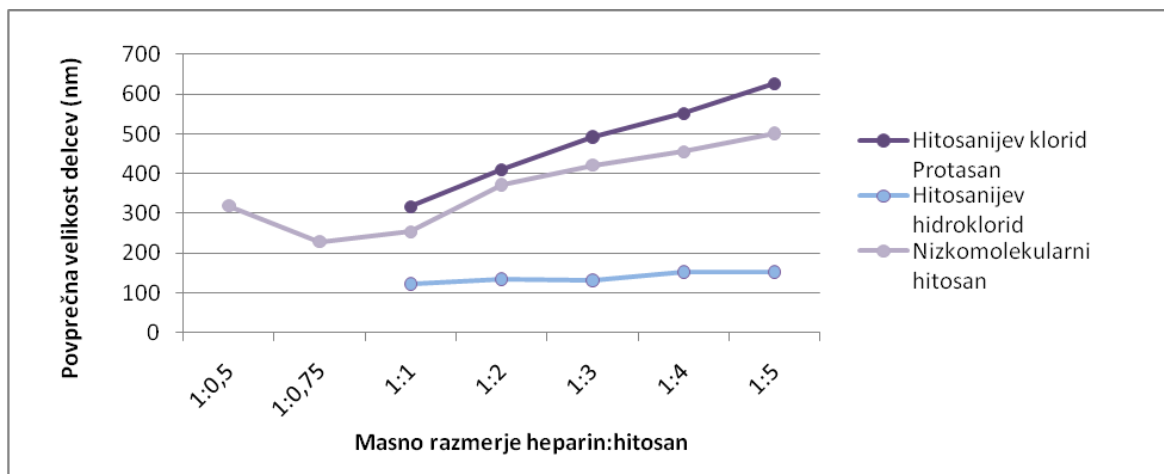
Tudi v primeru nizkomolekularnega hitosana je bila gostota kationskega naboja najvišja pri masnem razmerju heparin/nizkomolekularni hitosan 1:5 (tabela 12). Gostota kationskega naboja je nato z zniževanjem masnega razmerja sicer padala, vendar pa so disperzije nanodelcev pri vseh masnih razmerjih ohranile kationski karakter, kar pomeni, da so bili nastali PEK nosilci kationskega naboja zaradi prostih amino skupin nizkomolekularnega hitosana. Tudi v primeru masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan 1:0,5 je bilo na voljo dovolj kationskih amino skupin za elektrostatsko interakcijo z anionskimi skupinami heparina. To lahko razložimo z dejstvom, da ima nizkomolekularni hitosan najvišjo gostoto kationskega naboja.

V primeru uporabe nizkomolekularnega hitosana smo kot optimalno masno razmerje izbrali razmerje heparin/nizkomolekularni hitosan 1:0,75. Pri tem masnem razmerju smo dobili najmanjšo povprečno velikost delcev (229 nm) in ZP večji od 30 mV (60,1 mV). Gostota naboja PEK je bila sicer nizka, kljub vsemu pa kaže disperzija navzven kationski karakter. Tako razmerje je bilo mogoče doseči na račun višje gostote kationskega naboja v primerjevi z gostoto naboja ostalih dveh hitosanov.

To masno razmerje je ugodno, saj je naš cilj vezati čim večjo količino heparina s čim manjšim dodatkom hitosana.

4.2.4 Primerjava fizikalnih lastnosti disperzij nanodelcev iz različnih hitosanov

V nadaljevanju smo primerjali fizikalne lastnosti disperzij nanodelcev (povprečna velikost delcev, polidisperzni indeks, zeta potencial in gostoto naboja) iz vseh treh vrst hitosanov.



Slika 15: Povprečna velikost delcev iz različnih hitosanov v odvisnosti od masnega razmerja heparin/hitosan.

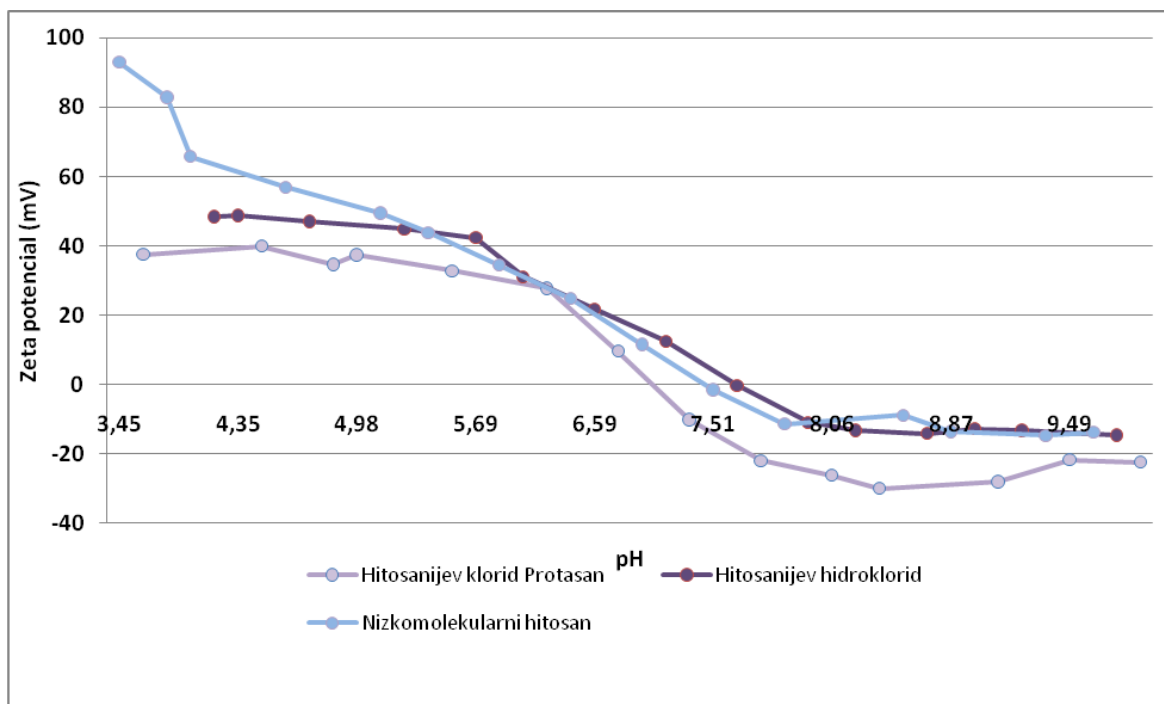
Z naraščanjem deleža hitosana v masnem razmerju heparin/hitosan velikost nastalih nanodelcev pri vseh treh hitosanih narašča, ker se molekule heparina obdajo z vedno večjim številom molekul hitosana (slika 15).

Povprečna velikost nastalih nanodelcev je bila največja pri hitosanijevem kloridu Protasan (320-620 nm), nekoliko manjši so bili delci iz nizkomolekularnega hitosana (319-500 nm), najmanjše delce pa smo dobili z uporabo hitosanijevega hidroklorida (122-152 nm). Slednji so imeli tudi najmanjši PDI ($<0,25$) in s tem najožjo porazdelitev velikosti delcev. Pri uporabi hitosanijevega klorida Protasan in nizkomolekularnega hitosana je bil PDI $> 0,3$, kar kaže na heterogenost disperzij.

Če primerjamo gostoto naboja PEK iz različnih hitosanov pri enakih masnih razmerjih, vidimo, da višja kot je gostota kationskega naboja posameznega hitosana, višja je tudi gostota naboja nastalega PEK. Tako smo pri masnem razmerju heparin/hitosan 1:2 v primeru nizkomolekularnega hitosana dobili največjo gostoto naboja (2,2 mmol/l). Sledil je PEK iz hitosanijevega hidroklorida z gostoto naboja 1,3 mmol/l, najnižjo gostoto naboja pa

so imeli nanodelci iz hitosanijevega klorida Protasan (0,84 mmol/l), saj je imel le-ta najnižji kationski naboj.

Zeta potencial je bil pri masnem razmerju heparin/hitosan 1:2 pri vseh treh hitosanih pozitiven. Najvišji ZP so imeli ND iz nizkomolekularnega hitosana (76 mV), sledil je hitosanijev klorid Protasan (62 mV). Najnižji ZP smo izmerili v primeru ND iz hitosanijevega hidroklorida (42,9 mV).

