

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA LAMBERGAR

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA LAMBERGAR

**VGRADNJA HITOSANSKIH NANODELCEV S HEPARINOM V
TERMOREVERZIBILNI HIDROGEL**

**INCORPORATION OF CHITOSAN/HEPARIN NANOPARTICLES IN
THERMOREVERSIBLE HYDROGEL**

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 somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja, mag. farm.

Zahvala

Iskrena hvala mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar in somentorju asist. dr. Juriju Trontlju za vso pomoč, strokovne nasvete in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi gospe Tatjani Hrovatič, tehnični sodelavki na Fakulteti za farmacijo, za pomoč pri delu v laboratoriju.

Predvsem pa se želim zahvaliti staršem, sestri Ani in mojemu Juretu, ki so me v času študija vedno podpirali, spodbujali in verjeli vame.

Nenazadnje se zahvaljujem vsem prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja, mag. farm.

Ljubljana, april 2011

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

Član diplomske komisije: doc. dr. Simon Žakelj, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD	1
1.1 NANODELCI	1
1.1.1 FIZIKALNO VREDNOTENJE NANODELCEV	2
1.2 POLIELEKTROLITNI KOMPLEKSI	3
1.2.1 HITOSAN.....	4
1.2.2 POLIELEKTROLITNI NANOKOMPLEKSI IZ HITOSANA IN HEPARINA.....	5
1.3 ANTIKOAGULANTI	6
1.3.1 INTRAVENSKI ANTIKOAGULANTI	6
1.3.2 PERORALNI ANTIKOAGULANTI.....	8
1.4 PARENTERALNA APLIKACIJA ZDRAVIL	8
1.4.1 PODKOŽNA APLIKACIJA ZDRAVIL.....	9
1.5 HIDROGELI	9
1.5.1 TERMOREVERZIBILNI HIDROGELI	10
1.6 REOLOGIJA	15
2. NAMEN DELA	16
3. EKSPERIMENTALNO DELO	17
3.1 MATERIALI	17

3.2 NAPRAVE	18
3.3 POSTOPKI IN METODE	19
3.3.1 IZDELAVA NANODELCEV	19
3.3.2 FIZIKALNO VREDNOTENJE NANODELCEV	20
3.3.3 IZDELAVA TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV	22
3.3.4 VREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV	24
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1 VREDNOTENJE FIZIKALNIH LASTNOSTI HITOSANSKIH NANODELCEV S HEPARINOM	27
4.2 VREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV	31
4.2.1 TEMPERATURA GELIRANJA TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV	31
4.2.2 VISKOZNOST TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV	37
4.2.3 HITROST RAZTAPLJANJA TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV	42
4.3 ANALITIKA HEPARINA	48
5. SKLEP	60
6. LITERATURA	63

POVZETEK

Nanodelci so med številnimi znanimi dostavnimi sistemi nanometrskih velikosti izredno privlačni dostavni sistemi, saj imajo izvrstno zmogljivost vgradnje učinkovin, izboljšajo njihovo topnost, omogočajo kontrolirano sproščanje učinkovin kot tudi zaščito pred njihovo razgradnjo. V prvem delu diplomske naloge smo z metodo polielektrolitnega kompleksiranja izdelali hitosanske nanodelce s heparinom z različnimi masnimi razmerji. Ta metoda ni agresivna in je primerna za občutljive biomolekule. Nanodelcem smo določili fizikalne lastnosti: povprečni premer, zeta potencial in polidisperzni indeks. Da bi ugotovili, ali so disperzije nanodelcev stabilne skozi daljše obdobje, smo meritve izvedli 1. dan, 2. dan, 7. dan in 14. dan od priprave nanodelcev. Rezultati diplomske naloge kažejo, da nam je uspelo izdelati nanodelce, ki so fizikalno stabilni v obdobju dveh tednov. Nanodelci so imeli povprečni premer 150-210 nm, polidisperzni indeks med 0,20-0,25 in zeta potencial med -35 do 45 mV. Ugotovili smo, da so masna razmerja med posameznimi sestavinami nanodelcev pomembna, saj vplivajo na velikost in zeta potencial delcev ter s tem na fizikalno stabilnost disperzij. V drugem delu diplomske naloge smo izdelali termoreverzibilne hidrogelne iz poloksamera 407 in kombinacije poloksamerov 407 in 188 za podkožno aplikacijo. Termoreverzibilni hidrogeli iz poloksamerov so pri nizki temperaturi (4-5 °C) v tekočem agregatnem stanju, pri sobni ali telesni temperaturi (odvisno od koncentracije uporabljenega poloksamera) pa tvorijo gel. Zaradi te njihove zanimive lastnosti (termoreverzibilnega geliranja) se jih dandanes veliko uporablja kot dostavne sisteme za kontrolirano sproščanje zdravilnih učinkovin. Kot medij za izdelavo hidrogelov smo uporabili prečiščeno vodo, izotonični fosfatni pufer (PBS), raztopine heparina in hitosana oziroma disperzije nanodelcev. Hidrogelom smo določili temperaturo geliranja, viskoznost in hitrost raztapljanja. Ugotovili smo, da PBS, disperzije nanodelcev ter raztopine heparina in hitosana znižajo temperaturo geliranja in povečajo viskoznost gelov v primerjavi z vodo. Višje koncentracije poloksamera 407 znižajo temperaturo geliranja in upočasnijo raztapljanje gela zaradi povečane viskoznosti in rigidnosti gelske strukture. Dodatek poloksamera 188 k poloksameru 407 poviša temperaturo geliranja, najverjetneje zaradi nastanka mešanih micelov. Prišli smo do spoznanja, da lahko z izbiro ustreznega medija, koncentracije in vrste poloksamera vplivamo na temperaturo geliranja, viskoznost in hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov.

ABSTRACT

Nanoparticles are among the many well-known nanometer size delivery systems very attractive delivery systems, because they provide excellent incorporation capacity of drugs, improve their solubility, enable controlled drug release as well as protect against their degradation. In the first part of thesis chitosan/heparin nanoparticles with different weight ratios have been prepared by polyelectrolyte complexation. This method is not aggressive and is suitable for sensitive biomolecules. Physical characteristics of nanoparticles were determined: average diameter, zeta potential and polydispersity index. To determine whether the dispersions of nanoparticles are stable over a long period, measurements were performed 1. day, 2. day, 7. day and 14. day from preparation of nanoparticles. The results of this thesis show that nanoparticles, which are physically stable for a period of two weeks, were able to be produced. Nanoparticles had an average diameter of 150-210 nm, polydispersity index between 0,20 to 0,25 and zeta potential between -35 to 45 mV. It was found that the mass ratios between the individual components of nanoparticles are important, as the size and zeta potential of particles and thus the physical stability of dispersions are affected by them. In the second part of thesis thermoreversible hydrogels from poloxamer 407 and combination of poloxamers 407 and 188 for subcutaneous administration were made. Thermoreversible hydrogels from poloxamers are liquid at low temperatures (4-5 °C), but gel upon warming to room or body temperature (depending on the concentration of poloxamer). Because of their interesting characteristics of reverse thermal gelation, are nowadays widely used as delivery systems for controlled release of active substances. As a medium for making hydrogels purified water, phosphate buffered saline (PBS), solution of heparin and chitosan or the dispersion of nanoparticles were used. Gelation temperature, viscosity and dissolution rate of hydrogels were determined. It was found that the gelation temperature is lowered and that the viscosity of gels is increased by the PBS, the dispersion of nanoparticles and solution of heparin and chitosan compared with water. Higher concentrations of poloxamer 407 lower the gelation temperature and slow dissolution of the gel due to increased viscosity and rigidity of the gel structure. Addition of poloxamer 188 to poloxamer 407 increased gelation temperature, probably due to the formation of mixed micelles. It was also realized that gelation temperature, viscosity and dissolution rate of thermoreversible hydrogels can be influenced by choosing the appropriate medium, concentration and type of poloxamer.

SEZNAM OKRAJŠAV

- AT III – antitrombin III
- CGC – kritična gelska koncentracija
- CMC – kritična micelna koncentracija
- CMT – kritična micelna temperatura
- d – povprečni premer delca
- DLS – dinamično sipanje svetlobe
- HPLC – high performance liquid chromatography – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
- LC/MS – liquid chromatography/mass spectrometry – tekočinska kromatografija/masna spektrometrija
- LDV – lasersko Dopplerjevo merjenje hitrosti
- ND – nanodelci
- P407 – poloksamer 407
- P188 – poloksamer 188
- PAS – površinsko aktivna snov
- PBS – phosphate buffered saline – izotonični fosfatni pufer
- PCS – fotonska korelacijska spektroskopija
- PEK – polielektrolitni kompleksi
- PI – polidisperzni indeks
- POE – polioksietilen
- POP – polioksipropilen
- tr – retencijski čas
- ZP – zeta potencial

1. UVOD

1.1 NANODELCI

Nanodelci so med številnimi znanimi dostavnimi sistemi nanometrskih velikosti izredno privlačni dostavni sistemi. Njihova prednost pred mikro ali makro sistemi je njihova nanometrski velikost, ki omogoča drugačne interakcije z biološkim okoljem.

Nanodelci so trdni delci velikosti od 1 do 1000 nm. Ogradje nanodelcev je sestavljeno iz fiziološko sprejemljivih polimernih makromolekul, ki omogočajo nastanek polimernih nanodelcev ali iz trdih lipidov, iz katerih pripravimo trdne lipidne nanodelce.

Glede na strukturo nosilnega ogradja jih delimo na nanosfere in nanokapsule. Nanosfere imajo dispergirano ali raztopljeno učinkovino po celotnem nosilnem ogradju, medtem ko nanokapsule predstavljajo filmsko obliko nanodelcev s polimerno oblogo kot lupino znotraj katere je rezervoar učinkovine. Učinkovine, ki jih vgrajujemo v nanodelce so lahko v različnem agregatnem stanju, v ogradju pa so lahko raztopljene, suspendirane ali adsorbirane. Uspešnost vgradnje učinkovin v nanodelce je odvisna od molekulske mase in kemične sestave polimera in interakcij učinkovina-polimer. Nanodelci imajo izvrstno zmogljivost vgradnje učinkovin, izboljšajo njihovo topnost, omogočajo kontrolirano sproščanje učinkovin kot tudi zaščito pred njihovo razgradnjo, vplivajo na porazdeljevanje učinkovin v organizmu, jih usmerijo do željenih celic in tkiv ali na znotrajcelična tarčna mesta. Nanosistemi so v primerjavi z mikro ali makro sistemi prodornejši, potujejo globlje v tkiva, prehajajo skozi epitelij ali vstopajo v celice (1, 2).

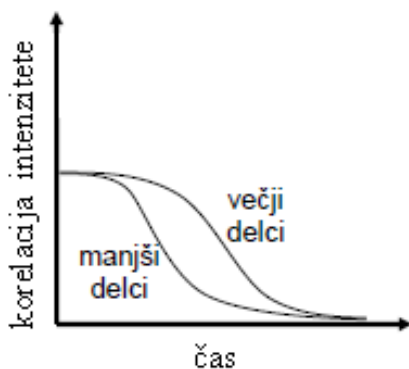
Poznamo različne metode izdelave polimernih nanodelcev: prečno premreženje makromolekul, polimerizacija monomernih enot, obarjanje polimerov. Večina naštetih metod zahteva ostre pogoje za njihovo izdelavo (uporaba organskih topil, agresivno mešanje, močno segrevanje), ki so lahko potencialno škodljivi za občutljive biomolekule (1).

Tem ostrim pogojem izdelave se lahko izognemo z uporabo milejših metod, kot je samoasociiranje polimerov v polielektrolitne komplekse (PEK).

1.1.1 FIZIKALNO VREDNOTENJE NANODELCEV

Velikost delcev

Dinamično sipanje laserske svetlobe (DLS) ali fotonska korelacijska spektroskopija (PCS) je metoda, s katero merimo velikost delcev v območju od 1 - 1000 nm. Delci, dispergirani v tekočini, niso nikoli stacionarni, ampak so zaradi naključnih trkov z molekulami topila stalno podvrženi takoimenovanemu Brownovemu gibanju. Zetasizer Nano meri stopnjo nihanja intenzitete sipane svetlobe in na podlagi teh meritev izračuna velikost delcev. Pomembno dejstvo za DSL je, da se večji delci gibljejo počasneje kot majhni, zato je hitrost nihanja intenzitete sipane svetlobe pri večjih delcih manjša. Korelacijska funkcija torej pri manjših delcih hitreje pada s časom (slika 1) (3).



Slika 1: Korelacijska funkcija za večje in manjše delce (4).

Zeta potencial

Zeta potencial je razlika v potencialu med mejno plastjo in notranjostjo raztopine. Metoda, s katero merimo zeta potencial, se imenuje lasersko Dopplerjevo merjenje hitrosti (LDV). Zetasizer Nano izračuna zeta potencial delcev na podlagi elektroforezne gibljivosti z uporabo Henryjeve enačbe. Izbranemu vzorcu določimo hitrost gibanja delcev v električnem polju z merjenjem Dopplerjeve spremembe frekvence laserske svetlobe, ki jo sipajo ti gibajoči se delci. Hitrost delcev v električnem polju je odvisna od moči električnega polja, dielektrične konstante in viskoznosti medija ter zeta potenciala. Če raztopino elektrolita postavimo v električno polje, bodo nabiti delci potovali k nasprotno nabiti elektrodi. Viskozne sile na delec bodo nasprotovale temu gibanju. Ko pa bo

doseženo ravnotežje med tema nasprotujočima se silama, bo delec potoval s konstantno hitrostjo.

Vrednost zeta potenciala nam podaja informacijo o fizikalni stabilnosti koloidnih raztopin. Če imajo vsi delci v disperziji močno negativen ali močno pozitiven zeta potencial, se bodo med seboj odbijali in ne bodo težili k flokulaciji. Če pa imajo delci nizke absolutne vrednosti zeta potenciala, ni prisotne sile, ki bi jim preprečila združevanje in posledično pride do flokulacije. Za disperzije, katerih delci imajo zeta potencial bolj pozitiven od +30 mV oziroma bolj negativen od -30 mV pravimo, da so fizikalno stabilne. Znotraj teh meja zeta potenciala se delci odbijajo drug od drugega, kar omogoča stabilnost disperzije. Kadar pa je zeta potencial blizu vrednosti 0 mV, možnost agregacije delcev narašča, ker se delci med seboj ne odbijajo. Najpomembnejši faktor, ki vpliva na vrednost zeta potenciala je pH. Pri nižjih vrednostih pH so delci bolj pozitivno nabiti, pri višjih vrednostih pa imajo bolj negativen naboj. Koloidni sistem je fizikalno najmanj stabilen pri tisti vrednosti pH, kjer je zeta potencial 0 (5).

1.2 POLIELEKTROLITNI KOMPLEKSI

Nasprotno nabiti polielektroliti v vodnih raztopinah spontano interagirajo in ob mešanju tvorijo polielektrolitne komplekse (PEK). Pri tem pride do tvorbe močnih, vendar reverzibilnih elektrostatičnih vezi. Nastanek in stabilnost PEK je odvisen od številnih dejavnikov kot so: stopnja ionizacije posameznega polielektrolita, gostota naboja, porazdelitev naboja po polimernih verigah, koncentracija in razmerje med polielektrolitoma, trajanje interakcije med polielektrolitoma, narava ionskih skupin, položaj ionskih skupin na polimernih verigah, molekulska masa polielektrolitov, fleksibilnost polimernih verig, kot tudi temperatura, ionska moč in pH disperznega medija (6).

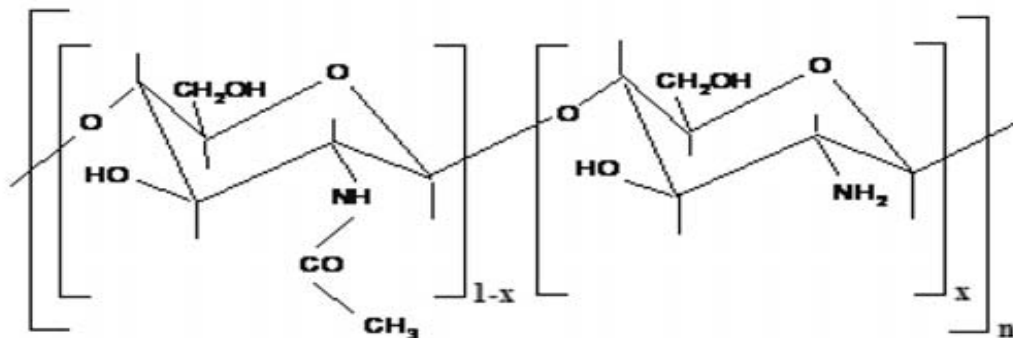
Poznamo dve vrsti PEK:

- Stehiometrični PEK vsebujejo enako količino nasprotno nabitih nabojev (neto naboj je nič). Ponavadi so netopni ali pa se med procesom izdelave oborijo.

- Nestehiometrični PEK nastanejo kadar mešamo polielektrolite v takšnem razmerju, da imamo presežek enega od nabojev (pozitivnega ali negativnega). So večinoma vodotopni (6).

1.2.1 HITOSAN

Hitosan je bioadheziven, biokompatibilen in biorazgradljiv kationski polimer. Kemijsko je kopolimer $\beta(1-4)$ povezanih enot glukozamina in N-acetilglukozamina (slika 2). Pridobivamo ga z delnim deacetiliranjem polimera hitina, ki ga najdemo v oklepkih rakov ter pri nekaterih insektih in gobah. Ker je hitin v vodnih raztopinah zelo slabo topen, je za industrijsko uporabo bolj primeren hitosan. Vendar je tudi hitosan topen le v kislih raztopinah, pri alkalnem in nevtralnem pH pa je netopen. Z določenimi kislinami tvori soli (glutaminsko, klorovodikovo, mlečno, očetno kislino). Viskoznost disperzij hitosana narašča z večanjem koncentracije hitosana, z nižanjem temperature in z večanjem stopnje deacetiliranja. Hitosan ima tudi majhno peroralno toksičnost, ki pa je odvisna od stopnje deacetiliranja, molekulske mase in čistosti hitosana. Za humano uporabo se priporoča hitosan najvišje stopnje čistosti. Hitosan izkazuje dobre bioadhezivne lastnosti, povečuje permeabilnost sluznice na mestu absorpcije in prav zaradi tega se pogosto uporablja v razvoju novih dostavnih sistemov. Dobre bioadhezivne lastnosti so predvsem posledica tvorbe vodikovih in ionskih vezi med pozitivno nabitimi amino skupinami polimera ter negativno nabito sialično kislino, prisotno v glikoproteinih na površini sluznice. V dostavnih sistemih mikro in nanometrskih velikosti hitosan s kombinacijo bioadhezije podaljšuje čas zadrževanja učinkovine na mestu adhezije, omogoča tesnejši stik farmacevtske oblike s sluznico, skozi katero se učinkovina absorbira in s pospeševanjem absorpcije povečuje biološko uporabnost vgrajenih učinkovin. V dostavne sisteme, ki jih lahko apliciramo parenteralno ali na različne sluznice, lahko vgrajujemo polarne učinkovine, proteine, antigene in DNK fragmente. Hitosan uporabljamo tudi za zniževanje telesne teže, zniževal naj bi krvno koncentracijo holesterola in trigliceridov, pospeševal naj bi celjenje ran in deloval protimikrobno (7).



Slika 2: Strukturna formula hitosana (7).

(n = število sladkornih enot polimera, x = stopnja deacetilacije)

1.2.2 POLIELEKTROLITNI NANOKOMPLEKSI IZ HITOSANA IN HEPARINA

Yu-Hsin Lin in sodelavci so razvili pH - odzivne nanodelce iz hitosana in heparina za zdravljenje okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori*.

Pripravili so nanodelce iz hitosana in heparina v različnih masnih razmerjih (1,5:1,0; 3,0:1,0; 4,5:1,0; 6,0:1,0). Metoda izdelave nanodelcev je bila spontano združevanje hitosana in heparina preko ionskih interakcij. Ugotovili so, da so se pri vseh masnih razmerjih hitosana in heparina, razen pri masnem razmerju 1,5:1, tvorili kompleksi nanometrskih velikosti z pozitivnim zeta potencialom. Pri masnem razmerju 1,5:1 je bilo razmerje pozitivnih in negativnih nabojev med hitosanom in heparinom 1:1 (celokupni naboj nič), zato je prišlo do obarjanja delcev. Največji nanodelci (300 nm) so nastali pri masnem razmerju 6:1, najmanjši (130 nm) pa pri masnem razmerju 1:1. Dobljeni rezultati raziskave kažejo, da sta stabilnost koloidnega sistema in velikost delcev odvisni od celokupnega naboja na površini delcev ter da so za stabilnost koloidnega sistema odgovorne elektrostatske interakcije med negativno nabitimi skupinami heparina in pozitivno nabitimi skupinami hitosana. Proučevali so tudi stabilnost nanodelcev z masnim razmerjem hitosan:heparin 3:1 pri različnih pH (1,2-2,5; 4,5-6,5; 7). Heparin v svoji strukturi vsebuje tri vrste kislih funkcionalnih skupin: sulfatne monoestre in sulfamidne skupine, ki so zelo kisle (pKa vrednost 0,5 do 1,5), medtem ko so karboksilne skupine manj kisle (pKa vrednost med 2 in 4). Vrednost pKa hitosana je okoli 6,5. Pri pH 4,5-6,5 (simulacija pH želodčne sluznice) sta hitosan in heparin ionizirana in zato lahko tvorita

polielektrolitne komplekse preko elektostatskih interakcij. Nanodelci so bili veliki 130-160 nm. Pri pH 1,2-2,5 (simulacija pH želodčne kisline) so nekatere karboksilne skupine heparina protonirane, zato so bile elektrostatske interakcije med hitosanom in heparinom šibkejše v primerjavi s tistimi pri pH 4,5-6,5 in posledično so nastali relativno večji nanodelci (160-190 nm). Pri pH 7 so bili nanodelci nestabilni in so razpadli, ker je hitosan pri tej vrednosti pH neioniziran. Rezultati so potrdili, da ima pH velik vpliv na stabilnost koloidnega sistema. Z raziskavo so ugotovili, da je učinkovina (antibiotik) v nanodelcih zaščitena pred razgradnjo z želodčno kislino, saj so bili nanodelci stabilni pri pH 1,2-2,5 (8).

1.3 ANTIKOAGULANTI

Antikoagulanti so ključni za zdravljenje in preprečevanje različnih trombemboličnih zapletov. Pretežno se uporablja le dve skupini antikoagulacijskih zdravil: standardne in nizkomolekularne heparine in zaviralce vitamina K (9).

1.3.1 INTRAVENSKI ANTIKOAGULANTI

Heparin

Heparin preprečuje nastajanje krvnih strdkov, njihovo rast, širjenje ter posledično zamašitev žil. Uporabljamo ga lahko tako v preventivne kot terapevtske namene. V preventivne namene ga uporabljamo, ko želimo z zaviranjem koagulacije krvi preprečiti nastanek trombov znotraj žilnega sistema, v terapevtske namene pa, ko preprečujemo nadaljnjo rast že nastalega tromba in embolizacijo. Za medicinsko uporabo ga pridobivajo iz govejih pljuč ter iz črevesne sluznice goveda, svinje ali ovce. Pomanjkljivost standardnega heparina je nepredvidljiv antikoagulacijski učinek zaradi vezave na plazemske proteine (9, 10).

Mehanizem delovanja

Heparin je parenteralni antikoagulant, katalitični kofaktor antitrombina III (AT III). Sestavljen je iz heterogene mešanice sulfatnih estrov mukopolisaharidov

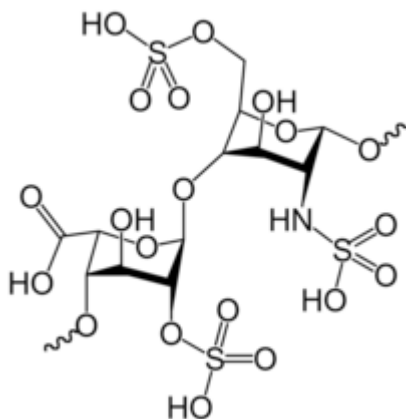
(glikozaminoglikanov). Na molekulo AT III se veže na specifičnem vezalnem mestu (zaporedju pentasaharidov), ki je odgovorno za skorajda celotni antikoagulacijski učinek heparina. Ker aktivira AT III, močno pospeši vezavo AT III na koagulacijske faktorje IIa, IXa, Xa, XIa, XIIa in jih inaktivira. (9, 10).

Farmakokinetika

Zaradi velikosti in ionskega značaja se ne absorbira iz gastrointestinalnega trakta, zato je možna le parenteralna aplikacija (intravenska ali subkutana). Heparin ni namenjen intramuskularnemu dajanju, ker pride do nastanka hematoma. Presnavlja se v jetrih. Povprečna razpolovna doba heparina je 40-90 minut (9).

Neželeni učinki

Zdravljenje s heparinom lahko povzroči trombocitopenijo, zato je priporočeno preverjanje števila trombocitov pred začetkom zdravljenja in vsak drugi ali tretji dan zdravljenja (9, 10).



Slika 3: Strukturna formula heparina (11).

Nizkomolekularni heparini

Osnovni princip delovanja nizkomolekularnih heparinov je enak kot pri standardnem heparinu, saj oba zavirata koagulacijo s svojim vplivom na AT III. Razlika je v tem, da nizkomolekularni heparini delujejo zaviralno predvsem na faktor Xa, medtem ko je njihov vpliv na trombin bistveno manjši, kot to velja za standardni heparin. Njihove prednosti pred standardnim heparinom so: predvidljiv antikoagulacijski učinek, ki je sorazmeren z odmerkom prilagojenim telesni teži bolnika, manjša vezava na plazemske beljakovine, daljša razpolovna doba (9).

1.3.2 PERORALNI ANTIKOAGULANTI

Zaviralci vitamina K

Zaviralci vitamina K (varfarin, acenokumarol) imajo ozko terapevtsko okno, poleg tega pa vstopajo v številne interakcije z zdravili in hrano. Ob zdravljenju so potrebne redne laboratorijske kontrole ter prilagajanje odmerkov, da bi zagotovili zadostno antitrombotično učinkovitost in zmanjšali možnost zapletov, predvsem krvavitev (9).

Mehanizem delovanja

Zaviralci vitamina K so kompetitivni inhibitorji vitamin K epoksid reduktaze. Vitamin K epoksid reduktaza pretvarja neaktivno obliko vitamina K v aktivno (reducirano obliko), ki sodeluje kot kofaktor v procesu gama karboksilacije faktorjev strjevanja krvi (II, VII, IX, X) v jetrih. Ob prisotnosti zaviralcev vitamina K je na voljo manj reducirane oblike vitamina K, zaradi česar je karboksilacija zavrtta, aktivnost tako nastalih faktorjev strjevanja krvi pa je zmanjšana (12).

Farmakokinetika

Zaradi dobre absorpcije iz GIT se uporabljajo peroralno. Učinek zaviralcev vitamina K je dolgotrajen, vendar se pokaže šele po nekaj dneh, ko pade koncentracija faktorjev strjevanja krvi pod kritično mejo (9).

1.4 PARENTERALNA APLIKACIJA ZDRAVIL

Zaužitje zdravila skozi usta (peroralno) je najbolj fiziološki, najenostavnejši in najcenejši način dajanja zdravil za sistemsko delovanje, saj je za bolnika najmanj neprijetno in neželeni učinki na zdravilo ponavadi niso tako resni kot pri parenteralnem vnosu. Parenteralnega dajanja zdravil (vnos zdravil v telo mimo prebavnega trakta) pa se poslužujemo takrat, kadar je pot peroralno zaužitih zdravil nezanesljiva, preveč dolgotrajna, neizvedljiva, kadar bolnik ne more, ne sme ali noče zaužiti zdravila ter v primeru, ko je potreben hiter, sistemski učinek zdravila. Parenteralno dajemo zdravila v obliki injekcij – venozno, subkutano in muskularno (13).

1.4.1 PODKOŽNA APLIKACIJA ZDRAVIL

Podkožje (hipodermis) je globoka plast pod usnjico. Sestavlja ga rahlo vezivo in več ali manj maščobe, ki preprečuje oddajanje toplote in varuje globlje ležeče organe pred mehanskimi vplivi. Vsebuje bogato krvno in limfno žilje ter živce (14).

Značilnosti podkožne aplikacije zdravil:

- zdravilo se počasi vsrkava iz podkožja v krvni obtok, vendar hitreje kot pri peroralnem zaužitju
- učinek zdravila nastopi po 15 do 30 minutah
- primerno je za počasno, dlje trajajočo enakomerno resorbcijo zdravila
- ker je vbrizgavanje dokaj neboleče, je primerno za pogosto uporabo
- količina enkratnega odmerka je omejena na 1 do 2 mL
- primerno je za vbrizgavanje zelo viskoznih zdravil, ki niso citotoksična ali dražeča in se dobro resorbirajo iz maščobnega in vezivnega tkiva
- ker je podkožno tkivo zaradi večje oživčenosti občutljivo, lahko vbrizgavamo le izotonične in šibko alkalne raztopine
- hipertoničnih, kislih ali močno bazičnih raztopin ne smemo vbrizgavati, ker lahko povzročimo okvaro ali celo nekrozo podkožja, saj je maščobno tkivo zelo občutljivo na pH reakcijo zdravila
- najbolj priporočeno mesto podkožnega injiciranja je predel okoli popka ali sprednji del stegen (13).

1.5 HIDROGELI

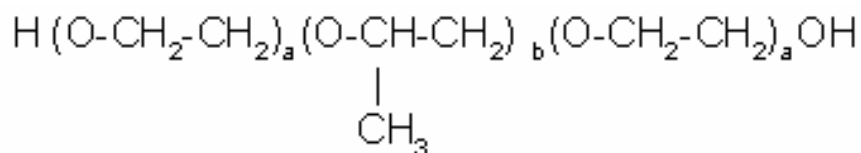
Hidrogeli so tridimenzionalne premrežene strukture, sestavljene iz hidrofilnih polimerov, ki lahko sprejmejo večje količine vode ali biološke tekočine. Za sintezo hidrogelov se uporabljajo polimeri naravnega in sinteznega izvora. Nastanek hidrogela je posledica medsebojnih fizikalnih in/ali kemijskih povezav med polimernimi verigami in polimernimi verigami in vodo. Poznamo fizikalne in kemijske hidrokele. Za fizikalne hidrokele je značilno, da se polimerne verige povežejo med seboj zaradi vodikovih vezi, hidrofobnega efekta, ionskih interakcij ali van der Waalsovih sil in se po daljšem času ob zadostni

količini medija lahko razpletejo. Kemijski hidrogeli v vodi le nabrekajo in se ne raztapljajo, saj so nastale vezi med molekulami kovalentne (15, 16).

1.5.1 TERMOREVERZIBILNI HIDROGELI

Poloksameri

Poloksameri so neionske površinsko aktivne snovi (PAS). Za to skupino PAS je značilno, da ne ionizirajo v vodnih raztopinah zaradi neionizirajoče hidrofilne skupine, ki je običajno alkohol, fenol, eter, ester ali amid. Vodne raztopine poloksamerov v dovolj visokih koncentracijah imajo zanimivo lastnost - termoreverzibilno geliranje. To pomeni, da so pri nizki temperaturi (4-5 °C) v tekočem agregatnem stanju, pri sobni ali telesni temperaturi (odvisno od koncentracije uporabljenega poloksamera) pa tvorijo gel. Po ohlajanju ponovno preidejo iz poltrdnega stanja v tekoče agregatno stanje. Prav zaradi te njihove posebne lastnosti se jih veliko uporablja v farmacevtski industriji. Ker so zelo viskozni, zagotavljajo kontrolirano sproščanje učinkovin. Strukturno so triblok kopolimeri polioksietilena-polioksipropilena. Polioksietilen prispeva k hidrofilnim, polioksipropilen pa k hidrofobnim lastnostim poloksamerov, kar jim daje površinsko aktivnost. Njihova kemična formula je prikazana na sliki 4. Vsi poloksameri so si kemijsko podobni, razlikujejo pa se v razmerju med propilen in etilenoksidnimi skupinami (17, 18).



Slika 4: Kemična formula poloksamerov (a-etilenoksidni del, b-propilenoksidni del) (17).

poloksamer 188: a = 80 b = 27 a = 80, poloksamer 407: a = 101 b = 56 a = 101

Proizvajajo jih s polimerizacijo monomerov etilenoksida in propilenoksida v prisotnosti natrijevega ali kalijevega hidroksida (19). Odlikuje jih nizka toksičnost in visoka stabilnost v bioloških sistemih. Poloksameri so sestavljeni iz belih, voskastih granul, ki so praktično brez vonja in okusa. Dobro se topijo v vodi, polarnih in nepolarnih organskih topilih. Vodne raztopine poloksamerov so stabilne v prisotnosti kislin, baz in kovinskih ionov. Razredčene vodne raztopine poloksamerov izkazujejo pretočne lastnosti newtonskih

sistemov, pri višjih koncentracijah pa je njihovo obnašanje nenewtonsko. Dandanes je komercialno dostopnih več vrst poloksamerov, ki se med seboj razlikujejo v fizikalnih in površinsko aktivnih lastnostih (17, 20).

Poloksamer 188

Poloksamer 188 ima splošno formulo E80 P27 E80 in povprečno molekulsko maso okoli 8600 g/mol. Polioksietilenski del predstavlja približno 81% molekulske mase. V tekočih peroralnih, dermalnih in parenteralnih farmacevtskih oblikah se uporablja predvsem kot emulgator, solubilizator in stabilizator. V trdnih farmacevtskih oblikah deluje kot močljivec in plastifikator ter povečuje topnost in biološko uporabnost zmerno topnih učinkovin (20, 21).

Poloksamer 407

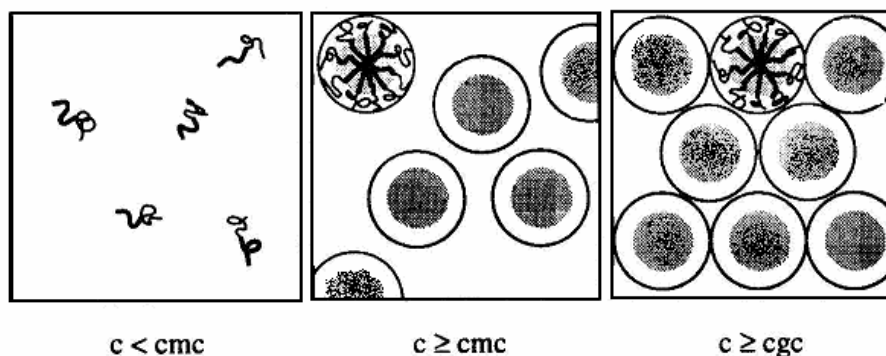
Poloksamer 407 ima splošno formulo E101 P56 E101 in povprečno molekulsko maso okoli 13000 g/mol. Vsebuje približno 70% etilenoksida, ki predstavlja njegovo hidrofilnost. Uporablja se predvsem kot zgoščevalno in gelirno sredstvo. V kremah in tekočih emulzijah ima vlogo koemulgatorja in ojačevalca konsistence. V farmacevtskih in kozmetičnih izdelkih se uporablja kot solubilizator za različne učinkovine (nifedipin in naproksen) ter eterična olja (17, 22).

Mehanizem nastanka termoreverzibilnega hidrogela

Vpliv koncentracije poloksamera

Pri nizki koncentraciji poloksamera (površinsko aktivne snovi) v vodi so molekule le-tega v monomerni obliki, ko pa je koncentracija poloksamera dovolj visoka - višja od kritične micelne koncentracije (CMC), postane situacija za molekule poloksamera energetsko ugodnejša, če se začno združevati v multimolekularne agregate (micele). Micel je sestavljen iz hidrofobnega jedra, ki ga sestavlja polipropilenski del poloksamera in hidrofilnih polietilenskih verig, ki so orientirane proti vodnemu mediju. Še pri višjih koncentracijah poloksamera - nad kritično gelsko koncentracijo (CGC), se miceli uredijo v mrežo in tvorijo gel. Osnovna gonilna sila spontanega nastanka micelov je zmanjševanje Gibbsove proste energije. Ta pogoj je dosežen ob zmanjšanju interakcij med hidrofobnimi verigami PAS in molekulami vode, ter omogočanjem stika hidrofilnih glav z molekulami

vode. Miceli se lahko tvorijo samo kadar je koncentracija PAS večja od CMC in temperatura sistema višja od kritične micelne temperature (CMT) (17).



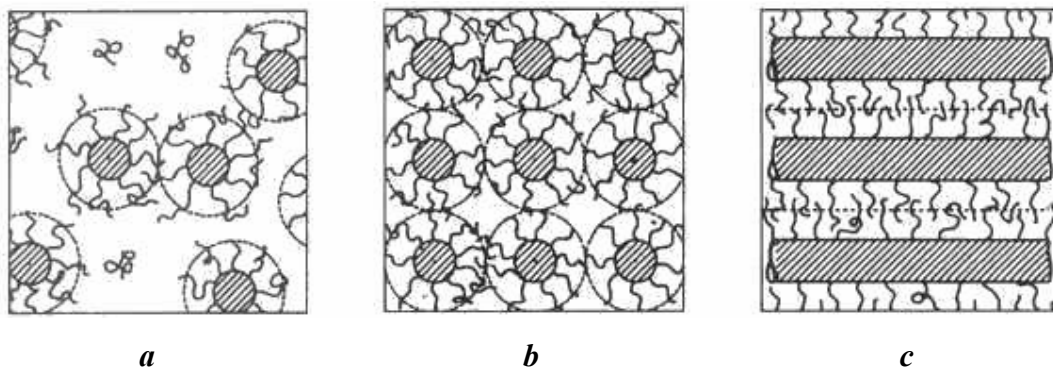
Slika 5: Prikaz kritične micelne koncentracije (cmc) in kritične gelske koncentracije (cgc) v raztopini poloksamera (17).