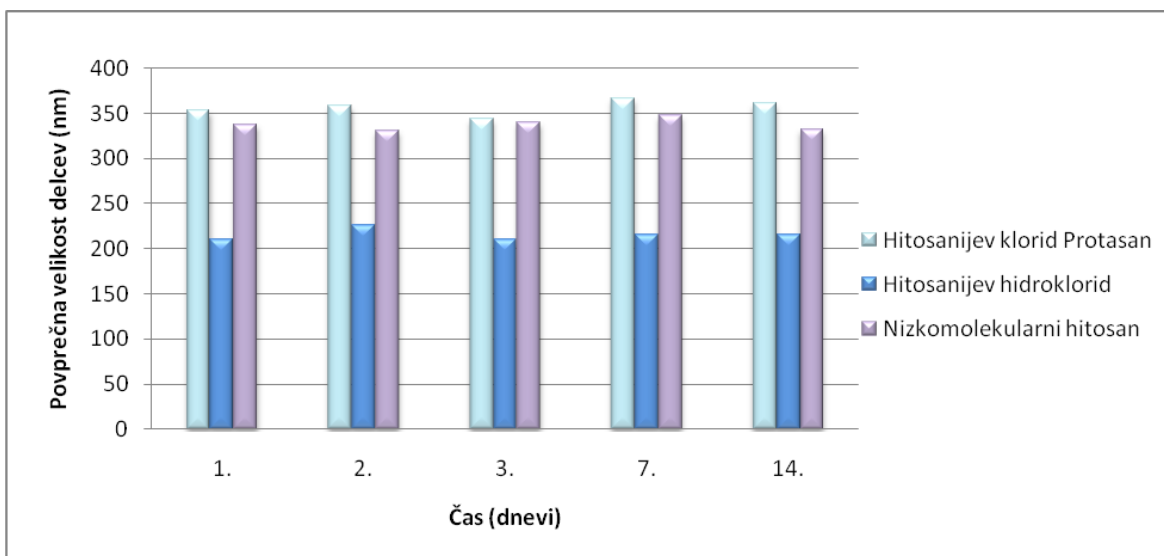


Slika 16: Zeta potencial delcev iz različnih hitosanov v odvisnosti od pH pri masnem razmerju heparin/hitosan 1:2.

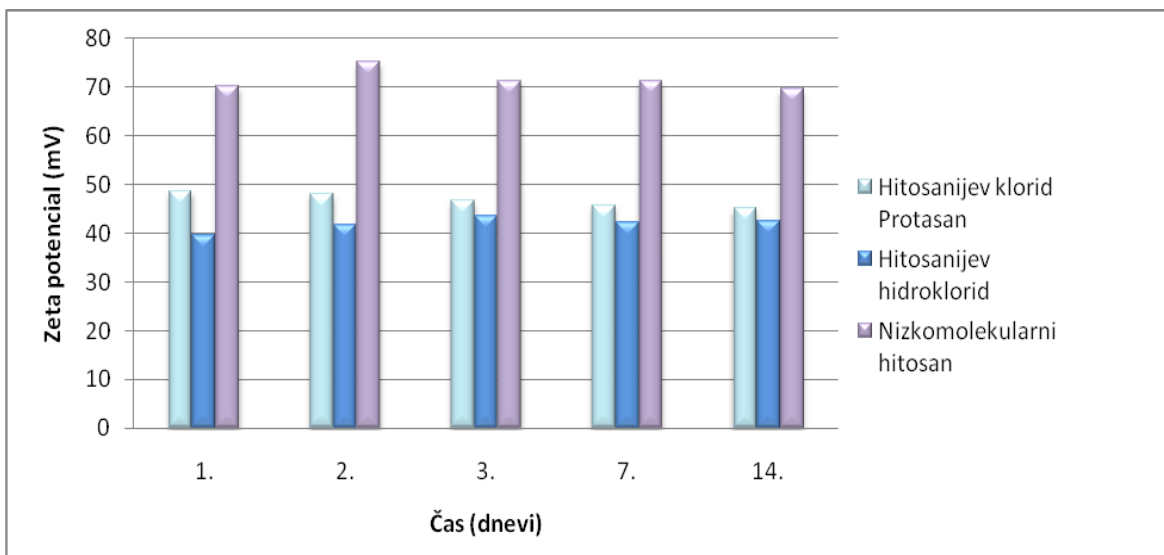
Slika 16 prikazuje vpliv pH sistema na zeta potencial disperzij nanodelcev iz različnih hitosanov pri masnem razmerju heparin/hitosan 1:2. Če primerjemo ZP vseh treh disperzij nanodelcev pri pH približno 5, vidimo, da imajo nanodelci iz nizkomolekularnega hitosana največjo vrednost ZP (približno 50 mV). Sledijo ND iz hitosanijevega hidroklorida z ZP približno 45 mV. Najmanjši ZP pa smo dobili v primeru nanodelcev iz hitosanijevega klorida Protasan (35 mV). Iz teh podatkov je razvidno, da na zeta potencial disperzij ND ne vpliva samo pH in s tem delež protoniranih amino skupin hitosana, ki vstopajo v interakcijo z nasprotno nabitimi skupinami heparina, ampak tudi vrsta hitosana. Osnovne raztopine hitosana se med seboj razlikujejo v stopnji deacetilacije oziroma gostoti kationskega naboja.

4.3 Spremljanje fizikalne stabilnosti disperzij nanodelcev

Fizikalno stabilnost disperzij nanodelcev smo spremljali v obdobju 14 dni tako, da smo v določenih časovnih razmikih (1., 2., 3., 7. in 14. dan) izmerili povprečno velikost delcev in zeta potencial disperzij nanodelcev.



Slika 17: Povprečna velikost delcev pri masnem razmerju heparin/hitosan 1:1 v odvisnosti od časa pri različnih hitosanih.



Slika 18: Zeta potencial delcev pri masnem razmerju heparin/hitosan 1:1 v odvisnosti od časa pri različnih hitosanih.

Iz slike 17 je razvidno, da se velikost nastalih delcev v opazovanem časovnem obdobju bistveno ne spreminja ne glede na uporabljen hitosan. Povprečne velikosti delcev pri hitosanijevem hidrokloridu so se gibale med 210 in 226 nm, pri nizkomolekularnem hitosanu od 332 do 348 nm in pri hitosanijevem kloridu Protasan od 344 do 367 nm. Iz tega lahko sklepamo, da se elektrostatske interakcije med protoniranimi amino skupinami hitosana in negativno nabitimi sulfatnimi skupinami heparina vzpostavijo v času priprave disperzije nanodelcev, to je znotraj ene ure.

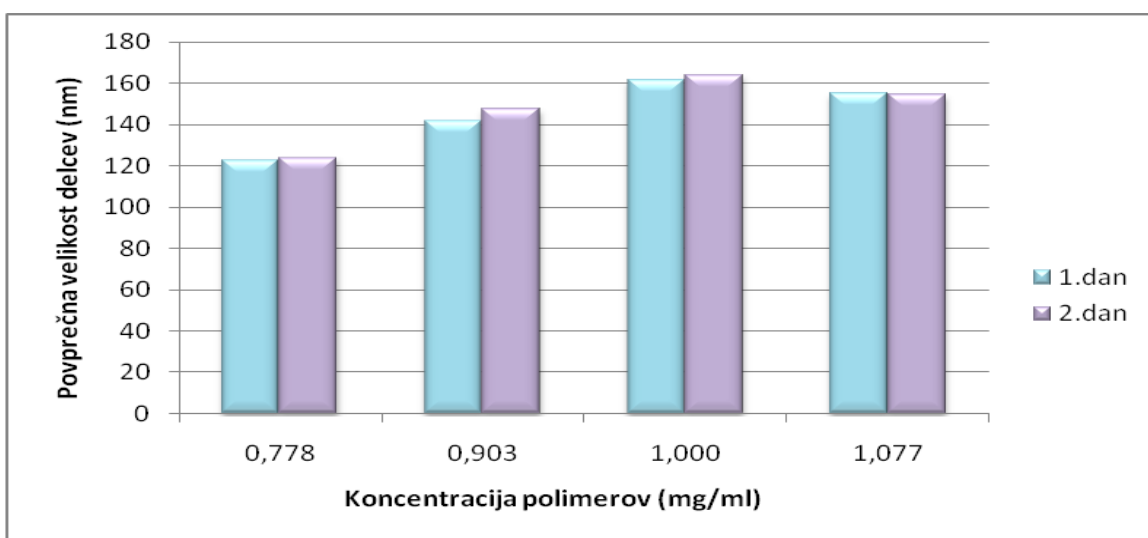
Tudi začetne vrednosti zeta potenciala disperzij (> 30 mV) se v obdobju dveh tednov niso bistveno spremenile (slika 18).