Vpliv temperature

Poloksameri so bolj topni v hladni kot v vroči vodi, kar je posledica povečane solvatacije (proces pri katerem molekule topila privlačijo in obdajo molekule topljenca) in tvorbe vodikovih vezi z vodnimi molekulami pri nižjih temperaturah.

Pri nizkih temperaturah v vodnih raztopinah molekule poloksamera obdaja hidratacijska plast. Z naraščanjem temperature postanejo polimerne verige dehidrirane zaradi porušanja vodikovih vezi med njimi in vodo. Zaradi tega pride do povečanega trenja in prepletanja polimernih verig in posledično do hidrofobnih povezav v polipropilenskem delu kopolimera ter do nastanka gela.

Z naraščajočo temperaturo se spreminja tudi oblika micelne faze. Pri nizkih temperaturah se tvori tekoča micelna faza, ki se z naraščajočo temperaturo preoblikuje v kubično strukturo. Še pri višjih temperaturah ima micelna faza strukturo heksagonalnih valjev (slika 6) (17).



Slika 6: Shematski prikaz tekoče (a), kubične (b) in heksagonalne (c) micelne faze, ki jih tvori poloksamer z naraščajočo temperaturo (17).

Aplikacija poloksamerov

Zaradi kompatibilnosti z najrazličnejšimi učinkovinami in pomožnimi snovmi, se poloksameri dandanes veliko uporabljajo kot dostavni sistemi za kontrolirano sproščanje zdravilnih učinkovin (18).

Intranazalna aplikacija

Majithiya in sodelavci so pripravili termoreverzibilni-mukoadhezivni gel iz termoreverzibilnega kopolimera P407 in mukoadhezivnega polimera karbopola 934P za intranazalno aplikacijo sumatriptana. Pripravili so formulacije s temperaturo geliranja nižjo od 34 °C. Temperaturo geliranja so določili vizualno in z reološkim merjenjem. Ugotovili so, da temperatura geliranja pada, ko koncentracija karbopola v formulacijah narašča (temperatura se je znižala iz 29 °C pri 18% P407 na 23,9 °C pri 18% P407 in 0,5% karbopola). Mukoadhezivna sila, ki so jo določali na sluznični membrani ovce, se je povečevala z naraščajočo koncentracijo karbopola. Prišli so do spoznanja, da in situ geliranje in mukoadhezivna formulacija sumatriptana omogočata podaljšano zadrževanje učinkovine v nosu in posledično podaljšano absorpcijo učinkovine (18).

Aplikacija v uho

Lee in sodelavci so pripravili formulacijo, ki je vsebovala vankomicin in P407. Narejena je bila za lokalno dostavo vankomicina za zdravljenje vnetja srednjega ušesa, ki ga povzroča na meticilin odporna bakterija *Staphylococcus aureus* (MRSA). Injiciranje formulacije je bilo priročno, ker je P407 pri sobni temperaturi tekoč in gelira pri telesni temperaturi. Temperaturno odzivni ogrodni sistem P407 - vankomicin je učinkovito dostavil

vankomicin v okuženo notranje uho in rast MRSE je bila preprečena. Iz študije in vivo je bilo razvidno, da je bilo vnetje srednjega ušesa z lokalno dostavo vankomicina pozdravljeno. Lee in sodelavci so na podlagi rezultatov prišli do spoznanja, da ima ta sistem potencialno klinično uporabo pri zdravljenju kroničnega vnetja srednjega ušesa, saj omogoča boljšo kompliance bolnikov in boljšo terapevtsko učinkovitost (18).

Dermalna aplikacija

Miyazaki in sodelavci so preučevali termoreverzibilne gele iz poloksamera 407 kot vehikle za perkutano aplikacijo indometacina. In vivo študije na podganah so pokazale da je 20% raztopina P407 v vodi primerna za lokalno aplikacijo učinkovine. Ugotovili so še, da dodatek izopropil miristata ali limonena formulaciji izboljša perkutano absorpcijo indometacina (18).

Rektalna aplikacija

Površinsko aktivne triblok kopolimere so preučevali kot potencialne vehikle za rektalno aplikacijo indometacina. Gel z indometacinom so pripravili tako, da so v vodi raztopili P407 in indometacin. Pripravljen gel so aplicirali zajcem v rektum. Spremljali in primerjali so plazemske koncentracije indometacina po aplikaciji komercialnih svečk v primerjavi z gelom za rektalno uporabo. Po uporabi svečk je maksimalna koncentracija učinkovine dosegla vrh po 30 minutah. Po aplikaciji gela z indometacinom ni bilo opaziti ostrega vrha plazemske koncentracije učinkovine, vendar se je le-ta počasi sproščala iz gela skozi daljše časovno obdobje (10 do 15 ur) (18).

Vaginalna aplikacija

Chang in sodelavci so pripravili mukoadhezivni-termoreverzibilni gel s klotrimazolom za zdravljenje vaginalne kandidaze. Gel so izdelali iz P407, P188 in polikarbofila. In vivo študija na podganah je pokazala, da se klotrimazol sprošča iz gela skozi daljše časovno obdobje. Prišli so do zaključka, da je mukoadhezivni-termoreverzibilni vaginalni gel s klotrimazolom učinkovit, varen in priročen (manj pogosto odmerjanje zaradi podaljšanega sproščanja učinkovine) za zdravljenje vaginalne kandidaze (18).

1.6 REOLOGIJA

Izraz REOLOGIJA izhaja iz grškega jezika in je sestavljen iz dveh besed: RHEOS, kar pomeni tok in LOGOS, kar pomeni veda. Reologija je veda, ki proučuje deformacijo in tok snovi. Pomembno mesto ima v farmaciji in kozmetiki, saj nam omogoča razjasnitev notranje strukture farmacevtskih sistemov, spremljanje fizikalne stabilnosti vhodnih materialov in farmacevtskih oblik, obnašanja snovi pod vplivom temperature (23, 24).

Reološka razdelitev sistemov

Newtonski sistemi

Zanje je značilno, da je viskoznost neodvisna od delovanja mehanske sile na sistem in njenega trajanja. Viskoznost je samo funkcija temperature in atmosferskega tlaka. Mednje uvrščamo idealne tekočine (voda, mineralna olja, raztopine topljencev z nizko molekulsko maso). Z naraščajočo temperaturo viskoznost tekočine pada zaradi povečanega Brownovega gibanja osnovnih molekul (23, 24).

Nenewtonski sistemi

Njihova viskoznost je odvisna od delovanja mehanske sile na sistem, za nekatere sisteme pa tudi od časa delovanja le-te. Nenewtonsko se v glavnem obnašajo realne kapljevine, poltrdni in trdni sistemi (23). Sisteme lahko razdelimo na časovno neodvisne in časovno odvisne. Med časovno neodvisne sisteme uvrščamo psevdoplastične, plastične in dilatantne sisteme. Viskoznost teh sistemov je odvisna le od jakosti delovanja strižne sile, ne pa tudi od časa obremenitve. Če pa se viskoznost sistema pri konstantnih strižnih pogojih spreminja tudi s časom in smerjo delovanja sile, take sisteme imenujemo časovno odvisne. Mednje uvrščamo reopeksne in tiksotropne sisteme (24).

Viskozimetri

Viskozimetri so inštrumenti za merjenje viskoznosti snovi. Viskoznost je lastnost snovi, da se pri delovanju sile upira strižni deformaciji in strižni hitrosti. Za merjenje viskoznosti snovi se uporabljajo različni viskozimetri: kapilarni, rotacijski, vibracijski, ultrazvočni, viskozimetri s padajočo kroglico (23, 24).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge bo vgraditi hitosanske nanodelce s heparinom v termoreverzibilni hidrogel iz poloksamera za podkožno injiciranje.

V prvem delu diplomske naloge bomo z metodo samoasociiranja nasprotno nabitih polimerov izdelali hitosanske nanodelce s heparinom v različnih masnih razmerjih. Disperzijo nanodelcev bomo pripravili tako, da bomo v raztopino hitosana ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu z avtomatsko pipeto dodajali raztopino heparina. Izdelanim nanodelcem bomo s pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS določili fizikalne lastnosti: povprečni premer, zeta potencial in polidisperzni indeks. Da bi ugotovili, ali so pripravljene disperzije nanodelcev stabilne skozi daljše obdobje, bomo meritve izvedli 1. dan, 2. dan, 7. dan in 14. dan od priprave nanodelcev.

V drugem delu naloge bomo izdelali termoreverzibilne hidrogelne iz poloksamera 407 in kombinacije poloksamerov 407 in 188. Kot medij, za izdelavo hidrogelov, bomo uporabili prečiščeno vodo, izotonični fosfatni pufer (PBS), raztopine heparina in hitosana ter disperzije nanodelcev. Termoreverzibilne hidrogelne bomo pripravili tako, da bomo v različne medije dodajali različne koncentracije poloksamera 407 in kombinacije poloksamerov 407 in 188. Pripravljenim hidrogelom bomo določili temperaturo geliranja, na vibracijskem viskozimetru bomo preučevali spreminjanje njihove viskoznosti v odvisnosti od temperature, v termostatiranem inkubatorju (37 °C) pa bomo spremljali hitrost raztapljanja hidrogelov.

V zadnjem delu naloge bomo poskušali razviti ustrezno analitsko metodo, s katero bomo določali koncentracije sproščenega heparina iz termoreverzibilnih hidrogelov v določenih časovnih intervalih.

3. EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 MATERIALI

Materiali za izdelavo nanodelcev

- hitosan klorid, Protasan UP CL 212, Pronova, Norveška
- heparin Krka, 5.000 i.e./1 mL raztopina za injiciranje, Novo mesto, Slovenija
- prečiščena voda

Materiali za izdelavo termoreverzibilnih hidrogelov

- Lutrol® F127, INCI: Poloxamer 407, Ludwigshafen, Nemčija
- Lutrol® F68, INCI: Poloxamer 188, Ludwigshafen, Nemčija
- hitosan klorid, Protasan UP CL 212, Pronova, Norveška
- heparin Krka, 5.000 i.e./1 mL raztopina za injiciranje, Novo mesto, Slovenija
- prečiščena voda
- PBS
- klorovodikova kislina (HCl) Merck, Darmstadt, Nemčija

Reagenti za pripravo PBS pufra

- natrijev klorid (NaCl), Merck, Darmstadt, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), Merck, Darmstadt, Nemčija
- kalijev klorid (KCl), Merck, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Merck, Darmstadt, Nemčija
- bidestilirana voda
- klorovodikova kislina (HCl), Merck, Darmstadt, Nemčija

Reagenti za pripravo medija za določanje hitrosti raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov

- kalijev klorid (KCl), Merck, Darmstadt, Nemčija
- bidestilirana voda
- metilensko modrilo, Centralna lekarna Ljubljana

Materiali za analitiko heparina

- standard heparina (natrijeva sol heparina), Sigma-Aldrich, Nemčija
- standard klorokrezola (4-kloro-3-metilfenol, 99%), Sigma-Aldrich, Nemčija

HPLC kolone

- Chromolith Performance RP-8, 100 x 4,6 mm, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Phenomenex Luna NH₂, 150 x 3 mm, 3 μm, Združene države Amerike
- Agilent Zorbax GF-250, 250 x 9,4 mm, 4,5 μm, Združene države Amerike

Reagenti za pripravo mobilnih faz

- acetonitril (CH₃CN), Merck, Darmstadt, Nemčija
- amonijev acetat (CH₃COONH₄), Merck, Darmstadt, Nemčija
- natrijev klorid (NaCl), Merck, Darmstadt, Nemčija
- miliQ voda

3.2 NAPRAVE

- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- aparat za pripravo ultra čiste vode Purelab Classic VF, Francija
- avtomatska pipeta, 50 – 1000 μl, Biohit, Finska
- avtomatska pipeta, 100 – 5000 μl, Biohit, Finska
- centrifuga Centric 322A, Tehtnica, Slovenija
- digitalna tehtnica, EB-1200 C, Železniki, Slovenija
- filtri Minisart hidrofилni, (1,20 μl), Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija
- inkubator gkembH, Waldems, Nemčija
- magnetno mešalo, IKA-WERKE Ro 15 power, Nemčija
- magnetno mešalo in grelec, IKA RCT basic, Nemčija
- naprava za merjenje viskoznosti, SV-10 VibroViscometer, Tokio, Japonska
- naprava za merjenje velikosti delcev Zetasizer Nano ZS, Malvern, Velika Britanija
- pH meter, SevenMulti, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- sistem za tekočinsko kromatografijo: HPLC, LC/MS
- titrator MPT-2, Malvern, Velika Britanija
- ultracentrifuga Sigma 3K30, Nemčija

- ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija

3.3 POSTOPKI IN METODE

3.3.1 IZDELAVA NANODELCEV

Priprava raztopin hitosana

Pripravili smo raztopine hitosana različnih koncentracij (0,2 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,9 mg/mL in 1,2 mg/mL). Natehtali smo ustrezne količine hitosana (20,0 mg, 60,0 mg, 90,0 mg, 120,0 mg) ter jih kvantitativno prenesli v 100 mL bučke in bučke dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Bučke smo dali v ultrazvočno kadičko in počakali, da se je ves hitosan raztopil. Nato smo raztopine hitosana prelili v 50 mL centrifugirke in jih dali centrifugirati za 20 min pri 3500 obratov/minuto. Ker je hitosan naravnega izvora, smo raztopine hitosana najprej centrifugirali in nato še filtrirali skozi filter z velikostjo por 1,20 μm . Na ta način smo odstranili prisotne nečistoče.

Priprava raztopine heparina

Pripravili smo raztopino heparina s koncentracijo 1 mg/mL. Izhajali smo iz osnovne raztopine heparina 5000 ie/mL, ki ustreza koncentraciji 50 mg/mL. V 50 mL bučko smo odpipetirali 1 mL raztopine heparina (50 mg/mL) in jo dopolnili s 49 mL prečiščene vode.

Izdelava nanodelcev iz hitosana in heparina

Z metodo samoasociiranja nasprotno nabitih polimerov smo pripravili nanodelce z različnimi masnimi razmerji hitosana in heparina (hitosan:heparin = 1,0:1,0; 3,0:1,0; 4,5:1,0; 6,0:1,0). 4 mL raztopine heparina s koncentracijo 1 mg/mL smo z avtomatsko pipeto dodajali k 20 mL vodnih raztopin hitosana različnih koncentracij (0,2 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,9 mg/mL, 1,2 mg/mL) med mešanjem na magnetnem mešalu (900 vrtljajev/minuto) (8). Vzorce smo pustili mešati eno uro. Čez čaše smo položili parafilm in tako preprečili izhlapevanje topila. Disperzijam nanodelcev smo pomerili pH, ki je bil okoli 5,5. Pri pH 5,5 hitosan in heparin lahko tvorita polielektrolitne komplekse preko elektrostatskih interakcij, saj je hitosan pozitivno nabit, naboj heparina pa je negativen.

3.3.2 FIZIKALNO VREDNOTENJE NANODELCEV

Pripravljenim hitosanskim nanodelcem s heparinom smo s pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS izmerili povprečni premer (d), polidisperzni indeks (PI) in zeta potencial (ZP). Da bi ugotovili, ali so pripravljene disperzije nanodelcev fizikalno stabilne skozi daljše obdobje, smo meritve izvedli 1. dan, 2. dan, 7. dan in 14. dan od priprave nanodelcev. Med posameznimi meritvami smo vzorce shranjevali v hladilniku. Vsakič, ko smo pripravili vzorec za merjenje, smo pogledali disperzijo nanodelcev, če so v njej prisotni delci ali če je mogoče prišlo do obarjanja. Približno 1 mL vzorca smo injicirali v kiveto (merjenje d in PI) oziroma v kapilarno celico (merjenje ZP) in ju vstavili v merilno celico. Pri tem smo bili pozorni, da je bila kiveta oziroma kapilarna celica popolnoma čista in da v vzorcu niso bili prisotni zračni mehurčki.

Merjenje velikosti in polidisperznega indeksa nanodelcev

Povprečni premer nam pove povprečno velikost nanodelcev, polidisperzni indeks pa je merilo za širino porazdelitve velikosti nanodelcev. PI lahko zavzame vrednosti od 0-1, pri čemer pomeni 0 monodisperzno (delci so enakih velikosti), 1 pa zelo nehomogeno porazdelitev delcev po velikosti.

Pogoji pri katerih smo izvajali meritve:

- 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 nanodelcev

Pripravljenim nanodelcem smo določili ZP z metodo laserske Dopplerjeve elektroforeze.

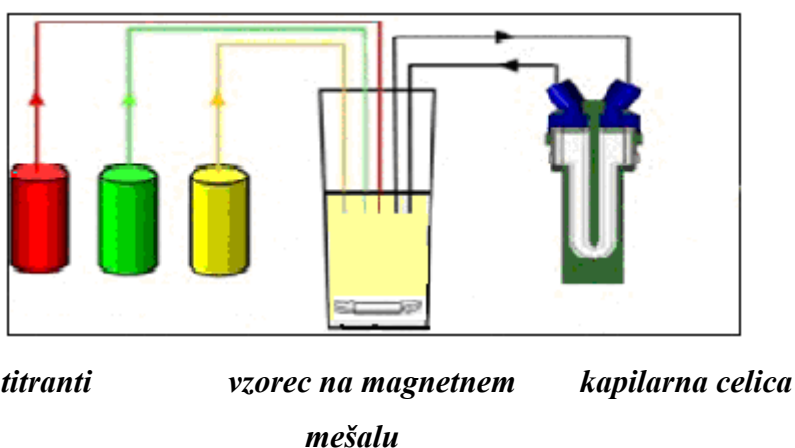
Pogoji pri katerih smo izvajali meritve:

- 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

Aditivna titracija

Aditivno titracijo smo izvajali na večnamenskem titratorju MPT-2, ki je preko kapilarne celice povezan z napravo Zetasizer Nano ZS. Titrator je sestavljen iz dveh glavnih delov: predela, kjer so titranti (v našem primeru raztopina heparina) in predela, kjer je vzorec, ki ga titriramo (v našem primeru raztopina hitosana) (slika 7).



Slika 7: Shematski prikaz titracije vzorca s titratorjem MPT2, kateri je preko kapilarne celice povezan z napravo Zetasizer Nano ZS (25).

Z raztopino heparina ($c = 1 \text{ mg/mL}$) smo titriral 10 mL raztopine hitosana s koncentracijo $0,6 \text{ mg/mL}$. V epruveto smo nalili 10 mL raztopine hitosana, dodali magnet in epruveto vpeli v titrator. Titrator je postopoma dodajal majhne volumne raztopine heparina v raztopino hitosana. Zaradi pozitivno nabitega hitosana in negativno nabitega heparina, so se med njima vzpostavile elektrostatske interakcije in posledično so nastali nanodelci. Zetasizer Nano ZS je po vsakem dodatku titranta izvedel meritev zeta potenciala delcev. Z aditivno titracijo smo dobili podatek, kako spreminjanje masnega razmerja med hitosanom in heparinom vpliva na vrednosti zeta potenciala nastalih nanodelcev.

3.3.3 IZDELAVA TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

Priprava medijev

Izdelane termoreverzibilne hidrogelne smo razdelili v več sklopov glede na medij, ki smo ga uporabili pri njihovi izdelavi.

I. sklop - medij: voda (pH=5,5)

- 17,4% (m/m) P407 v vodi
- 21% (m/m) P407 v vodi
- 21% (m/m) P407 + 10% P188 v vodi

V čašo smo nalili 100 mL prečiščene vode in ji z 1 M HCl umerili pH na 5,5.

II. sklop - medij: PBS (pH=5,5)

- 17,4% (m/m) P407 v PBS
- 21% (m/m) P407 v PBS
- 21% (m/m) P407 + 10% (m/m) P188 v PBS

PBS smo pripravili tako, da smo natehtali 8 g NaCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl in 0,24 g KH₂PO₄. Soli smo kvantitativno prenesli v litrsko bučo in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Tako pripravljene raztopine smo nato z 1 M HCl umerili pH na 5,5.

III. sklop - medij: raztopina heparina

- 17,4% (m/m) P407 v raztopini heparina (1 mg/mL)
- 17,4% (m/m) P407 v raztopini heparina (1 mg/mL) v PBS
- 21% (m/m) P407 v raztopini heparina (1 mg/mL)
- 26% (m/m) P407 v raztopini heparina (1 mg/mL)
- 17,4% (m/m) P407 v raztopini heparina (25 mg/mL)
- 17,4% (m/m) P407 + 1,6% (m/m) P188 v raztopini heparina (1 mg/mL)

Pripravili smo raztopine heparina s koncentracijama 1 mg/mL in 25 mg/mL in raztopino heparina s koncentracijo 1 mg/mL v PBS. Izhajali smo iz osnovne raztopine heparina 50

mg/mL. Raztopino heparina s koncentracijo 25 mg/mL smo pripravili tako, da smo v 20 mL bučko odpipetirali 10 mL raztopine heparina (50 mg/mL) in 10 mL prečiščene vode. Za pripravo 1 mg/mL raztopine heparina smo v 50 mL bučko odpipetirali 1 mL raztopine heparina (50 mg/mL) in 49 mL prečiščene vode. Raztopino heparina 1 mg/mL v PBS smo pripravili tako, da smo v 50 mL bučko odpipetirali 1 mL raztopine heparina (50 mg/mL) in 49 mL PBS.

IV. sklop - medij: raztopina hitosana

- 17,4% (m/m) P407 v raztopini hitosana (1 mg/mL)

Raztopino hitosana s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili tako, da smo natehtali 50 mg hitosana ter ga kvantitativno prenesli v 50 mL bučko in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Bučko smo dali v ultrazvočno kadičko in počakali, da se je ves hitosan raztopil. Nato smo raztopino prelili v 50 mL centrifugirko in jo dali centrifugirati za 20 min pri 3500 obratov/minuto. Po končanem centrifugiranju smo raztopino hitosana še filtrirali skozi filter z velikostjo por 1,20 μm .

V. sklop - medij: disperzija nanodelcev

- 17,4% (m/m) P407 v disperziji nanodelcev (hitosan:heparin = 1:1)
- 17,4% (m/m) P407 v disperziji nanodelcev (hitosan:heparin = 3:1)
- 17,4% (m/m) P407 v disperziji nanodelcev (hitosan:heparin = 4,5:1)
- 17,4% (m/m) P407 v disperziji nanodelcev (hitosan:heparin = 6:1)
- 17,4% (m/m) P407 + 1,6% (m/m) P188 v disperziji nanodelcev (hitosan:heparin = 1:1)

Disperzije nanodelcev z različnimi masnimi razmerji med hitosanom in heparinom smo pripravili po postopku, ki je opisan v pod poglavju 3.3.1 Izdelava nanodelcev.

Izdelava termoreverzibilnih hidrogelov

Pripravili smo termoreverzibilne hidrokele, ki so vsebovali različne deleže P407 (17,4%; 21%; 26%) ali kombinacijo P407 + P188 (17,4% + 1,6%; 21% + 10%) v različnih medijih. Najprej smo natehtali ustrežne količine P407 (4,21 g, 5,32 g, 7,03 g) in P407 + P188 (4,30 g + 0,40 g, 6,09 g + 2,90 g). Na magnetno mešalo smo postavili 250 mL čaše z ledom, v

katere smo dali 50 mL čaše z magnetom in 20 mL medija (PBS, vode, raztopine heparina, raztopine hitosana ali disperzije nanodelcev). Ledeno kopel smo uporabili zato, ker pri takšnih pogojih koloidna raztopina poloksamera ne gelira, ampak ostane v sol stanju. Prej natehtane poloksamere smo postopoma dodajali v čaše z medijem. Čaše smo pokrili s parafilmom in tako preprečili izhlapevanje medija. Vse skupaj smo mešali pri konstantni hitrosti 700 vrtljajev/minuto. Ko smo dodali celotno količino poloksamerov, smo pustili vzorce mešati tako dolgo, da so le-ti postali homogeni. Pripravljene vzorce termoreverzibilnih hidrogelov smo nato shranili čez noč v hladilniku, da so se pene, ki so nastale med samo izdelavo posedle. Pene bi motile nadaljne meritve.

3.3.4 VREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

Določanje temperature geliranja termoreverzibilnih hidrogelov

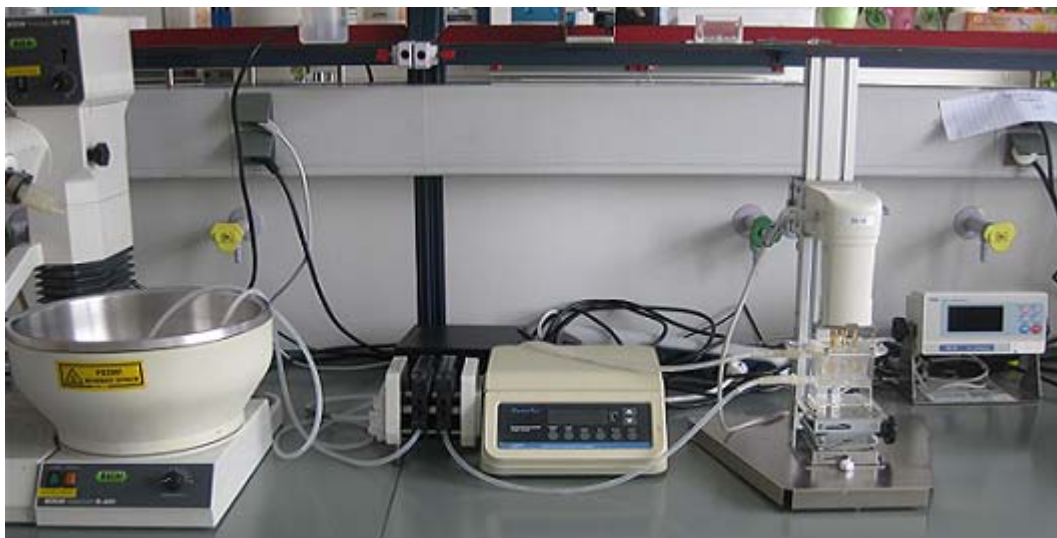
V 25 mL čašo smo natehtali 14,0 g termoreverzibilnega hidrogela, dodali magnet ter čašo položili v 250 mL čašo, v katero smo predhodno dodali 80 mL hladne vode. Vse skupaj smo postavili na magnetno mešalo (500 vrtljajev/minuto). Temperaturo vodne kopeli smo spremljali z vpetim termometrom. V vzorec smo dovajali toploto (nastavitev na magnetnem mešalu: 60 °C). Temperatura pri kateri se je magnet popolnoma ustavil je bila temperatura geliranja termoreverzibilnega hidrogela. Rezultat temperature geliranja vzorca predstavlja povprečna vrednost štirih meritev (26).

Merjenje viskoznosti termoreverzibilnih hidrogelov

Pripravljenim termoreverzibilnim hidrogelom smo izmerili viskoznost z vibracijskim viskozimetrom (VibroViscometer SV-10). Glavne prednosti viskozimetrov serije SV-10 so, da lahko merijo viskoznost vzorca v njegovem naravnem stanju, ne da bi ga ob tem poškodovali, majhni vzorci testne tekočine, enostavnost rokovanja in enostavno čiščenje. Natančno izmerijo tudi temperaturo, kar omogoča merjenje viskoznosti s sočasnim spreminjanjem temperature.

VibroViscometer SV-10 je sestavljen iz dveh tankih senzorskih ploščic, ki ju poganja elektromagnetna sila, ki vzdržuje stalno amplitudo valovanja. Ploščici sinusno nihata z isto frekvenco v nasprotni smeri. Viskoznost izmeri tako, da zazna električni tok, ki je

potreben, da senzorski ploščici nihata v resonanci pri stalni frekvenci 30 Hz in amplitudi manjši od 1 mm (27).



Slika 8: Vibro Viscometer SV-10.

V polikarbonatno posodico smo nalili 10 mL vzorca hidrogela iz hladilnika in jo vstavili v termostatorirano posodico, katera je bila preko vodne črpalke povezana z vodno kopeljo. V vzorec smo potopili senzorski ploščici in pričeli z merjenjem viskoznosti. Vzorcem smo merili viskoznost pri različnih temperaturah, vse dokler ni viskoznost vzorcev dosegla vrednosti 10.000 mPas. VibroViscometer SV-10 ima območje merjenja viskoznosti le do 10.000 mPas.

Določanje hitrosti raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov

Medij, v katerem smo določali hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov, je bila izotonična raztopina kalijevega klorida, katero smo obarvali z metilenskim modrilom. Natehtali smo 1,12 g KCl in ga kvantitativno prenesli v 100 mL bučko, dodali metilensko modrilo in dopolnili do oznake z bidestilirano vodo.

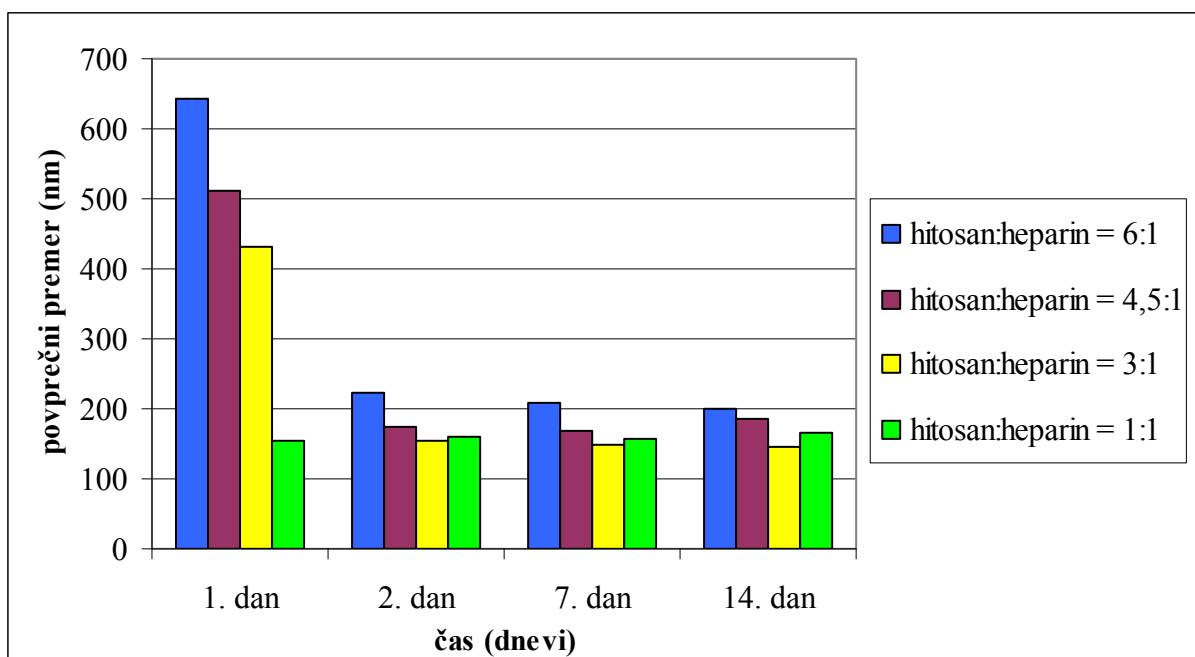
Hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov smo določali v inkubatorju, ki je bil termostatoriran na 37 °C (telesna temperatura). V plastične epruvete z zamaškom, smo nalili po 1 mL hidrogelov ter jih vstavili v inkubator. Ko so termoreverzibilni hidrogeli pri povišani temperaturi gelirali, smo v vsako epruveto dodali po 2 mL izotonične raztopine kalijevega klorida, ki smo jo predhodno obarvali z metilenskim modrilom. Metilensko modrilo smo dodali z namenom, da bi sicer brezbarvni medij lahko videli ter spremljali

obarvanost in hitrost raztapljanja hidrogelov v stiku z obarvano izotonično raztopino KCl več dni. Vsak dan smo ob isti uri preverili, koliko hidrogela se je raztopilo. Za hidrokele različne sestave smo tako dobili podatek, koliko dni je potrebnih, da se raztopi 1 mL hidrogela.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VREDNOTENJE FIZIKALNIH LASTNOSTI HITOSANSKIH NANODELCEV S HEPARINOM

4.1.1 Primerjava povprečnega premera nanodelcev z različnim masnim razmerjem hitosan:heparin v obdobju dveh tednov

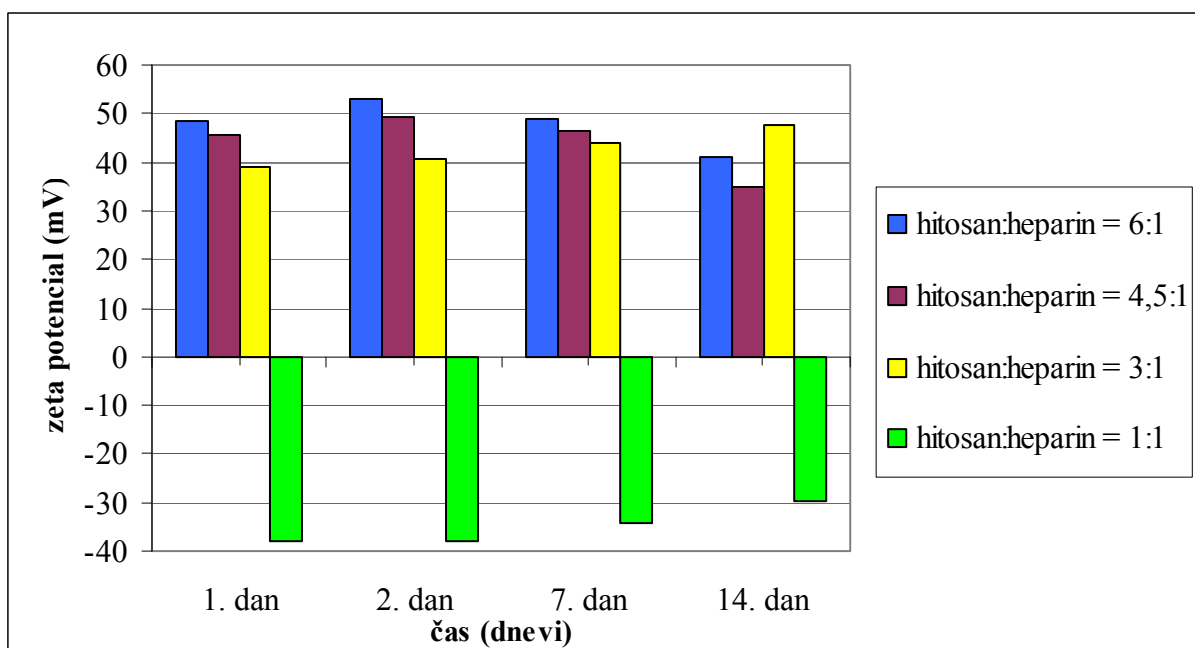


Slika 9: Povprečni premer nanodelcev z različnim masnim razmerjem hitosan:heparin v odvisnosti od časa.

Zanimalo nas je, kakšen vpliv ima masno razmerje med hitosanom in heparinom na povprečni premer nanodelcev in ali se njihova velikost spreminja s časom. Pripravljene disperzije nanodelcev so imele pH okoli 5,5. Ker je pri tej pH vrednosti heparin negativno nabit in amino skupine hitosana (pK_a okoli 6,5) protonirane, lahko tvorita polielektrolitne komplekse z elektrostatskimi interakcijami. Kot je razvidno iz slike 9, so pri vseh masnih razmerjih hitosan:heparin nastali delci nanometrskih velikosti. Povprečni premer nanodelcev je bil en dan po izdelavi v območju 150-210 nm. Prvi dan so imeli vsi nanodelci, razen tisti z masnim razmerjem 1:1, v primerjavi z naslednjimi dnevi večjo povprečno velikost. Ker smo merili velikost delcev takoj po izdelavi, je možno, da so

znotraj delcev še potekale interakcije med protoniranimi amino skupinami hitosana in negativno nabitimi skupinami heparina. Najverjetneje je potreben določen čas, da se med hitosanom in heparinom vzpostavijo vse interakcije. Iz rezultatov na sliki 9 je razvidno, da z večanjem masnega razmerja med hitosanom in heparinom nastanejo večji nanodelci. Z naraščajočo koncentracijo hitosana, se lahko molekule heparina v nanodelcu prepletejo oziroma povežejo z večimi molekulami hitosana in posledično nastanejo vedno večji nanodelci (28). Največji nanodelci so nastali pri masnem razmerju hitosan:heparin = 6:1, njihova povprečna velikost v obdobju dveh tednov, če ne upoštevamo prvega dne, je bila 210 nm. Prišli smo do zaključka, da masno razmerje hitosan:heparin vpliva na povprečno velikost delcev. Disperzije nanodelcev so bile fizikalno stabilne v obdobju dveh tednov, saj se njihova velikost v tem času ni bistveno spreminjala oziroma ni prišlo do agregacije delcev.