Zaključimo lahko, da so pripravljene disperzije ND fizikalno stabilne najmanj 14 dni, saj se v tem času povprečna velikost nanodelcev ni bistveno spreminjala, ravno tako ne ZP. Pri vzorcih tudi vizualno nismo opazili agregacije delcev.

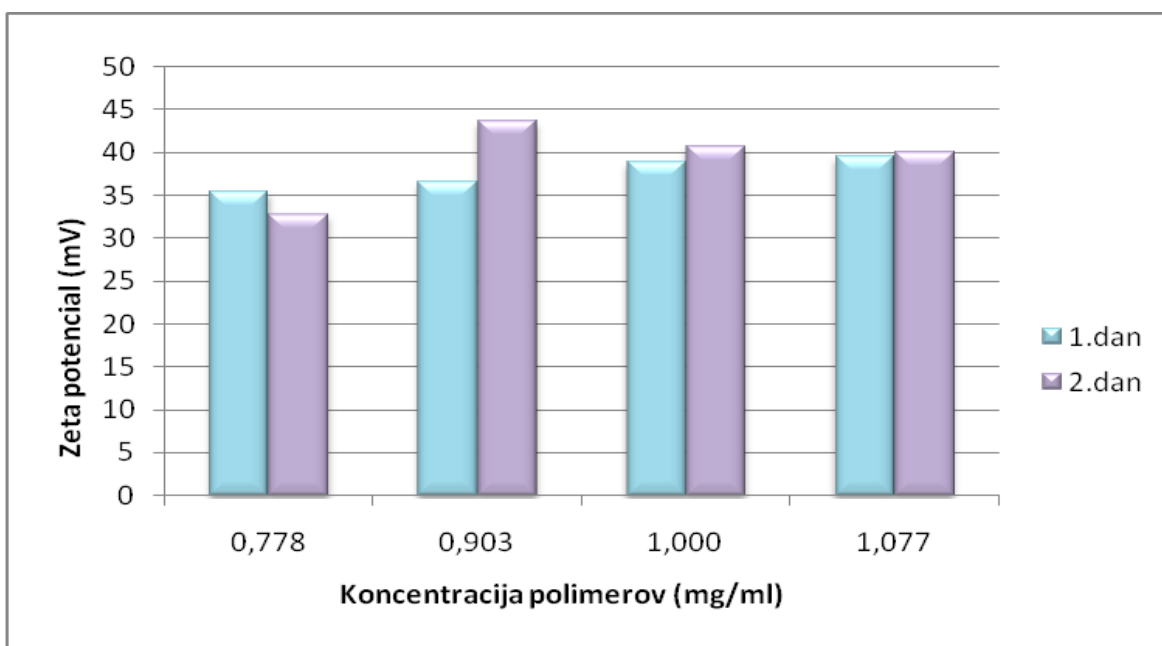
4.4 Vpliv koncentracije polimerov v disperziji na fizikalne lastnosti nanodelcev

Ugotavljali smo vpliv koncentracije polimerov v disperziji z masnim razmerjem heparin/hitosan 1:1 na končne fizikalne lastnosti nanodelcev. V ta namen smo izmerili povprečno velikost in zeta potencial disperzij ND s skupnimi koncentracijami polimerov 0,778-1,007 mg/ml. Meritve smo izvedli takoj po pripravi disperzije in nato še drugi dan.

4.4.1 Nanodelci iz heparina in hitosanijevega hidroklorida v masnem razmerju 1:1



Slika 19: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od koncentracije polimerov v disperziji (heparin/hitosanijev hidroklorid 1:1).



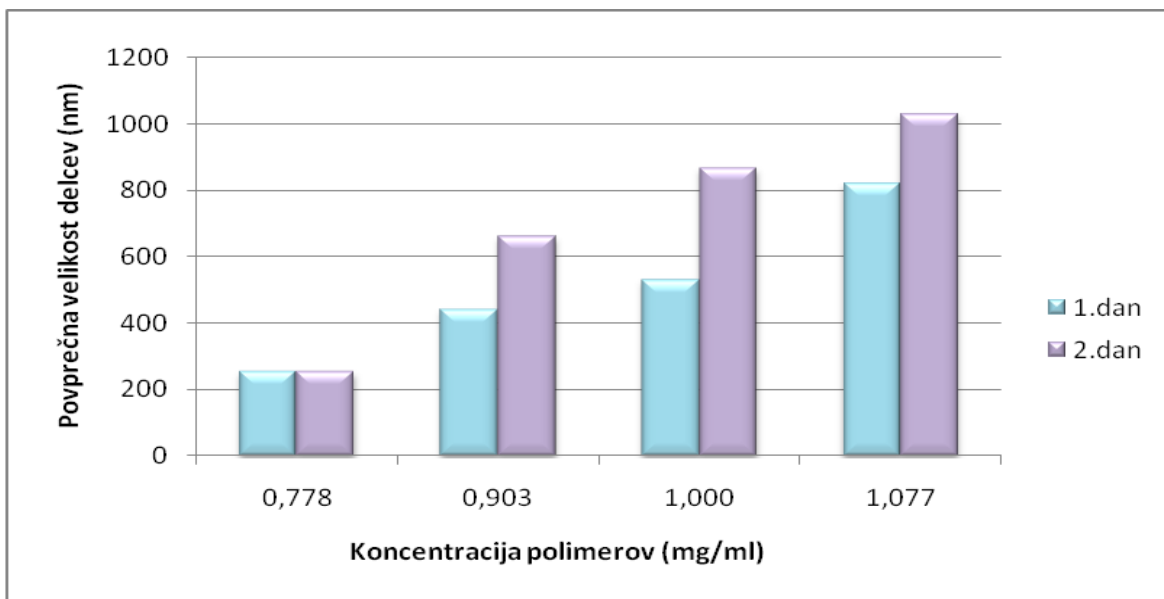
Slika 20: Zeta potencial delcev v odvisnosti od koncentracije polimerov v disperziji (heparin/hitosanijev hidroklorid 1:1).

Iz slike 19 je razvidno, da se velikost nanodelcev z naraščajočo koncentracijo polimerov nekoliko povečuje. Pri višji koncentraciji obeh polimerov vstopa v interakcijo številčno več molekul heparina in hitosana, kar privede do nastanka večjih delcev, hkrati pa nastane tudi številčno več delcev (31).

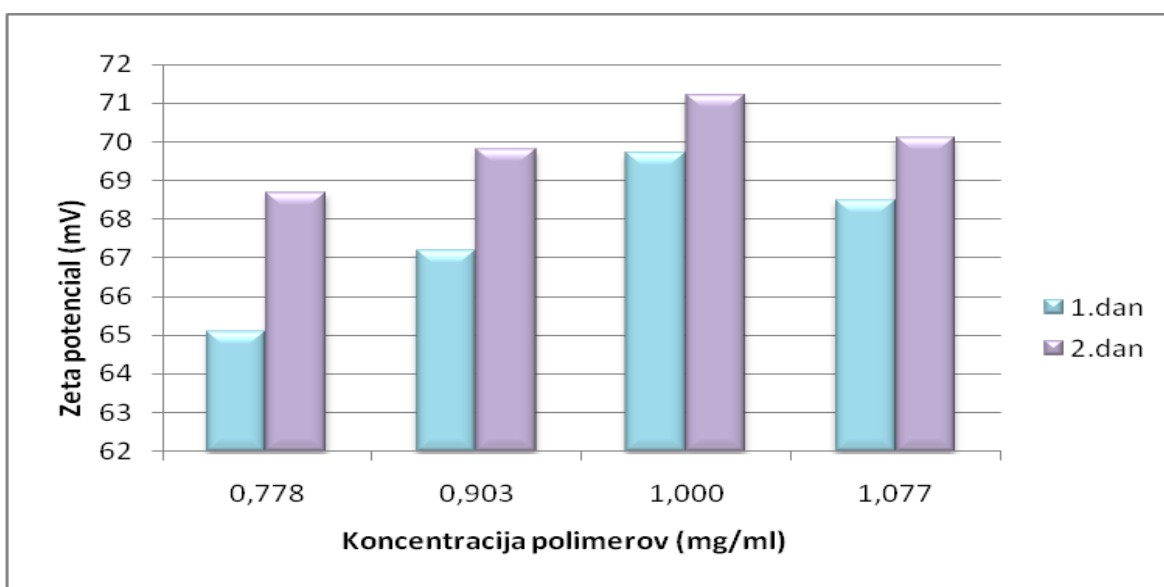
Povečana koncentracija polimerov v disperziji nima bistvenega vpliva na zeta potencial nastalih delcev. Vrednosti ZP nanodelcev so se gibale med 35 in 40 mV (slika 20).