4.1.2 Primerjava zeta potenciala nanodelcev z različnim masnim razmerjem hitosan:heparin v obdobju dveh tednov

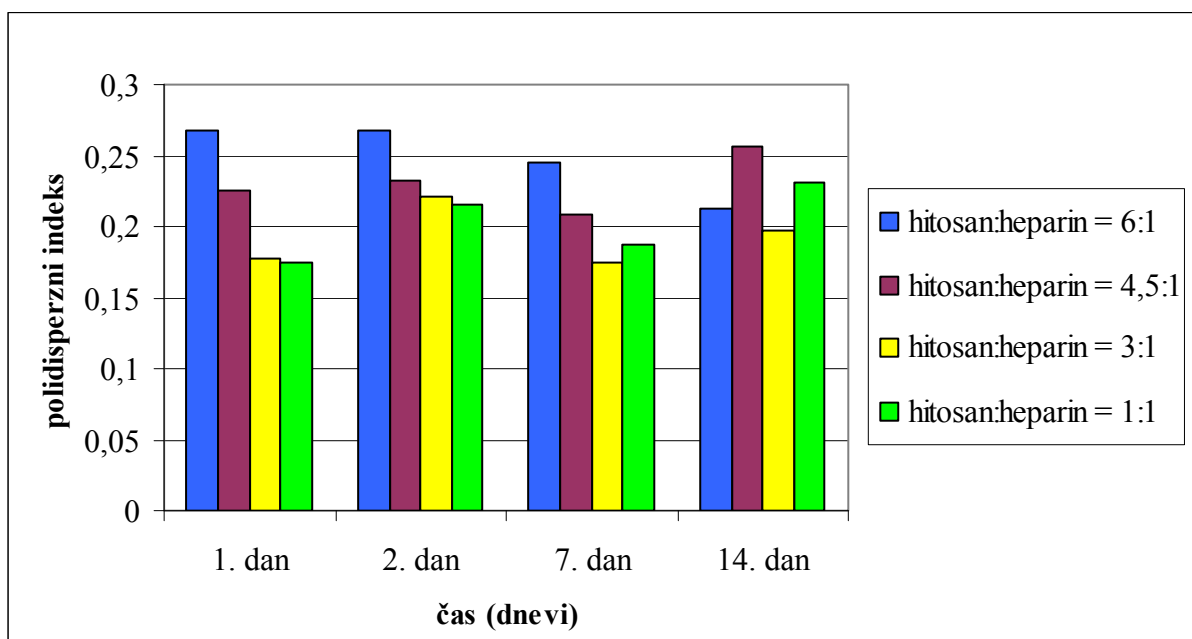


Slika 10: Zeta potencial nanodelcev z različnim masnim razmerjem hitosan:heparin v odvisnosti od časa.

Na podlagi rezultatov iz slike 10 je razvidno, da vrednost ZP narašča z naraščajočim masnim razmerjem med hitosanom in heparinom. Pri visoki vrednosti ZP se delci zaradi velikega naboja na njihovi površini med seboj odbijajo, kar omogoča večjo kinetično

stabilizacijo nanodelcev. Najvišji zeta potencial (45 mV) imajo nanodelci z masnim razmerjem hitosan:heparin = 6:1. Edino pri masnem razmerju hitosan:heparin = 1:1 nastanejo nanodelci z negativnim ZP (-35 mV), ker so negativno nabite skupine heparina v presežku v primerjavi s protoniranimi amino skupinami v hitosanu. Vrednosti ZP nanodelcev se bistveno ne spreminjajo v obdobju dveh tednov. Rezultati kažejo, da so disperzije nanodelcev v obdobju dveh tednov fizikalno stabilne, saj imajo vrednosti zeta potenciala višje od 30 mV oz. nižje od -30 mV. Znotraj teh meja zeta potenciala se delci odbijajo drug od drugega, kar omogoča stabilnost disperzije. Zaključimo lahko, da so masna razmerja med posameznimi sestavinami nanodelcev zelo pomembna, saj vplivajo na ZP delcev in s tem na fizikalno stabilnost disperzij.

4.1.3 Primerjava polidisperznega indeksa nanodelcev z različnim masnim razmerjem hitosan:heparin v obdobju dveh tednov

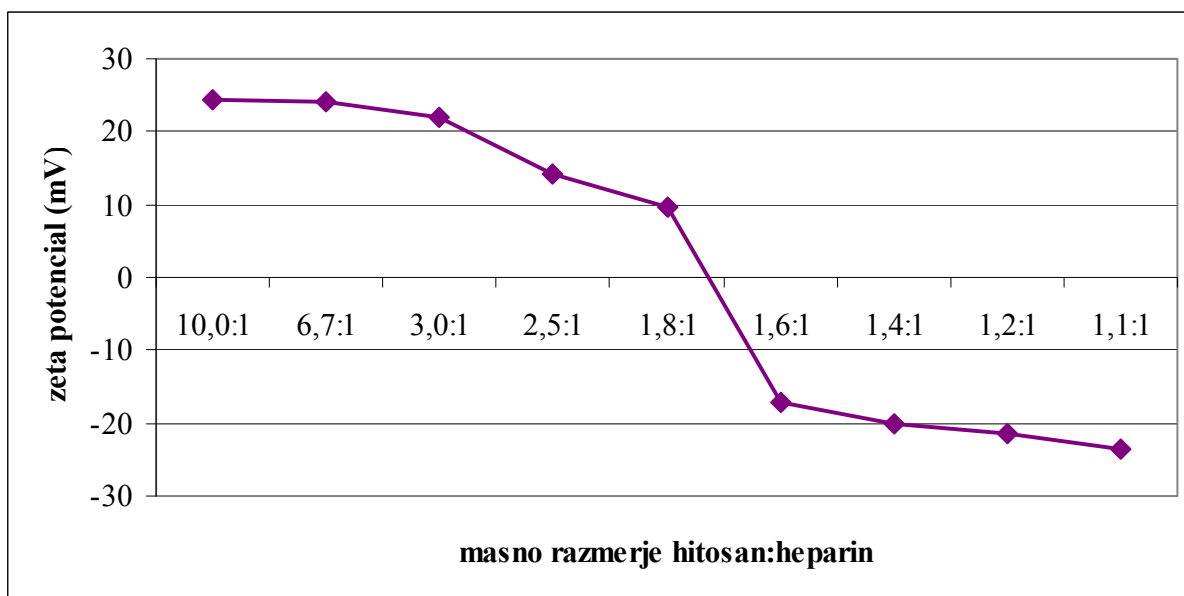


Slika 11: Polidisperzni indeks nanodelcev z različnim masnim razmerjem hitosan:heparin v odvisnosti od časa.

Polidisperzni indeks je merilo porazdelitve velikosti delcev v vzorcu. Vrednosti PI blizu 0 kažejo na monodisperznost vzorca, kar pomeni, da so delci zelo podobnih velikosti. Če pa se PI približuje 1, je vzorec polidisperzen in s tem delci zelo različnih velikosti. Zaželeno je, da je PI nižji od 0,3. Iz slike 11 je razvidno, da so vrednosti PI nekoliko višje pri nanodelcih z masnim razmerjem 6:1 in 4,5:1 v primerjavi s tistimi z masnim razmerjem

3:1 in 1:1. PI se v obdobju dveh tednov ni bistveno spreminjal in je pri vseh nanodelcih manjši od 0,3. Rezultati kažejo na precejšnjo homogenost vzorcev tj. prisotnost delcev podobnih velikosti.

4.1.4 Aditivna titracija raztopine hitosana (0,6 mg/mL) z raztopino heparina (1 mg/mL) - vpliv masnega razmerja hitosan:heparin na zeta potencial nanodelcev



Slika 12: Zeta potencial nanodelcev v odvisnosti od masnega razmerja hitosan:heparin.

S titracijo raztopine hitosana (0,6 mg/mL) z raztopino heparina (1 mg/mL) smo želeli ugotoviti, kako se spreminjanje masnega razmerja med hitosanom in heparinom odraža na zeta potencialu nanodelcev.

Iz slike 12 je razvidno, da se z manjšanjem masnega razmerja hitosan:heparin zeta potencial zmanjšuje. Površinski naboj koloidnega sistema se začne pri masnem razmerju hitosan:heparin 1,8:1 naglo približevati nevtralnosti, ker večina pozitivno nabitih hitosanskih skupin stopa v interakcijo z negativno nabitimi skupinami heparina. V tej točki možnost agregacije delcev narašča, ker se delci med seboj ne odbijajo oziroma ni prisotne sile, ki bi jim preprečevala združevanje.

Vrednosti ZP, ki smo jih dobili pri titraciji hitosana s heparinom (slika 12), se nekoliko razlikujejo glede na vrednosti ZP nanodelcev, ki smo jih dobili pri metodi, pri kateri smo v raztopino hitosana ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu z avtomatsko pipeto dodajali raztopino heparina in nato pustili vzorec mešati še eno uro (slika 10). Pri titraciji znaša npr. vrednost ZP nanodelcev z masnim razmerjem = 3:1 22 mV, medtem ko pri drugi metodi 39

mV. Vzrok za razliko v vrednosti ZP je verjetno ta, da titrator dodaja heparin v raztopino hitosana zelo počasi. Sklepamo, da je zaradi tega vsaka molekula heparina, ki je padla v raztopino hitosana, imela možnost vstopati v interakcije z večimi pozitivno nabitimi skupinami hitosana in je zato končna vrednost zeta potenciala nižja (22 mV).

Pri metodi pipetiranja je fizikalna stabilnost disperzij nanodelcev večja, saj je vrednost ZP višja od 30 mV. Nanodelci se lahko zaradi močno pozitivnega ZP med seboj odbijajo in tako ne težijo k flokulaciji.

4.2 VREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

4.2.1 TEMPERATURA GELIRANJA TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

Temperatura geliranja je temperatura, pri kateri iz tekoče faze nastane gel (29). Primerna temperatura geliranja za podkožno aplikacijo je med 30-36 °C. Pomembno je, da je termoreverzibilni hidrogel pri sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju in tvori gel v podkožju. Če bi bila temperatura geliranja dosti nižja od 30 °C, bi se tvoril gel pri sobni temperaturi in bi zaradi tega imeli težave z apliciranjem. Temperatura geliranja pa ne sme biti višja od telesne temperature (37 °C), saj se drugače po aplikaciji v podkožju ne bi tvoril gel .

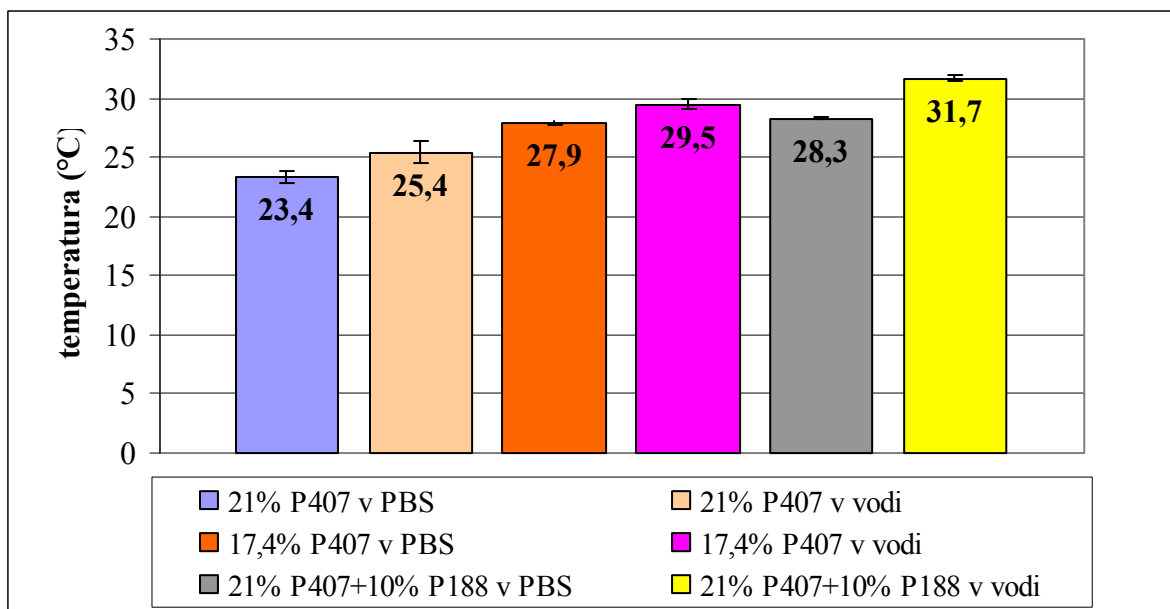
4.2.1.1 Medij: voda in PBS

Vpliv poloksamera 407

Temperatura, pri kateri pride do nastanka gela, je odvisna od koncentracije uporabljenega polimera, dolžine hidrofobnega fragmenta in kemične strukture polimera (30). Tudi iz naših rezultatov (slika 13) je razvidno, da koncentracija poloksamera vpliva na temperaturo geliranja. Višje koncentracije P407 znižajo temperaturo geliranja (v povprečju za 4 °C) ne glede na uporabljen medij. Pri višjih koncentracijah P407 se miceli uredijo v mrežo in tvorijo gel pri nižji temperaturi, kot če uporabimo nižjo koncentracijo P407.

Vodikove vezi med polioksipropilenskimi (POP) verigami in vodo držijo hidrofobne dele poloksamera v mrzli vodi ločene. Z naraščajočo temperaturo pride do prekinitve vodikovih vezi in do nastanka hidrofobnih interakcij med POP verigami, ki povzročijo nastanek gela.

Torej so lastnosti geliranja poloksamerov odvisne od deleža hidrofobnega fragmenta. Ker z naraščajočo koncentracijo P407 narašča tudi količina hidrofobnega fragmenta, je večja gonilna sila za hidrofobno združevanje polimernih verig in posledično nižja temperatura geliranja (30, 31).



Slika 13: Temperatura geliranja termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v vodi ali PBS.

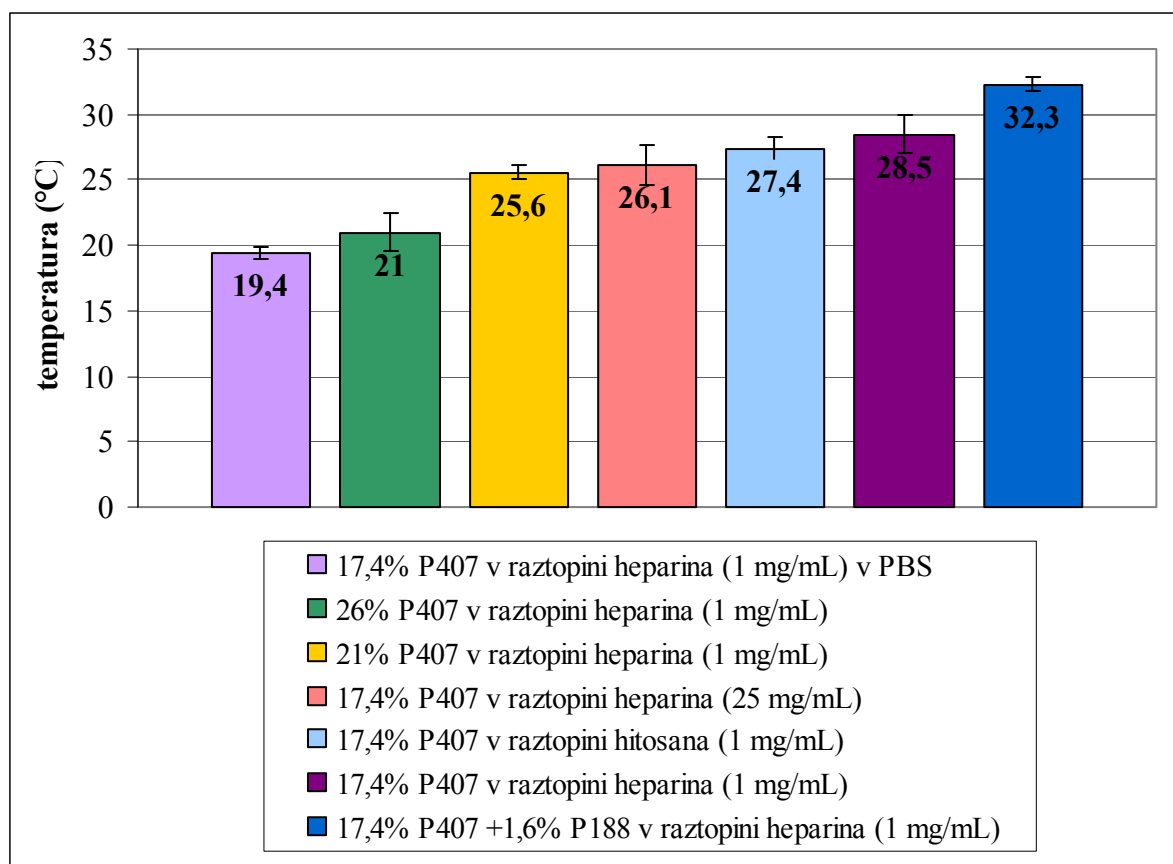
Vpliv PBS

Znano je, da lahko različni dodatki znižajo ali povišajo temperaturo geliranja. Temperaturo geliranja znižajo anorganske soli: NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, Na₂CO₃, medtem ko jo etanol, HCl, propilenglikol povišajo (19, 32). Rezultati iz slike 13 se ujemajo z literaturnimi podatki, da dodatek anorganskih soli zniža T geliranja. Če primerjamo T geliranja hidrogelov, ki vsebujejo enake količine poloksamera in se razlikujejo samo v vrsti medija, ugotovimo da PBS zniža T geliranja za približno 2 - 3 °C v primerjavi z vodo. PBS vsebuje različne soli (NaCl, KCl, Na₂HPO₄ in KH₂PO₄), ki povečajo ionsko moč medija. Zaradi povečane ionske moči medija pride do izsoljevanja (ang. salting-out effect) (33). Koncentracija prostih molekul vode se zmanjša, ker imajo te večjo afiniteto do ionov soli kot do polimera. Posledično so molekule poloksamera manj solvatirane in se zato začnejo s hidrofobnimi povezavami medsebojno povezovati in tvoriti gel pri nižji temperaturi (32).

Vpliv poloksamera 188

V članku smo zasledili, da dodatek P188 k P407 zviša temperaturo geliranja (21). Naši rezultati (slika 13) se skladajo z ugotovitvami iz članka, saj če primerjamo hidrogel, ki vsebuje samo 21% P407 v vodi z hidrogelom 21% P407 + 10% P188 v vodi vidimo, da ima slednji T geliranja višjo za približno 5 °C. Vzrok zvišanja T geliranja naj bi bil najverjetneje nastanek mešanih micelov (21). Zvišanje T geliranja lahko razložimo na naslednji način: 19% molekulske mase P188 predstavlja polioksipropilen (hidrofobni del kopolimera), medtem ko pri P407 hidrofobni del predstavlja kar 30% molekulske mase. Ker P188 vsebuje manj hidrofobnih segmentov, je manjša gonilna sila za hidrofobno združevanje polimernih verig, zato začnejo miceli nastajati pri višji temperaturi in posledično je tudi višja temperatura geliranja gela, ki vsebuje kombinacijo P407 in P188 (30).

4.2.1.2 Medij: raztopina heparina in raztopina hitosana



Slika 14: Temperatura geliranja termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v raztopinah heparina ali hitosana.

Vpliv heparina

Lee in sodelavci so prišli do spoznanja, da dodatek heparina k raztopinam poloksamera zniža kritično micelsko temperaturo, kar nakazuje, da heparin pospešuje micelizacijo in združevanje micelov (34). Njihove ugotovitve se skladajo z našimi rezultati, saj če primerjamo vzorec 17,4% P407 v vodi (slika 13) z vzorcem 17,4% P407 v raztopini heparina 1 mg/mL (slika 14) vidimo, da dodatek heparina zniža T geliranja. Stopnja združevanja micelov je še bolj izrazita z naraščajočo koncentracijo dodanega heparina. Višja je koncentracija heparina, nižja je temperatura geliranja (34). To je razvidno tudi iz naših rezultatov, saj je T geliranja 17,4% P407 v raztopini heparina, s koncentracijo 25 mg/mL, 26,1 °C, medtem ko je pri vzorcu 17,4% P407 v raztopini heparina, s koncentracijo 1 mg/mL, 28,5 °C (slika 14). Če primerjamo vzorce, ki vsebujejo enake koncentracije heparina in različne % P407 opazimo, da imajo nižjo T geliranja vzorci z večjo vsebnostjo P407 (slika 14). Večji učinek heparina pri višjih koncentracijah P407 si lahko razlagamo na naslednji način: zaradi zmanjšane medmolekulske razdalje med P407 in heparinom je povečana verjetnost, da se dve molekuli srečata in zato so možne številčnejše interakcije med heparinom in poloksamerom (34). Vzrok interakcije med heparinom in poloksamerom je najverjetneje karboksilna skupina v heparinu, ki se veže na PEO del micelov poloksamera – rezultat je navzkrižno povezovanje micelov. Sulfatna skupina je tudi potencialni udeleženec za tvorbo vodikovih vezi med molekulami heparina in poloksamera (33).

Vpliv PBS

Kot so že ugotovili Chung in sodelavci, imajo raztopine heparina v različnih topilih (PBS ali voda) z isto koncentracije P407 različno T geliranja. Iz histogramov na sliki 14 je razvidno, da dodatek PBS močno zniža temperaturo geliranja v primerjavi z vodo (za skoraj 9 °C). Vzrok je povečana ionska moč medija zaradi dodatka soli - pride do izsoljevanja (33).

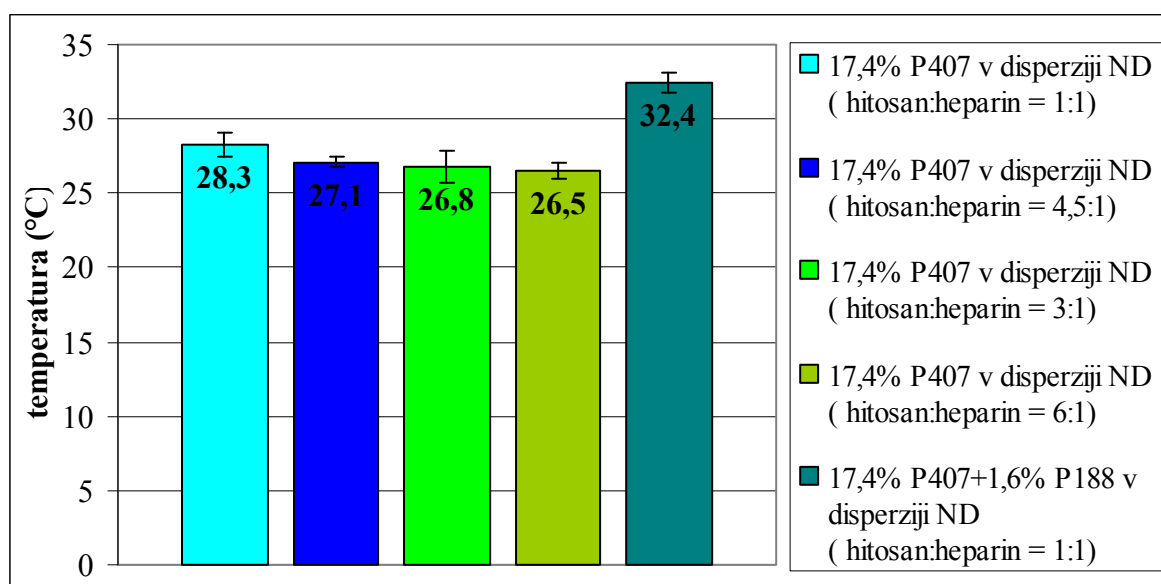
Vpliv poloksamera 188

Iz slike 14 je razvidno, da dodatek P188 k P407 poviša temperaturo geliranja, najverjetneje zaradi nastanka mešanih micelov.

Vpliv hitosana

Če primerjamo vzorca 17,4% P407 v raztopini hitosana ($c = 1 \text{ mg/mL}$) in 17,4% P407 v raztopini heparina ($c = 1 \text{ mg/mL}$) (slika 14) z vzorcem 17,4% P407 v vodi (slika 13) vidimo, da hitosan še bolj zniža T geliranja v primerjavi s heparinom. Iz rezultatov je razvidno, da je učinek hitosana na pospeševanje micelizacije večji v primerjavi s heparinom.

4.2.1.3 Medij: disperzija nanodelcev



Slika 15: Temperatura geliranja termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v disperzijah nanodelcev.

Vpliv disperzije nanodelcev

S slike 15 je razvidno, da je T geliranja pri vzorcih, ki vsebujejo 17,4% P407 v disperziji ND nižja v primerjavi z vzorcem 17,4% P407 v vodi ($29,5 \text{ °C}$) (slika 13). Vzrok je dodatek nanodelcev iz hitosana in heparina, saj tako hitosan kot heparin pospešujeta micelizacijo in posledično znižata temperaturo geliranja.

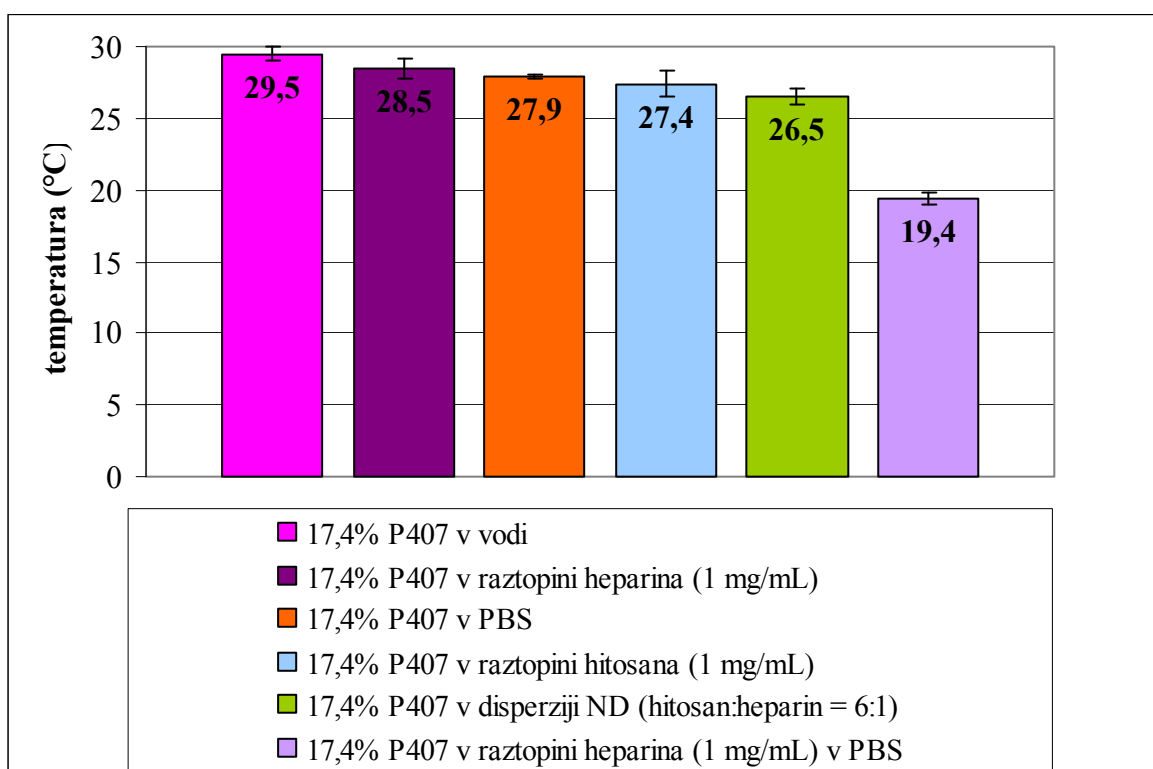
Koncentracija heparina je bila v vseh disperzijah ND enaka ($0,167 \text{ mg/mL}$), medtem ko je bila koncentracija hitosana v disperziji ND z masnim razmerjem (hitosan:heparin 1:1) $0,167 \text{ mg/mL}$, (hitosan:heparin = 3:1) $0,5 \text{ mg/mL}$, (hitosan:heparin = 4,5:1) $0,75 \text{ mg/mL}$ in pri (hitosan:heparin = 6:1) 1 mg/mL . Vzorec 17,4% P407 v disperziji ND z masnim razmerjem 6:1 ima najnižjo T geliranja vsaj vsebuje najvišjo koncentracijo hitosana,

medtem ko ima 17,4% P407 v disperziji ND hitosan:heparin = 1:1 zaradi nizke koncentracije hitosana najnižjo T geliranja.

Vpliv poloksamera 188

Iz histogramov na sliki 15 je razvidno, da dodatek P188 k P407 poviša temperaturo geliranja za 3 °C, ker pride do nastanka mešanih micelov. Izmed vseh vzorcev termoreverzibilnih hidrogelov, ki vsebujejo kot medij disperzijo ND ima vzorec 17,4% P407 + 1,6% P188 v disperziji ND (hitosan:heparin = 1:1) najustreznejšo T geliranja (32,4 °C) za podkožno injiciranje. Ker je vzorec tekoč pri sobni temperaturi, ne bi imeli težav z apliciranjem, po aplikaciji pa bi v podkožju nastal gel.

4.2.1.4 Medij: voda, PBS, raztopina heparina, raztopina hitosana, disperzija nanodelcev



Slika 16: Vpliv medija na temperaturo geliranja termoreverzibilnih hidrogelov.

Na sliki 16 so predstavljene temperature geliranja gelov, ki vsebujejo enak delež P407 (17,4%) in različne medije. Iz histogramov je razvidno, da dodatek heparina, PBS, hitosana in disperzije nanodelcev zniža T geliranja v primerjavi z vodo. Posebej zanimivo je to, da dodatek heparina ali dodatek PBS zniža T geliranja za približno 1-1,5 °C v primerjavi z

vodo, če pa uporabimo kot medij raztopino heparina v PBS, se T geliranja v primerjavi z vodo zniža za kar 10 °C. Možno je, da imata heparin in PBS sinergistično delovanje.

4.2.2 VISKOZNOST TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

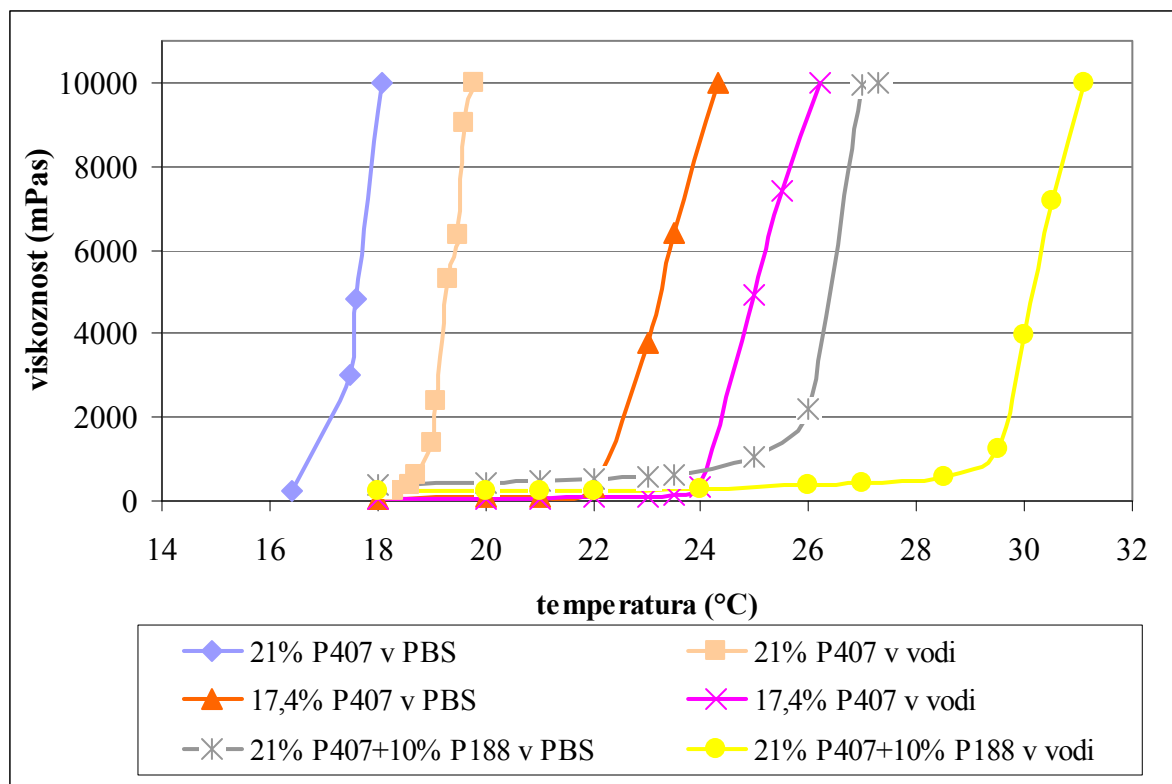
Viskoznost enostavnih tekočin, kot so voda in večina polimernih raztopin, se ponavadi zmanjšuje z naraščajočo temperaturo kot posledica slabjenja interakcij med molekulami (35). Nekatere raztopine polimerov imajo posebno značilnost, da se njihova viskoznost povečuje z naraščajočo temperaturo - mednje sodijo tudi poloksameri. Gele poloksamerov uvrščamo med viskoelastične snovi, ker imajo značilnosti trdnih snovi (elastični modul) in značilnosti tekočin (viskozni modul). Reološke lastnosti poloksamerov se spreminjajo z naraščajočo temperaturo. Pred T geliranja so elastične lastnosti poloksamerov nizke in vzorci imajo značilnost viskoznih raztopin. Od točke geliranja dalje vrednosti elastičnega modula narastejo in vzorce lahko opredelimo kot gele z elastičnim obnašanjem (30).

4.2.2.1 Medij: voda in PBS

Razredčene vodne raztopine P407 se obnašajo kot Newtonski sistemi, njihovo obnašanje pa se spremeni v Nenevtonsko pri koncentraciji višji od 15%. P407 ima maksimalno viskoznost v območju 30-60 °C, nato pa mu z naraščajočo temperaturo viskoznost pada (22). Iz slike 17 je razvidno, da na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov vpliva koncentracija in vrsta poloksamera, kot tudi vrsta uporabljenega medija.

Vpliv poloksamera 407

Iz slike 17 je razvidno, da z naraščajočo temperaturo viskoznost vzorca 21% P407 v vodi hitreje narašča v primerjavi z vzorcem 17,4% P407 v vodi. Hitrejše naraščanje viskoznosti raztopin z višjo koncentracijo P407 lahko razložimo na naslednji način: ker z naraščajočo koncentracijo P407 narašča tudi količina hidrofobnih segmentov poloksamera, je večja gonilna sila za hidrofobno združevanje polimernih verig, zato začnejo miceli nastajati pri nižji temperaturi. Posledično z naraščajočo temperaturo hitreje narašča viskoznost raztopin z višjo koncentracijo P407.



Slika 17: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v vodi ali PBS, v odvisnosti od temperature.

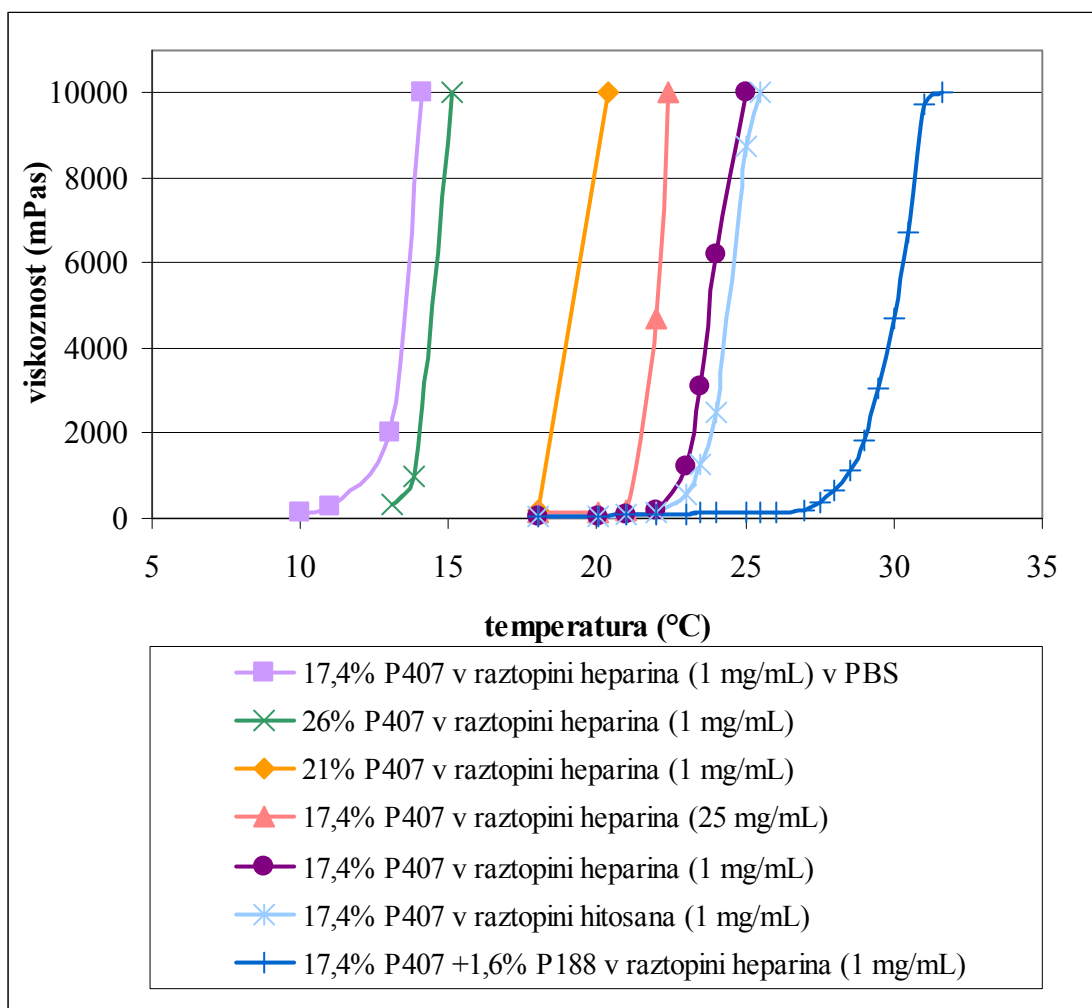
Vpliv PBS

Viskoznost vodnih raztopin poloksamerov lahko spremenimo z dodatkom anorganskih soli. Če primerjamo vzorce gelov, ki vsebujejo enake koncentracije P407 in se razlikujejo le v vrsti medija (voda ali PBS), opazimo, da se pri vzorcih, ki vsebujejo PBS, viskoznost hitreje povečuje z naraščajočo temperaturo. Vzrok za to je povečana ionska moč medija zaradi dodatka soli – pride do izsoljevanja.