Glede na izmerjene velikosti delcev in ZP drugi dan po pripravi nanodelcev, lahko sklepamo, da se elektrostatske interakcije med nasprotno nabitima polimeroma vzpostavijo hitro, saj se izmerjeni parametri drugi dan bistveno ne razlikujejo od vrednosti izmerjenih takoj po pripravi disperzije nanodelcev.

4.4.2 Nanodelci iz heparina in nizkomolekularnega hitosana v razmerju 1:1



Slika 21: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od koncentracije polimerov v disperziji (heparin/nizkomolekularni hitosan 1:1).



Slika 22: Zeta potencial delcev v odvisnosti od koncentracije polimerov v disperziji (heparin/nizkomolekularni hitosan 1:1).

Vpliv koncentracije polimerov na velikost nanodelcev je v primeru nizkomolekularnega hitosana veliko bolj izrazit kot pri hitosanijevem hidrokloridu. Večja je koncentracija polimerov, večji so nanodelci (slika 21). Pri koncentraciji polimerov 0,778 mg/ml

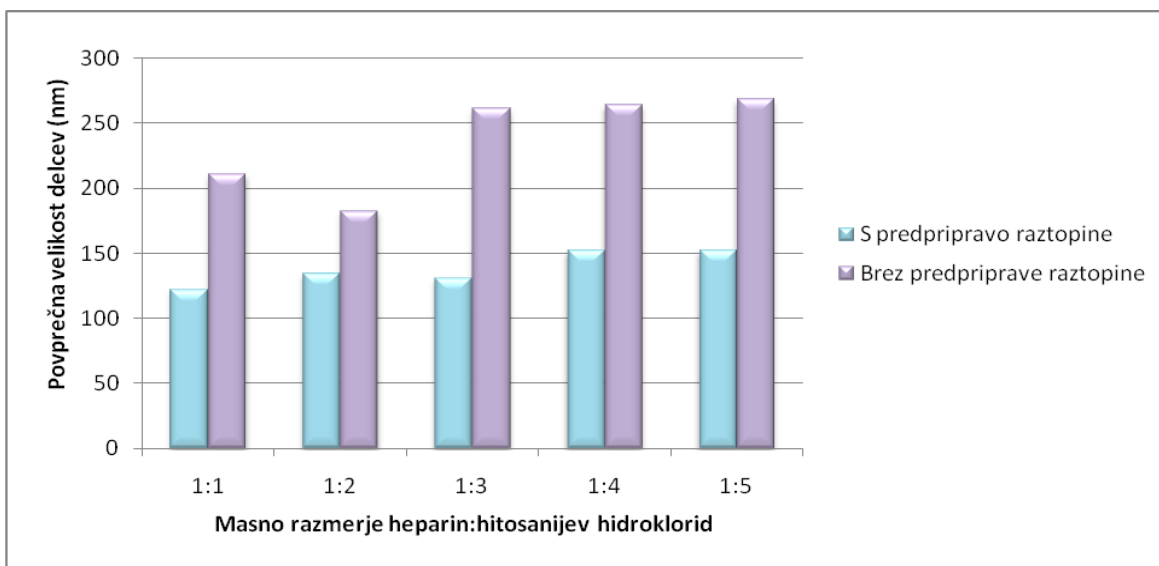
nastanejo delci s povprečnim premerom 253 nm, pri koncentraciji 1,077 mg/ml pa je povprečni premer že 821 nm. Večji vpliv skupne koncentracije polimerov na velikost nastalih nanodelcev je v primeru nizkomolekularnega hitosana najverjetneje posledica njegove večje gostote kationskega naboja.

Velikost nanodelcev je bila pri vseh koncentracijah polimerov razen pri koncentraciji 0,778 mg/ml drugi dan veliko večja kot takoj po izdelavi disperzije. Npr. pri koncentraciji polimerov 1,000 mg/ml je bila povprečna velikost delcev takoj po pripravi disperzije 531 nm, naslednji dan pa že 868 nm, kar bi lahko kazalo na slabšo fizikalno stabilnost disperzije nanodelcev.

Povišana koncentracija polimerov ima na zeta potencial veliko manjši vpliv kot na velikost ND. Z zviševanjem koncentracije polimerov ZP rahlo narašča (slika 22). Vrednosti za so se gibale med 65 in 71 mV. Bistvenih razlik med vrednostmi ZP, ki smo jih izmerili prvi in drugi dan, ni bilo.

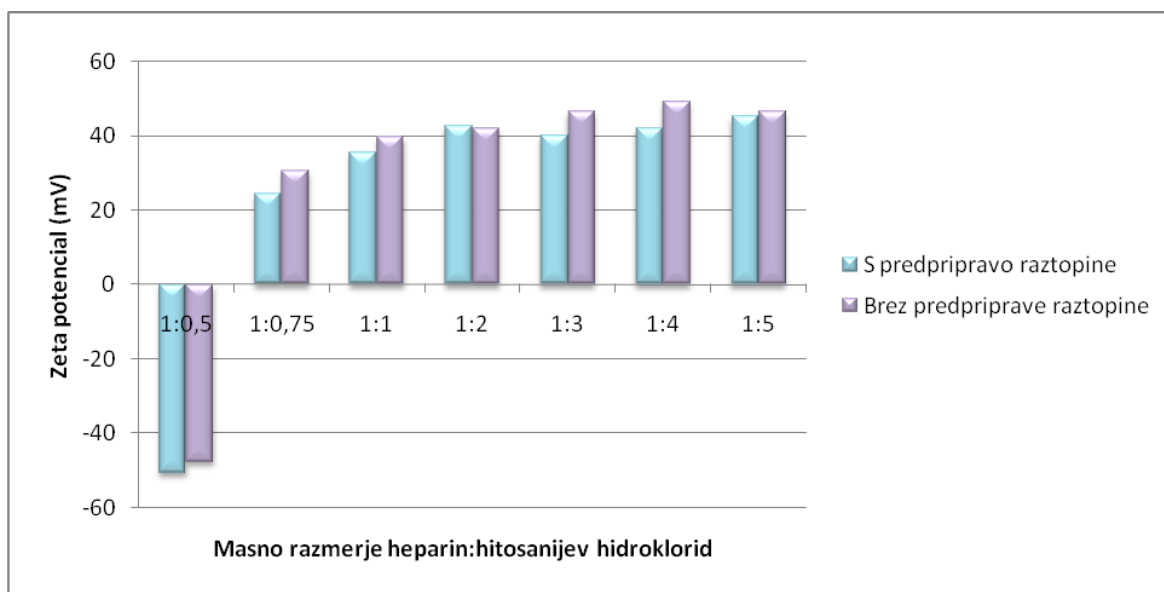
4.5 Vpliv postopka priprave raztopine hitosana na fizikalne lastnosti nanodelcev

Zaradi dobre topnosti hitosanijevega hidroklorida smo poenostavili postopek priprave raztopine hitosanijevega hidroklorida tako, da raztopine nismo izpostavili ultrazvoku, centrifugiranju in filtraciji. Vpliv postopka priprave raztopine hitosana (brez in s predpripravo) na fizikalne lastnosti nastalih nanodelcev smo preverili z določitvijo velikosti delcev, PDI in ZP disperzij.



Slika 23: Vpliv postopka priprave raztopine hitosana na povprečno velikost delcev z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosanijev hidroklorid.

S slike 23 je razvidno, da v obeh primerih (s predpripravo raztopine hitosanijevega hidroklorida in brez) nastanejo pri vseh masnih razmerjih heparin/hitosanijev hidroklorid delci nanometrskih velikosti. Povprečne velikosti delcev pri masnem razmerju 1:0,5 in 1:0,75 niso vključene v sliko 23, ker so s predpripravo vzorca in brez predpriprave nastali delci mikrometrskih velikosti. V primeru predpriprave raztopine hitosana z ultrazvokom, centrifugiranjem in filtriranjem nastanejo nekoliko manjši delci, kot če predpriprave raztopine ni. Verjetno je prišlo do določenih izgub pri centrifugiranju in filtraciji, zato je v interakcijo s heparinom vstopalo manj hitosana, posledično pa so nastali manjši delci.



Slika 24: Vpliv postopka priprave raztopine hitosana na zeta potencial delcev z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosanijev hidroklorid.

Predpriprava raztopine hitosana ima na zeta potencial nastalih delcev manjši vpliv kot na njihovo velikost. V primeru predpriprave raztopine hitosana smo dobili pri vseh masnih razmerjih nanodelce z nekoliko manjšim ZP (slika 24), kar je lahko posledica nekoliko nižje koncentracije hitosanijevega hidroklorida (izgube v primeru centrifugiranja in filtracije).

Zaključimo lahko, da sama predpriprava raztopine hitosana v primeru dobro topnega hitosanijevega hidroklorida ni potrebna, saj z njo po nepotrebnem izgubljammo hitosan in se tako oddaljujemo od dejanske koncentracije. Priprava raztopine hitosanijevega hidroklorida brez predpriprave je tudi hitrejša in cenovno ugodnejša predvsem v primeru večje proizvodnje.

4.6 Izdelava nanodelcev iz hitosana, heparina in TPP

Z dodanim natrijevim tripolifosfatom smo želeli dobiti disperzije iz heparina in nizkomolekularnega hitosana, ki bi bile fizikalno stabilne v širšem pH območju v primerjavi z disperzijami nanodelcev brez dodanega TPP.

4.6.1 Iskanje optimalnega masnega razmerja nizkomolekularni hitosan/TPP

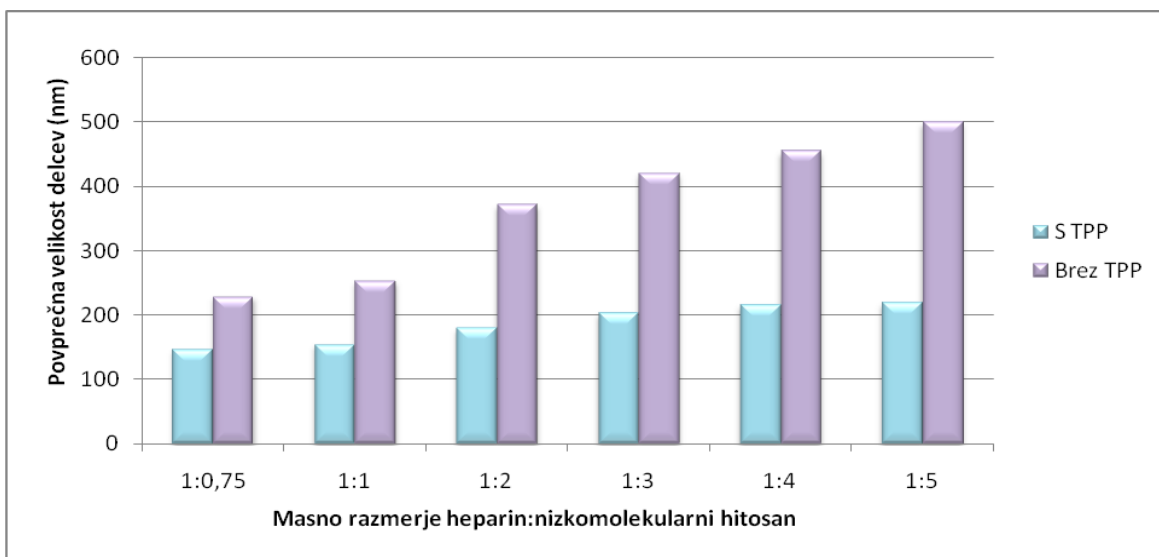
Tabela 13: Vpliv masnega razmerja nizkomolekularni hitosan/TPP na fizikalne lastnosti nanodelcev (heparin/nizkomolekularni hitosan 1:0,75).

Masno razmerje hitosan/TPP	pH	Velikost delcev (nm)	PDI	Zeta potencial (mV)
1:1	3,74	8978	0,42	-15,80
2:1	3,59	7821	0,63	-15,40
3:1	3,56	Vidni delci	0,74	-3,25
4:1	3,53	5453	0,60	16,70
5:1	3,48	147	0,27	37,80

Pripravljene disperzije ND so imele pH okoli 3,5 (tabela 13). Najboljše fizikalne lastnosti so imeli nanodelci z masnim razmerjem hitosan/TPP 5:1. Takšno masno razmerje je pri pripravi nanodelcev uporabil tudi Noemi Csaba s sodelavci (32). Velikost delcev je bila pri tem masnem razmerju najmanjša (147 nm). Pri ostalih masnih razmerjih so nastali delci mikrometrskih velikosti. Zeta potencial je bil pri masnem razmerju nizkomolekularni hitosan/TPP 5:1 višji od 30 mV. Pri ostalih masnih razmerjih so bile vrednosti ZP med -30 in +30 mV, kar kaže na fizikalno nestabilnost disperzij. PDI je bil pri izbranem masnem razmerju najmanjši, kar pomeni najožjo porazdelitev velikosti delcev.

4.6.2 Iskanje optimalnega masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan

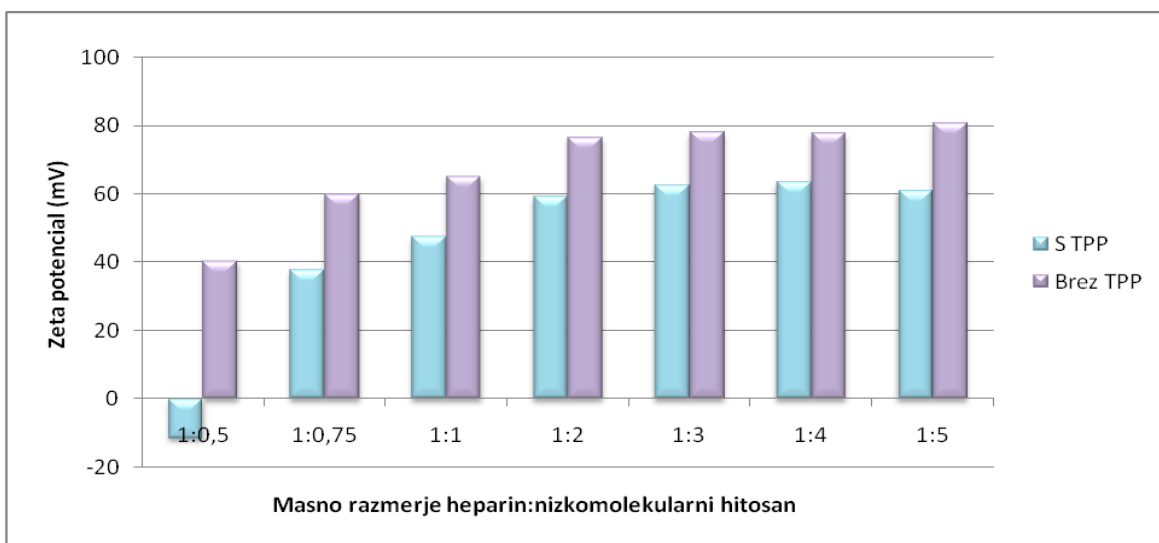
Izhajali smo iz masnega razmerja hitosan/TPP 5:1, ki smo ga določili v predhodnem eksperimentu. Spreminjali smo masno razmerje med heparinom in nizkomolekularnim hitosanom ter ugotavljali vpliv na fizikalne lastnosti delcev. Primerjali smo nanodelce brez in z dodanim TPP.



Slika 25: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan z in brez dodanega TPP.