Vpliv poloksamera 188

Dodatek P188 k P407 opazno zniža viskoznost gelov. Vzorec 21% P407 v vodi ima pri 18 °C viskoznost 200 mPas pri 19 °C pa njegova viskoznost naraste do 10000 mPas. Na podlagi naglega povišanja viskoznosti sklepamo, da pride v temperaturnem območju (18-19 °C) do pospešene micelizacije. Če enakemu vzorcu dodamo 10% P188, se njegova viskoznost zelo zmanjša. Viskoznost se v območju 18-28 °C malo spreminja, do naglega povišanja pride pri 29 °C in doseže vrednost 10000 mPas pri 31 °C (slika 17).

4.2.2.2 Medij: raztopina heparina in raztopina hitosana



Slika 18: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v raztopinah heparina ali hitosana, v odvisnosti od temperature.

Iz slike 18 je razvidno, da imajo vsi vzorci razen vzorca, ki vsebuje poleg P407 še P188 previsoko viskoznost za podkožno aplikacijo, saj imajo viskoznost 10000 mPas pri temperaturi, ki je nižja od sobne temperature (25 °C). Ker so vzorci zelo viskozni pri sobni temperaturi, bi imeli težave z apliciranjem.

Vpliv heparina

Če primerjamo sliki 17 in 18 vidimo, da dodatek heparina poveča viskoznost gela v primerjavi z vodo. Ker heparin zniža kritično micelsko temperaturo, začnejo miceli nastajati pri nižji temperaturi. Posledica tega je, da viskoznost gela, ki vsebuje heparin,

hitreje narašča s temperaturo. Če primerjamo vzorce na sliki 18, ki vsebujejo enake koncentracije heparina in različne % P407 opazimo, da imajo pri določenih temperaturah vzorci z večjo vsebnostjo P407 višjo viskoznost. Ker je pri vzorcih z večjo vsebnostjo P407 zmanjšana medmolekulska razdalja med heparinom in poloksamerom, so med njima možne številčnejše interakcije. Posledica tega je višja viskoznost.

Vpliv PBS

PBS poveča viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov, ker poveča ionsko moč medija, zaradi česar pride do izsoljevanja in medsebojnega povezovanja hidrofobnih segmentov poloksamera pri nižji temperaturi.

Vpliv poloksamera 188

Iz slike 18 je razvidno, da dodatek P188 zniža viskoznost termoreverzibilnega gela zaradi nastanka mešanih micelov.

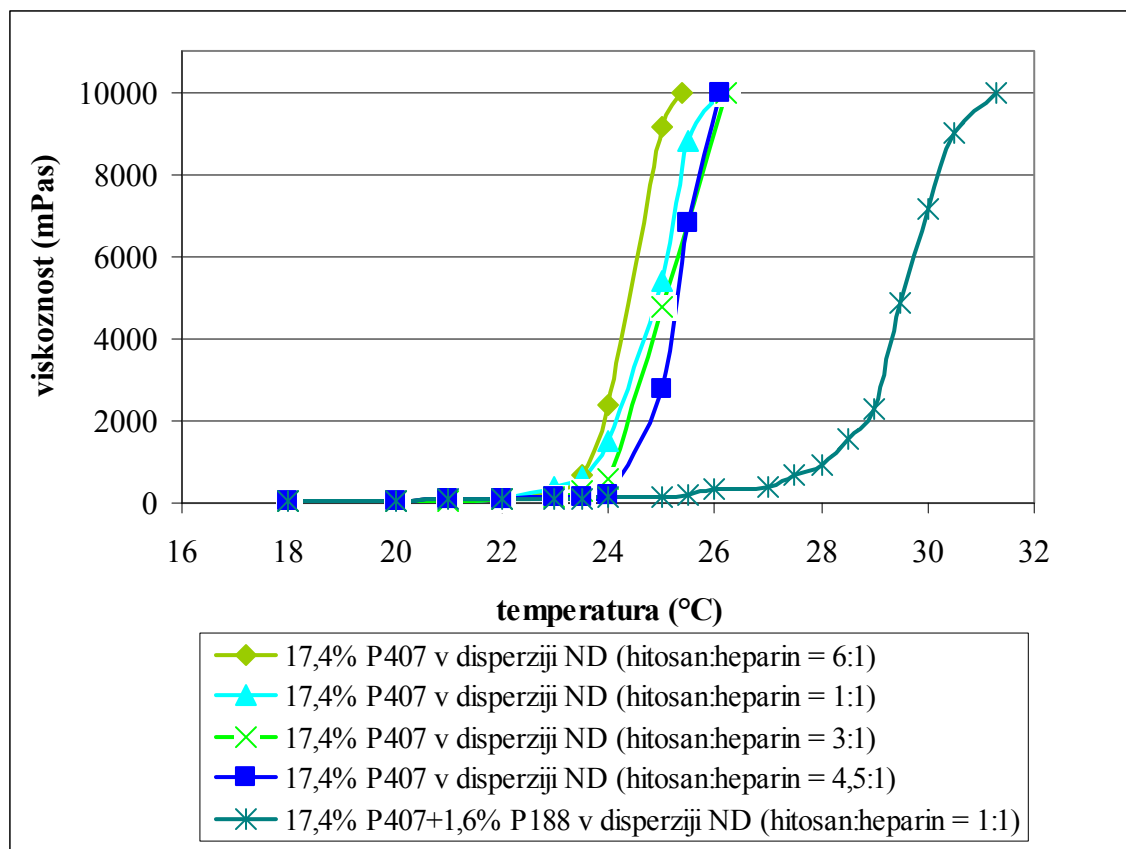
4.2.2.3 Medij: disperzija nanodelcev

Vpliv disperzije nanodelcev

Viskoznosti vzorcev gelov, ki vsebujejo 17,4% P407 in nanodelce z različnimi masnimi razmerji hitosana in heparina, se bistveno ne razlikujejo med seboj. Na sliki 19 lahko vidimo, da imajo od 18 - 23 °C zelo nizko viskoznost in se jim le ta minimalno povečuje, nato pa začne pri temperaturi višji od 23 °C strmo naraščati. Z naraščajočo temperaturo vodikove vezi med PPO deli poloksamera in vodo postanejo nestabilne in razpadejo, kar povzroči desolvatacijo. Polimerne verige se začnejo približevati, poveča se število interakcij med njimi. To se odraža na zvišanju viskoznosti (36).

Vpliv poloksamera 188

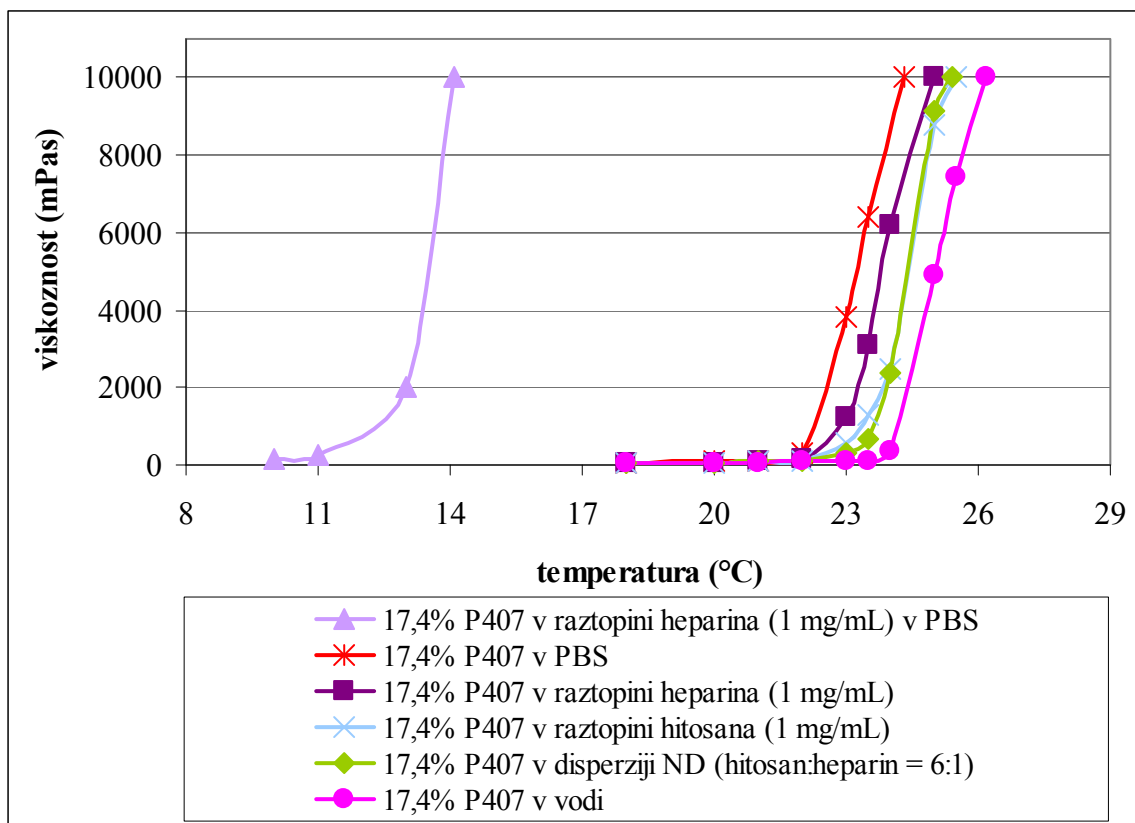
Če vzorcu 17,4% P407 v disperziji ND dodamo 1,6% P188, njegova viskoznost počasneje narašča s temperaturo (slika 19). Vzorec ima primerno viskoznost za podkožno injiciranje, saj ima nizko viskoznost pri sobni temperaturi.



Slika 19: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v disperzijah nanodelcev, v odvisnosti od temperature.

4.2.2.4 Medij: voda, PBS, raztopina heparina, raztopina hitosana, disperzija nanodelcev

Na sliki 20 so predstavljeni vzorci gelov, ki vsebujejo enak delež P407 (17,4%) in različne medije. Iz krivulj je razvidno, da dodatek PBS, heparina, hitosana in disperzije nanodelcev poviša viskoznost termoreverzibilnih gelov v primerjavi z vodo. Posebej zanimivo je, da viskoznost gela, ki vsebuje kot medij raztopino heparina v PBS, mnogo hitreje narašča s temperaturo v primerjavi z gelom, ki vsebuje PBS ali heparin - krivulja je pomaknjena v levo. Možno je, da med heparinom in PBS poteka sinergistično delovanje.

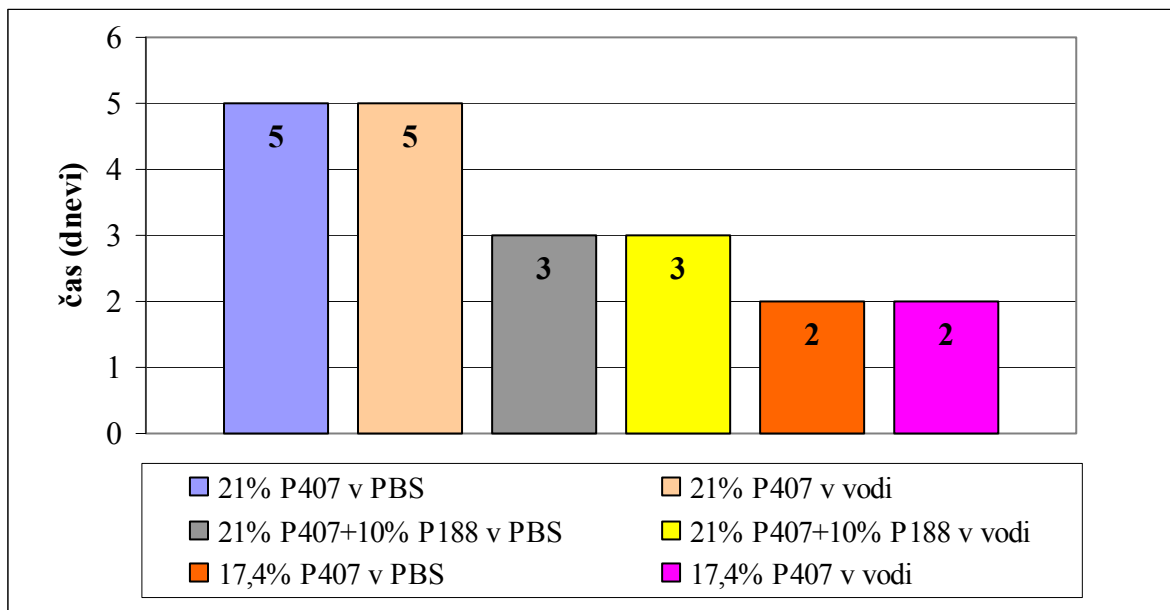


Slika 20: Vpliv medija na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov.

4.2.3 HITROST RAZTAPLJANJA TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

Ker ima heparin kratko razpolovno dobo, ga je treba večkrat injicirati. Da bi se izognili pogostemu injiciranju, smo poskušali pripraviti injektabilne termoreverzibilne hidrokele za podkožno aplikacijo, ki predstavljajo depo obliko. Ti novejši nosilni sistemi za vnos učinkovin v telo imajo prednosti, kot so zaščita učinkovine v fizioloških pogojih, nadzorovano sproščanje učinkovine, zmanjšanje neželenih učinkov, manjše število odmerjanj (37). V termostataranem inkubatorju (37 °C) smo določali hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov, potem ko smo 2 mL obarvane raztopine KCl nalili na 1 mL gela. Zanimalo nas je, koliko dni je potrebnih, da se raztopi 1 mL hidrogela in kako posamezne sestavine gelov vplivajo na hitrost raztapljanja.

4.2.3.1 Medij: voda in PBS



Slika 21: Hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v vodi ali PBS, v stiku z obarvano izotonično raztopino KCl. Na ordinati je prikazan čas (dnevi), ki je potreben, da se raztopi 1 mL gela.

Vpliv poloksamera 407

Z naraščajočo koncentracijo P407 je opaziti občutno zmanjšanje hitrosti raztapljanja gela. 1 mL gela, ki vsebuje 21% P407 v vodi, se v stiku z raztopino KCl raztopi v petih dneh, medtem ko se isti volumen gela 17,4% P407 v vodi raztopi že v dveh dneh (slika 21).

Z naraščajočo koncentracijo P407:

- je razdalja med miceli krajša in prav zaradi tega so med sosednjimi miceli mogoče številčnejše navzkrižne povezave – posledica teh povezav je nastanek večjih micelov,
- se povečuje število micelov na volumsko enoto,
- se povečuje viskoznost gela.

Pri višji koncentraciji P407 je struktura gela bolj rigidna zaradi povečanega števila in velikosti micelov. Iz tega lahko sklepamo, da raztapljanje gela najverjetneje zavirata povečana viskoznost gela in rigidnost gelske strukture (38).

Vpliv PBS

Choi in sodelavci so ugotovili, da dodatek natrijevega klorida, dinatrijevega hidrogenfosfata in natrijevega dihidrogen fosfata poveča čvrstost gela, ker tvorijo močne prečne vezi s poloksamerom (39). Glede na njihove ugotovitve bi pričakovali, da se bo gel, ki vsebuje PBS počasneje raztapljal v primerjavi z gelom, ki vsebuje vodo. Če primerjamo vzorce, ki vsebujejo enake % P407 in se razlikujejo le v vrsti medija (PBS ali voda) pa opazimo, da je hitrost raztapljanja gelov enaka (slika 21).

Vpliv poloksamera 188

Iz histogramov je razvidno, da dodatek P188 pospeši raztapljanje gelov (slika 21). Pri merjenju viskoznosti termoreverzibilnih hidrogelov smo ugotovili, da dodatek P188 k P407 zmanjša viskoznost gela. Predvidevamo, da lahko zaradi zmanjšane viskoznosti gela raztopina KCl hitreje prehaja skozi gelsko mrežo in ob tem pospeši raztapljanje gela.