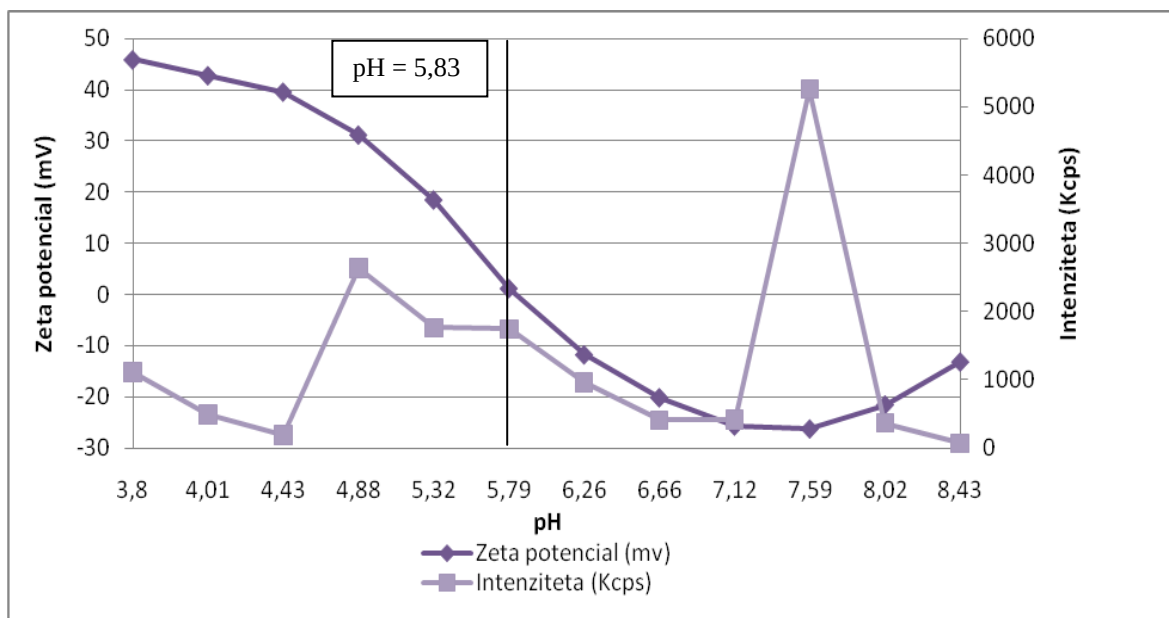
Slika 25 prikazuje, da nastanejo pri vseh masnih razmerjih heparin/nizkomolekularni hitosan v primeru dodanega TPP manjši delci. Npr. pri masnem razmerju heparin/nizkomolekularni hitosan 1:5 so imeli delci brez dodanega TPP povprečno velikost 500 nm, z dodanim TPP pa le 220 nm. TPP kot premreževalec omogoči več interakcij s pozitivnim hitosanom, posledica so manjši delci.

Prišli smo do enakih zaključkov kot Motlekar N. in njegovi sodelavci, ki so ugotovili, da v primeru dodanega TPP nastanejo manjši delci, njihova velikost pa narašča z naraščajočim masnim razmerjem hitosan/heparin (25).



Slika 26: Zeta potencial delcev v odvisnosti od masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan z in brez dodanega TPP.

V primeru dodanega TPP smo dobili pri vseh masnih razmerjih heparin/hitosan, razen pri masnem razmerju 1:0,5, pozitiven zeta potencial, vendar pa so bile vrednosti nižje kot pri nanodelcih brez dodanega TPP (slika 26). Do znižanja pozitivnega ZP je prišlo zaradi zvišanja deleža anionskih skupin, namreč TPP je podobno kot heparin nosilec negativnega naboja. Tako v primeru dodanega TPP vstopa v interakcijo s pozitivno nabitim hitosanom poleg heparina tudi TPP, posledično se zniža delež prostih kationskih amino skupin in s tem tudi zeta potencial. Pri masnem razmerju heparin/hitosan 1:0,5 in ob dodatku TPP pa imamo v disperziji predvsem proste anionske skupine, zaradi česar je vrednost ZP negativna. Brez dodanega TPP smo pri tem masnem razmerju izmerili ZP +40 mV, z dodatkom TPP pa -11,5 mV.



Slika 27: Zeta potencial delcev in intenziteta sipane svetlobe v odvisnosti od pH pri ND z masnim razmerjem heparin/nizkomolekularni hitosan 1:2 in dodanim TPP.

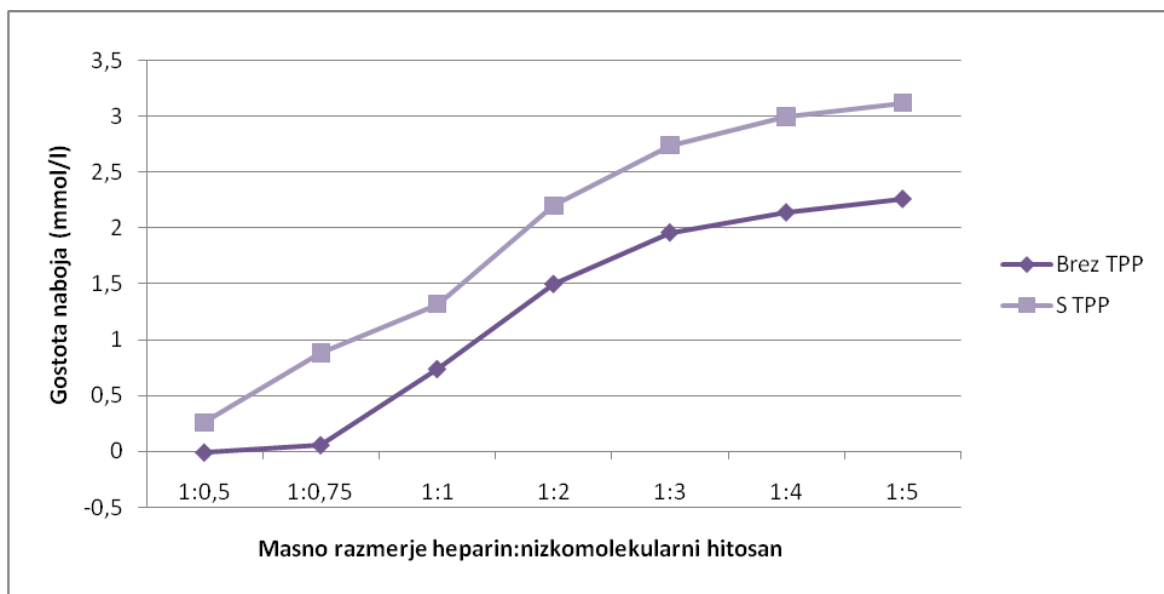
Iz slike 27 je razviden vpliv spremembe pH sistema na stabilnost PEK pripravljenih iz heparina in nizkomolekularnega hitosana z masnim razmerjem 1:2 in z dodanim TPP.

Začetni zeta potencial PEK je bil pri enakem masnem razmerju polimerov v primeru dodanega TPP nižji (45 mV, slika 27) kot brez dodanega TPP (90 mV, slika 14). Vzrok je nižja koncentracija kationskih amino skupin hitosana zaradi dodatne elektrostatske interakcije z anionskim TPP.

Z naraščanjem pH sistema je začel ZP nastalih PEK padati. Izoelektrična točka je bila dosežena pri pH 5,83, kar je precej nižje kot pri ND izdelanih samo iz heparina in

nizkomolekularnega hitosana (pH 7,45). Zeta potencial je padel pod vrednost 30 mV že pri pH približno 4,8, medtem ko se je pri ND brez TPP to zgodilo pri pH okoli 6.

Intenziteta sipane svetlobe je močno narasla pri pH višjem od 7,12 ter nato padla. Vzrok je agregacija nanodelcev in nato njihova sedimentacija. Zaključimo lahko, da dodan TPP zmanjša pH območje, pri katerem je disperzija fizikalno stabilna. V primeru disperzije z masnim razmerjem heparin/nizkomolekularni hitosan 1:2 je to $\text{pH} < 4,88$.



Slika 28: Gostota naboja v odvisnosti od masnega razmerja heparin/nizkomolekularni hitosan z in brez dodanega TPP.

Vrednosti gostote kationskega naboja so v primeru uporabe TPP v vseh primerih nižje zaradi dodatne elektrostatske interakcije kationskih amino skupin hitosana z anionskim TPP (slika 28). Torej v primeru dodanega TPP kationski hitosan vstopa v elektrostatsko interakcijo z anionskim heparinom in TPP. Kljub dodanemu anionskemu TPP pa je površinski naboj nanodelcev pri vseh masnih razmerjih še vedno pozitiven. Izjema je masno razmerje heparin/hitosan 1:0,5. V tem primeru ima PEK negativen površinski naboj, kar pomeni, da je ostalo nekaj prostih anionskih skupin, ki niso v elektrostatski interakciji z nasprotno nabitimi skupinami. Glede na to, da je gostota anionskega naboja zelo nizka, lahko ugotovimo, da smo pri masnem razmerju heparin/hitosan 1:0,5 in dodanem TPP dosegli skoraj ničelni naboj v disperziji ND. Vizualno smo opazili, da je bila pri tem razmerju disperzija bolj motna zaradi obarjanja ND.

4.7 Preverjanje citotoksičnosti nanodelcev

4.7.1 Vpliv celičnega medija na lastnosti disperzij nanodelcev

Pred dodatkom ND je bil celični medij rdeče obarvan s pH vrednostjo 7,64. Takoj po dodatku ND se je celični medij pri vseh volumskih razmerjih obarval rumeno. Ko smo vzorce rahlo premešali, se je vsebina zopet obarvala rdeče, razen pri volumskem razmerju 1:1 je ostala rumena. V tem primeru je bil volumen dodane disperzije ND največji, zato je prišlo do največjega znižanja pH. Pri tem razmerju smo opazili, da je prišlo do vidnega obarjanja nanodelcev oziroma nastanka večjih agregatov, saj je hitosan pri pH vrednosti celičnega medija netopen. Obarvanje je verjetno posledica interakcij med pozitivno nabitimi nanodelci in negativno nabitimi proteini, ki so sestavni del celičnega medija (33). Pri ostalih vzorcih do vidnega obarjanja ND ni prišlo, rumena barva pa je zaradi manjšega znižanja pH vrednosti medija po razmešanju izginila.

Povprečna velikost nanodelcev iz heparina in nizkomolekularnega hitosana je bila po izdelavi 244 nm in ZP 63,5 mV. Pri merjenju disperzij, ki smo jih zmešali s celičnim medijem, smo dobili ne glede na volumsko razmerje med celičnim medijem in disperzijo ND bistveno večje delce, njihov ZP pa je bil veliko nižji. Npr. pri volumskem razmerju celični medij/disperzija nanodelcev 1:1 so nastali delci s povprečno velikostjo 7788 nm ter ZP 1,29 mV. Do enakih rezultatov smo prišli tudi v primeru uporabe nanodelcev iz heparina in hitosanijevega hidroklorida. Rezultati kažejo, da je za študije citotoksičnosti potrebno izbrati primerno razmerje med celičnim medijem in disperzijo ND, pri katerem ne pride do obarjanja.

4.7.2 Ugotavljanje citotoksičnosti disperzij nanodelcev

Za poskuse preverjanja citotoksičnosti ND smo izbrali najvišje volumsko razmerje med celičnim medijem in ND, pri katerem ni prišlo do obarjanja. To razmerje je bilo 5:1. Zanimalo nas je tudi, ali interakcija med proteini in nanodelci vpliva na celično viabilnost, saj imajo celice tako na razpolago manj hranilnih snovi, ki so potrebne za njihovo preživetje.

Eksperiment 1

Pri prvem eksperimentu smo začetno koncentracijo nanodelcev (0,78 mg/ml v primeru nizkomolekularnega hitosana in 0,75 mg/ml pri hitosanijevem hidrokloridu) 12 krat

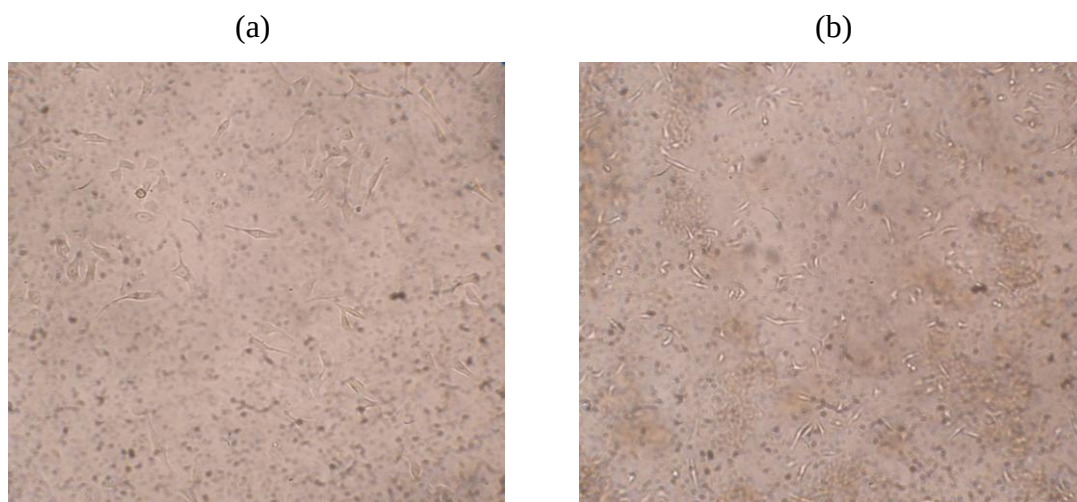
razredčili, kar pomeni, da je bila dejanska koncentracija nanodelcev, ki smo jih dodali v celični medij s keratinociti 0,065 mg/ml pri nizkomolekularnem hitosan in 0,063 mg/ml pri hitosanijevem hidrokloridu. Takoj po dodatku našega vzorca k celičnemu mediju z ali brez celic, je prišlo do rumenega obarvanja, ki pa je izginilo, ko smo vsebino posamezne luknjice rahlo premešali. Iz izmerjenih absorbanc smo izračunali celično viabilnost oziroma preživelost. Pri obeh hitosanih dodatek nanodelcev ni vplival na proliferacijo keratinocitov, saj je bilo preživetje celic $\sim 100\%$. Interakcije med pozitivno nabitimi ND in negativno nabitimi proteini nimajo vpliva na samo preživetje celic. Zaključimo lahko, da ND pri tako nizki koncentraciji niso toksični.

Eksperiment 2

Pri 6-kratnem redčenju je bila koncentracija ND z nizkomolekularnim hitosanom 0,130 mg/ml, pri hitosanijevem hidrokloridu pa 0,125 mg/ml. 6-kratno povišanje koncentracije dodanih nanodelcev ni imelo vpliva na preživelost celic, saj so v obeh primerih vse preživele. Celična viabilnost je bila $\sim 100\%$. Tudi pri tej koncentraciji disperziji nanodelcev nista toksični.

Eksperiment 3

Ugotovili smo že, da uporabljene koncentracije nanodelcev po 4-urni izpostavitvi za keratinocite niso bile toksične, zato smo se odločili, da izpostavitev podaljšamo na 24 ur. Ne glede na uporabljen hitosan disperziji nanodelcev za keratinocite nista toksični, saj je preživetje celic $\sim 100\%$.



Slika 29: Mikroskopska slika celic pred (a) in po dodani (b) disperziji nanodelcev.

Po inkubaciji celic z disperzijami ND smo celice pregledali pod mikroskopom (slika 29). Primerjava slik celic pred in po dodani disperziji ND kaže, da povzročijo ND nastanek nekakšne mreže. Le-ta je verjetno posledica interakcije med pozitivno nabitimi nanodelci in negativno nabitimi proteini, ki so prisotni v celičnem mediju.

Na podlagi rezultatov vseh eksperimentov smo prišli do zaključka, da nanodelci iz heparina in nizkomolekularnega hitosana ali hitosanijevega hidroklorida niso toksični za keratinocite. Ker je naš namen uporabiti izdelane disperzije nanodelcev za peroralno aplikacijo, bi bilo smiselno kot modelne celice uporabiti Caco2 celice ter na njih preveriti potencialno citotoksičnost. Predvidevamo pa, da se dobljeni rezultati ne bi bistveno razlikovali od naših, saj velja hitosan za netoksičen in biokompatibilen polimer.

5 SKLEP

V prvem delu diplomske naloge smo izdelali nanodelce iz treh vrst hitosana (hitosanijev klorid Protasan, hitosanijev hidroklorid in nizkomolekularni hitosan) in heparina z metodo polielektrolitnega kompleksiranja. Masna razmerja heparin/hitosan so bila 1:0,5, 1:0,75, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 in 1:5. Prišli smo do sledečih zaključkov.

- Uporabljeni hitosani se med seboj razlikujejo v gostoti naboja, ki vpliva na končne lastnosti disperzij nanodelcev. Največjo gostoto kationskega naboja ima nizkomolekularni hitosan, sledita mu hitosanijev hidroklorid in hitosanijev klorid Protasan z najmanjšo gostoto naboja.
- Z naraščanjem masnega razmerja heparin/hitosan v prid hitosana je velikost nastalih nanodelcev pri vseh treh hitosanih naraščala.
- Povprečna velikost nanodelcev je bila največja pri hitosanijevem kloridu Protasan (320-620 nm), podobno velikost delcev so imele disperzije z nizkomolekularnim hitosanom (319-500 nm), najmanjše delce pa smo dobili s hitosanijevim hidrokloridom (122-152 nm).
- Tudi polidisperzni indeksi so bili v primeru disperzij nanodelcev iz hitosanijevega hidroklorida najnižji, to je $< 0,3$; kar pomeni ozko porazdelitev velikosti delcev. Pri ostalih dveh hitosanih pa je bil pri vseh razmerjih PDI $> 0,3$, kar kaže na heterogenost sistema.
- Pri vseh treh hitosanih je zeta potencial nanodelcev naraščal z naraščanjem deleža hitosana v masnem razmerjem heparin/hitosan. ZP je bil pri vseh masnih razmerjih pozitiven, razen v primeru ND iz hitosanijevega klorida Protasan pri masnem razmerju 1:0,5 in 1:0,75 in hitosanijevega hidroklorida pri masnem razmerju 1:0,5. Pri uporabi nizkomolekularnega hitosana smo zaradi najvišje gostote kationskega naboja pri vseh masnih razmerjih dobili pozitiven ZP.
- Tudi gostota kationskega naboja nanodelcev disperzij narašča z naraščajočim deležem hitosana. Anionski naboj nanodelcev smo dobili le pri uporabi hitosanijevega klorida Protasan pri masnem razmerju 1:0,5 in 1:0,75 ter v primeru hitosanijevega hidroklorida pri masnem razmerju 1:0,5.
- Na osnovi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da so pri masnih razmerjih s pozitivnim ZP nanodelci nosilci kationskega naboja, v primeru negativnega ZP pa anionskega naboja.

- Višja kot je gostota kationskega naboja hitosana, višja je tudi gostota naboja nastalega PEK. PEK iz heparina in nizkomolekularnega hitosana imajo pri enakih masnih razmerjih višje gostote kationskega naboja kot PEK iz ostalih dveh hitosanov.
- Disperzije nanodelcev z masnim razmerjem heparin/hitosan 1:2 so fizikalno stabilne v kislem ne glede na vrsto hitosana. Izoelektrično točko smo pri ND iz heparina in hitosanijevega klorida Protasan dosegli pri pH 6,88, pri uporabi hitosanijevega hidroklorida pri 7,57 in pri nizkomolekularnem hitosanu pri pH 7,45.
- Kot optimalno masno razmerje smo v primeru hitosanijevega klorida Protasan in hitosanijevega hidroklorida izbrali razmerje 1:1, v primeru nizkomolekularnega hitosana pa 1:0,75. Pri teh masnih razmerjih smo dobili najmanjšo povprečno velikost delcev, najnižji PDI in ZP nad 30 mV, kar kaže na fizikalno stabilnost izbranih disperzij. Pri omenjenih razmerjih smo izmerili tudi kationski površinski naboj PEK.
- Disperzije ND iz heparina in treh različnih hitosanov z masnim razmerjem 1:1 so v obdobju 14 dni fizikalno stabilne, saj se velikost delcev in ZP v tem času nista bistveno spremenila.
- Z naraščajočo koncentracijo polimerov (heparina in hitosana) v disperziji povprečna velikost nanodelcev narašča, medtem ko se vrednosti ZP bistveno ne spreminjajo. Pri ND iz nizkomolekularnega hitosana je vpliv na velikost delcev bistveno bolj izrazit kot pri hitosanijevem hidrokloridu.
- Predpriprava raztopine hitosana v primeru dobro topnega hitosanijevega hidroklorida ni potrebna, saj z njo po nepotrebnem izgubljammo hitosan in podaljšamo čas priprave raztopine.

V drugem delu diplomske naloge smo pri izdelavi ND iz nizkomolekularnega hitosana in heparina uporabili tudi TPP v vlogi anionskega premreževalca. Prišli smo do naslednjih ugotovitev.

- Pri vseh masnih razmerjih heparin/hitosan smo z dodanim TPP dobili manjše povprečne velikosti nastalih nanodelcev. Povprečna velikost delcev tudi v primeru dodanega TPP narašča z naraščanjem deleža hitosana v masnem razmerju heparin/nizkomolekularni hitosan.

- Vrednosti ZP in gostote naboja so nižje zaradi anionskega karakterja TPP.
- Dodatek TPP zmanjša pH območje, pri katerem je disperzija ND z masnim razmerjem heparin/nizkomolekularni hitosan 1:2 fizikalno stabilna.

V zadnjem delu smo preverjali potencialno citotoksičnost izbranih disperzij nanodelcev na modelnih celicah keratinocitih.

- Po dodatku disperzij nanodelcev k celičnemu mediju pride do interakcije med pozitivno nabitimi ND in negativno nabitimi proteini celičnega medija.
- Pri izbranih koncentracijah disperzije ND za keratinocyte niso citotoksične, saj je bilo njihovo preživetje tudi po 24-urni izpostavitvi ~ 100%.

6 LITERATURA

1. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 210-247.
2. Hans M L, Lowman A M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2002; 6: 319-327.
3. Obermajer N, Kos J, Kristl J. Nanodelci: sodobni dostavni sistemi za učinkovine in antigene celicam imunskega sistema. *Farm. Vestn* 2007; 58: 39-44.
4. Gaumet M, Vargas A, Gurny R et al. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69: 1-9.
5. Malvern Instruments Ltd. Size theory. *Zetasizer Nano User Manual*. MANO317; 2008: 14-1 do 14-6.
6. Vaje iz fizikalne kemije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2004.
7. Alfred M: *Physical Pharmacy: Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences* 4th Edition, Lipincott Williams & Wilkins, USA, 1993: 387-388, 405-408.
8. Malvern Instruments Ltd. Zeta Potential theory. *Zetasizer Nano User Manual*. MANO317; 2008: 16-1 do 16-11.
9. http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm, dostopano: septembar 2011.
10. Grundlagen und Definitionen zu PCD-Messungen, BTG Müttek GmbH, Nemčija.
11. <http://www.noviprofibre-fr.com/documentation/X201282.pdf>, dostopano: september 2011.
12. Peniche C, Arguelles-Monal W, Goycoolea F M. Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* 2008; 517-542.
13. Kerec Kos M: Uporaba hitosana v farmaciji. *Farm. vestnik* 2006; 57: 287-291.
14. Dodane V, Vilivalam V D. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT* 1998; 1: 246-253.
15. Rang H P, Dale M M, Ritter J M et al. *Pharmacology*. Churchill Livingstone, Sixth edition, Edinburgh, 331-345.
16. <http://www.zdravila.net> (Heparin Krka 5.000 i.e./1 ml raztopina za injiciranje, SPC); dostopano: julij 2011.

17. <http://en.wikipedia.org/wiki/Heparin>, dostopano: julij 2011.
18. <http://www.zdravila.net> (Marevan, 5 mg tablete, SPC); dostopano: julij 2011.
19. Sun W, Mao S, Wang Y et al. Bioadhesion and oral absorption of enoxaparin nanocomplexes. *Int J Pharm* 2010; 386: 275-281.
20. Koetz J, Kosmella S. *Polyelectrolytes and Nanoparticles*. Springer Laboratory, Berlin, Nemčija, 2007; 5-46.
21. Hamman J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar Drugs* 2010; 8:1305-1322.
22. Sun W, Mao S, Mei D, et al. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan and enoxaparin. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69: 417-425.
23. Lin Y H, Chang C H, Wu Y S, et al. Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-Helicobacter pylori therapy. *Biomaterials* 2009; 30: 3332-3342.
24. Yang T, Hussain A, Bai S, et al. Positively charged polyethylenimines enhance nasal absorption of the negatively charged drug, low molecular weight heparin. *J Control Release* 2006; 115: 289-297.
25. http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2005/AAPS2005-003030.pdf, dostopano: september 2011.
26. Boonsongrit Y, Mitrevej A, Mueller B W. Chitosan drug binding by ionic interaction. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 62: 267-274.
27. Promega Technical Bulletin. CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Instructions for use of products G3580, G3581 and G3582, ZDA, 2009.
28. Določevanje gostote naboja, Interni postopek Melamin d.d. Kočevje, 2009.
29. Lopez-Leon T, Carvalho E L S, Seijo B et al. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J Colloid Interf Sci* 2005; 283: 344-351.
30. Kraeber & Co GmbH. Certificate of analysis, Chitosan Hydrochloride, Nemčija, marec 2011.
31. Mei-Chin C, Hen-Sheng W, Kun-Ju L, e tal. The characteristics, biodistribution and bioavailability of chitosan-based nanoparticulate system for the oral delivery og heparin. *Biomaterials* 2009; 30: 6629-6637.

32. Csaba N, Koping-Hoggard M, Jose Alonso M. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *Int J Pharm* 2009; 382: 205-214.
33. Hoven P V, Tangpasuthadol V, Angkitpaiboon Y, e tal. Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. *Carbohydr Polym* 2007, 68: 44-53.