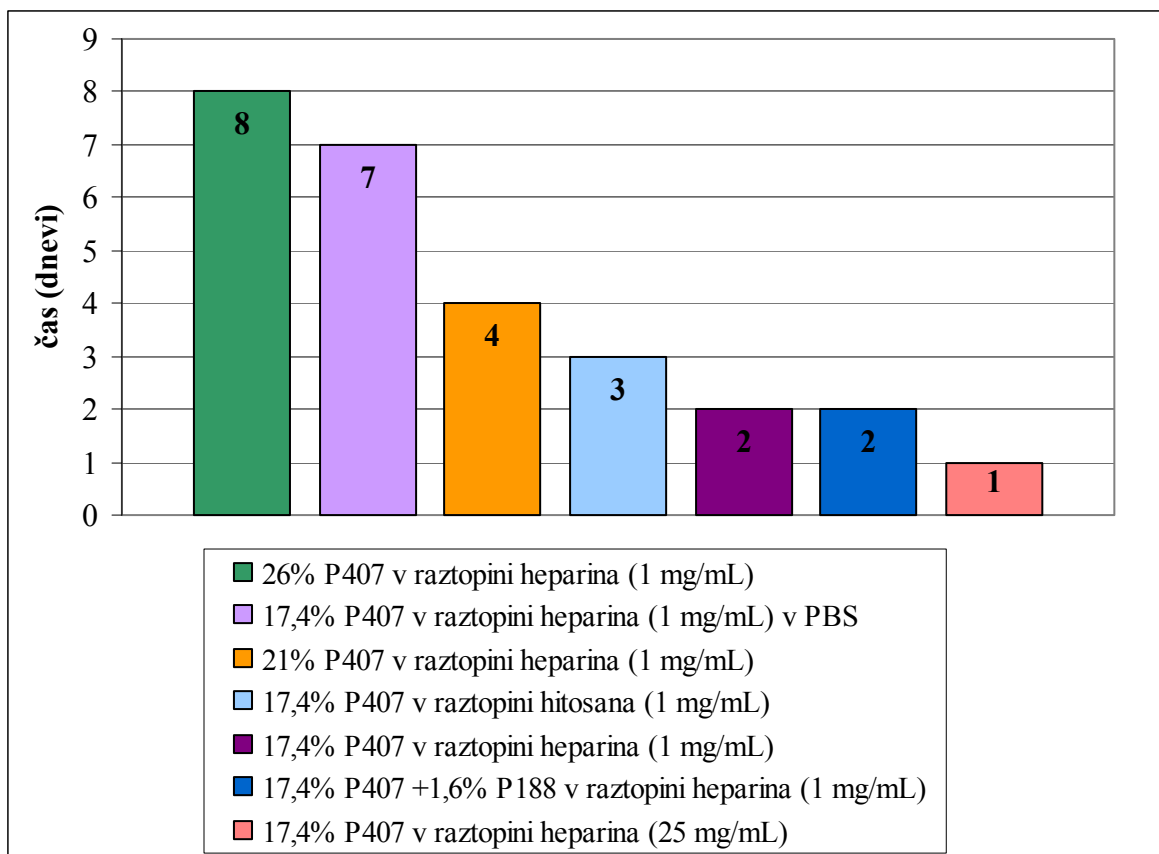
4.2.3.2 Medij: raztopina heparina in raztopina hitosana

Vpliv heparina

Iz naših rezultatov je razvidno (slika 22), da količina vgrajenega heparina vpliva na hitrost raztapljanja gela. Gel, ki vsebuje 25 mg/mL heparina, se raztopi v enem dnevu, medtem ko se gel z istim deležem P407 (17,4%) in koncentracijo heparina 1 mg/mL raztopi v dveh dneh. Iz naših rezultatov lahko sklepamo sledeče: višja je koncentracija heparina v gelu, hitrejše je raztapljanje gela.

Vpliv hitosana

Iz slike 22 je razvidno, da dodatek raztopine hitosana ($c = 1 \text{ mg/mL}$) upočasni raztapljanje gela v primerjavi z raztopino heparina iste koncentracije. Najverjetneje je vzrok počasnejšega raztapljanja večja molekulska masa hitosana (40).



Slika 22: Hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v raztopinah heparina ali hitosana, v stiku z obarvano izotonično raztopino KCl. Na ordinati je prikazan čas (dnevi), ki je potreben, da se raztopi 1 mL gela.

Vpliv poloksamera 407

Če primerjamo vzorce, ki vsebujejo enako koncentracijo heparina in se razlikujejo le v % P407, opazimo, da se vzorci, ki vsebujejo višji % P407 počasneje raztapljajo (slika 22). Vzrok za počasnejše raztapljanje je povečana viskoznost in rigidnost gela. Struktura gela, ki vsebuje 26% P407 je zelo čvrsta, saj se 1mL gela raztaplja 8 dni (slika 22). Ni zaželeno, da je gel preveč čvrst, ker se učinkovina iz njega ne more sproščati in vanj ne more prehajati raztopina KCl. V realnih pogojih bi to pomenilo, da bi se zaradi prevelike čvrstosti gela v določenih časovnih intervalih sprostil premalo heparina in ne bi prišlo do zaželenega farmakološkega učinka.

Vpliv poloksamera 188

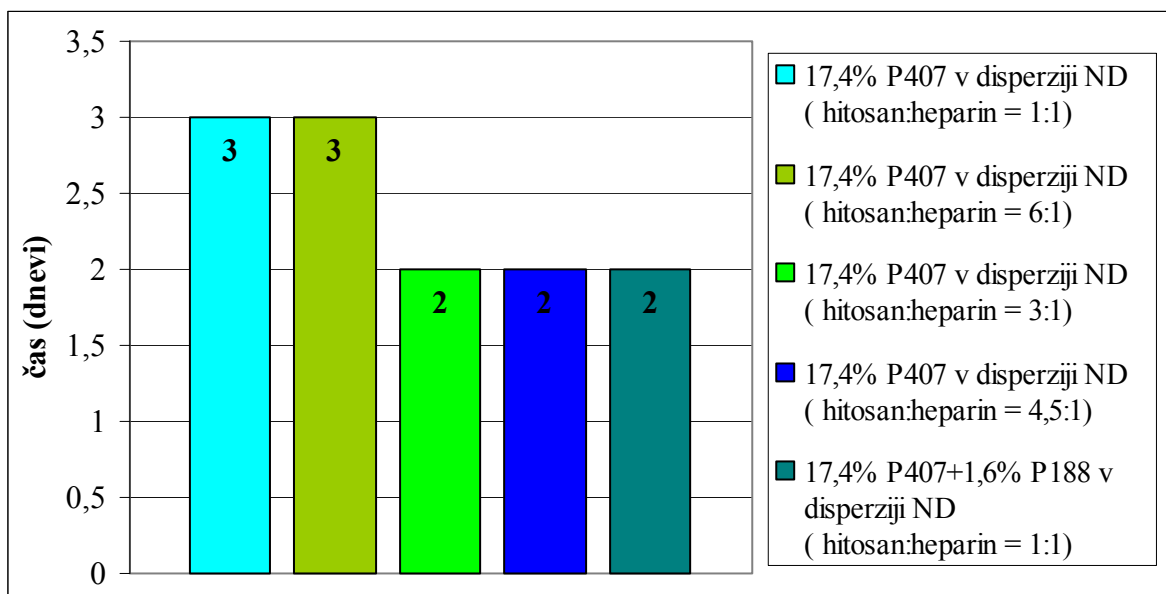
Pričakovali bi, da bo dodatek P188 povečal hitrost raztapljanja gela, saj zniža viskoznost gela. Zaradi manjše viskoznosti, bi raztopina KCl lažje prehajala skozi gelsko mrežo in

raztapljanje gela bi bilo pospešeno. Vendar, kot lahko vidimo na sliki 22, ni razlike v hitrosti raztapljanja med gelom, ki vsebuje samo 17,4% P407 in gelom, ki poleg P407 vsebuje še 1,6% P188.

Vpliv PBS

Vzorec 17,4% P407 v raztopini heparina s koncentracijo 1 mg/mL v PBS se mnogo počasneje raztaplja v primerjavi z vzorcem 17,4% P407 v raztopini heparina ($c = 1$ mg/mL) (slika 22). Vzrok za počasnejše raztapljanje je najverjetneje sinergistično delovanje heparina in PBS pufra.

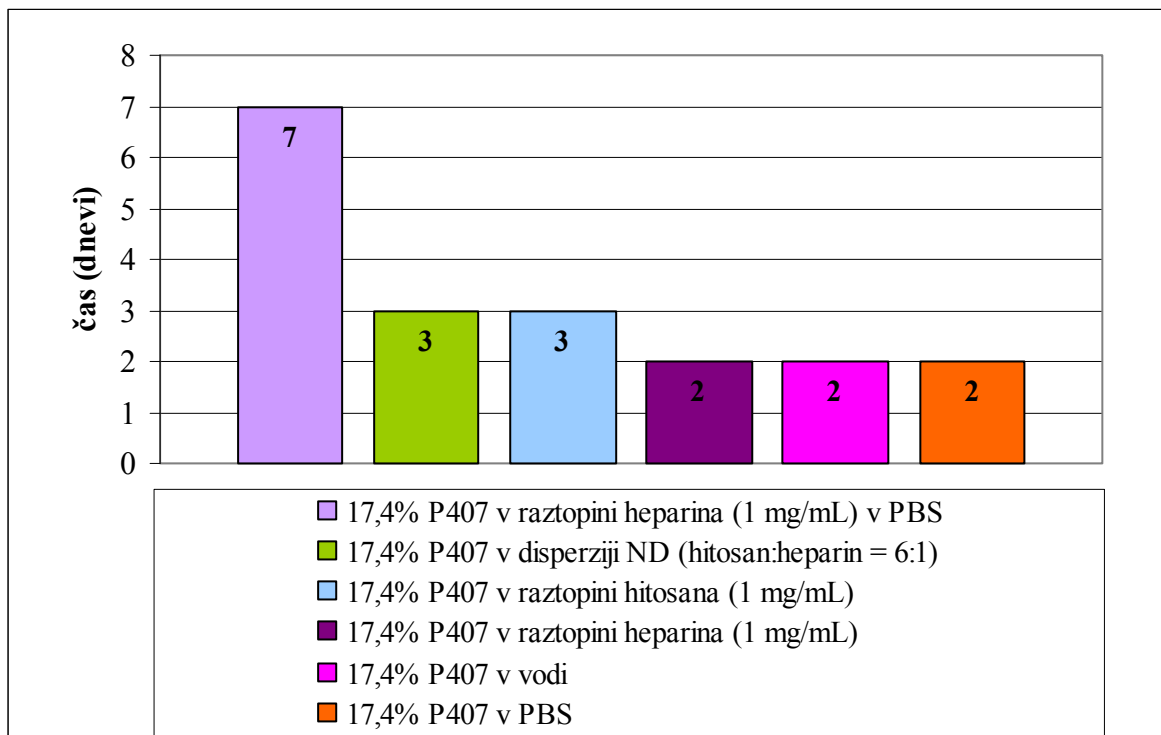
4.2.3.3 Medij: disperzija nanodelcev



Slika 23: Hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v disperzijah nanodelcev, v stiku z obarvano izotonično raztopino KCl. Na ordinati je prikazan čas (dnevi), ki je potreben, da se raztopi 1 mL gela.

Naš cilj je bil narediti takšen dostavni sistem za podkožno injiciranje, ki bo omogočal čim bolj enakomerno raztapljanje gelov s hitosanskimi nanodelci s heparinom skozi daljši časovni interval (nekaj dni). Iz rezultatov na sliki 23 je razvidno, da smo uspeli pripraviti termoreverzibilne hidrokele, ki se enakomerno raztapljajo skozi daljši čas (2-3 dni).

4.2.3.4 Medij: voda, PBS, raztopina heparina, raztopina hitosana, disperzija nanodelcev



Slika 24: Vpliv medija na hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov v stiku z obarvano izotonično raztopino KCl. Na ordinati je prikazan čas (dnevi), ki je potreben, da se raztopi 1 mL gela.

Na sliki 24 so predstavljene hitrosti raztapljanja gelov, ki vsebujejo enak delež P407 (17,4%) in različne medije. Iz histogramov je razvidno, da dodatek hitosana in disperzije nanodelcev upočasnijo raztapljanje gela v primerjavi z vodo. Posebej zanimivo je to, da dodatek heparina ali dodatek PBS ne upočasnijo raztapljanja gela v primerjavi z vodo. Če pa uporabimo kot disperzni medij raztopino heparina v PBS, se hitrost raztapljanja gela upočasnijo za več kot 3-krat v primerjavi z vodo. Najverjetneje je vzrok upočasnjenega raztapljanja sinergistično delovanje heparina in PBS pufra.

4.3 ANALITIKA HEPARINA

Poskušali smo razviti ustrezno analizno metodo, s katero bi določali koncentracijo sproščenega heparina iz termoreverzibilnega hidrogela v določenih časovnih intervalih.

Poskus sproščanja heparina iz termoreverzibilnih hidrogelov smo želeli izvesti v termostatanem inkubatorju (37 °C). V plastične epruvete z zamaškom, bi nalili po 1 mL hidrogelov ter jih vstavili v inkubator. Ko bi termoreverzibilni hidrogeli pri povišani temperaturi gelirali, bi v vsako epruveto dodali po 2 mL izotonične raztopine kalijevega klorida. V ustreznih časovnih intervalih (0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h) bi v mikrocentrifugirke vzorčili po 1 mL receptorskega medija, v katerega bi se sproščal heparin iz termoreverzibilnega hidrogela z nanodelci. Vsakič bi v epruvete nazaj vrnili tolikšen volumen, kot bi ga odvzeli. Nato bi vzorce centrifugirali 10 minut pri 10.000 x g pri temperaturi 4 °C. Po končanem centrifugiranju bi odpipetirali 0,5 mL supernatanta v vialo in dali vzorce analizirati na HPLC ali LC/MS. Iz dobljenih podatkov bi izračunali koncentracijo sproščenega heparina (mg/mL) v določenih časovnih intervalih.

4.3.1 HPLC

Sprva smo kot analizno metodo za določanje heparina uporabili HPLC - UV (kromatografijo visoke ločljivosti z UV detekcijo). Uporabili smo analitski sistem HPLC: Agilent 1100 Series, ki vključuje razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV - VIS detektor (gre za detektor tipa diode array - DAD). Dobili smo kromatograme, kjer je abscisa kromatograma predstavljal čas (min), ordinato pa absorbanca (mAU). Uporabili smo sledeče kolone:

1) Kolona: Phenomenex Luna NH₂, 150 x 3 mm, 3µm

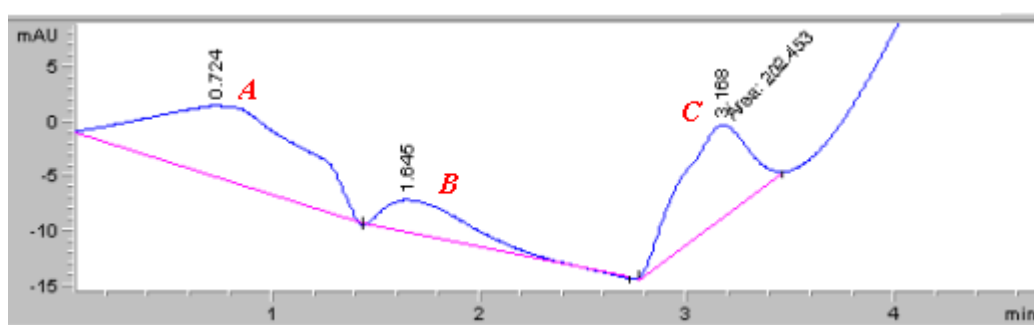
Parametri meritve:

- Pretok: 0,5 mL/min
- Volumen injiciranja: 20 µL
- Valovna dolžina detekcije: 210 nm

- Mobilna faza:
 - A: 10mM amonijev acetat (pH = 4,05)
 - B: 1M NaCl
- Gradient: predstavljen v preglednici I

Preglednica I: Gradient mobilne faze.

čas od začetka injiciranja (min)	% mobilne faze B
0,5	10
10,0	100



Slika 25: Kromatogram slepega vzorca (voda).

Kolona: Phenomenex Luna NH₂

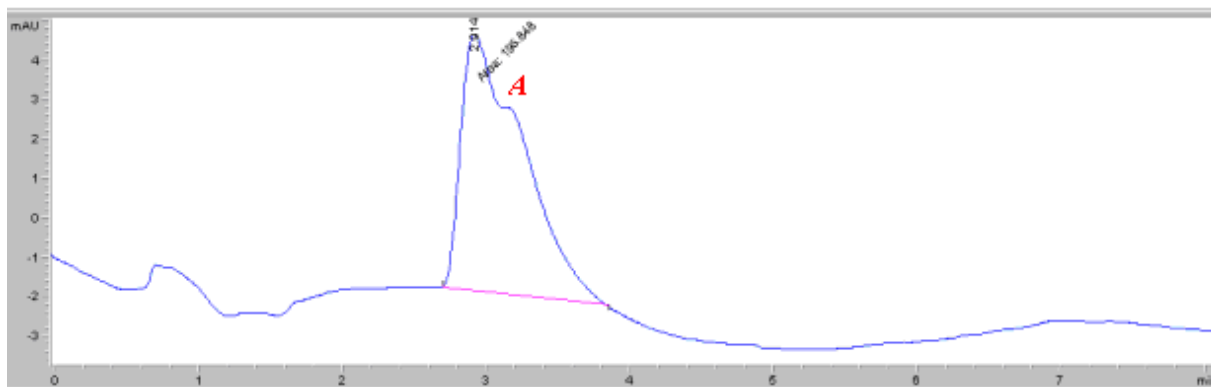
Mobilna faza A: 10mM amonijev acetat (pH = 4,05)

Mobilna faza B: 1M NaCl

Kromatografski vrhovi: **A** – voda (tr = 0,7 min)

B – nečistoče iz kolone (tr = 1,6 min)

C – nečistoče iz kolone (tr = 3,2 min)



Slika 26: Kromatogram raztopine heparina 0,5 mg/mL.

Kolona: Phenomenex Luna NH₂

Mobilna faza A: 10mM amonijev acetat (pH = 4,05)

Mobilna faza B: 1M NaCl

Kromatografski vrh: **A** – heparin (tr = 2,9 min); heparin ni homogena snov, zato tudi kromatografski vrh ni tak

Slepi vzorec (voda) ne sme imeti motečih vrhov pri retencijskem času heparina. Kot lahko vidimo na sliki 26, je retencijski čas heparina 2,9 min. Tudi slepi vzorec ima pri istem času odziv - najverjetneje nečistoče iz kolone prekrivajo vrh heparina.

2) Kolona: Chromolith Performance RP-8, 100 x 4,6 mm

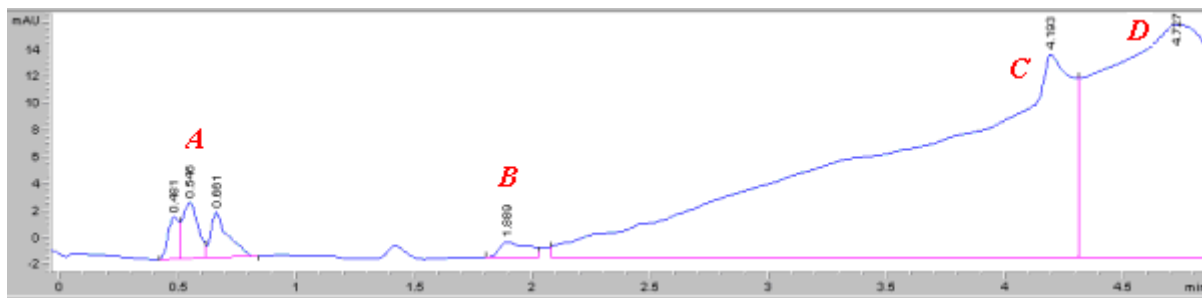
Gre za nepolarno stacionarno fazo, ki jo predstavlja polimerni nosilec prekrit s hidrofobnim slojem C8 verig.

Parametri meritve:

- Pretok: 3 mL/min
- Volumen injiciranja: 25 µL
- Valovna dolžina detekcije: 210 nm
- Mobilna faza:
 - A: voda
 - B: 98% acetonitril
- Gradient: predstavljen v preglednici II

Preglednica II: Gradient mobilne faze.

čas od začetka injiciranja (min)	% mobilne faze B
0	5
4,0	64
5,0	100



Slika 27: Kromatogram slepega vzorca (voda).

Kolona: Chromolith Performance RP-8

Mobilna faza A: voda

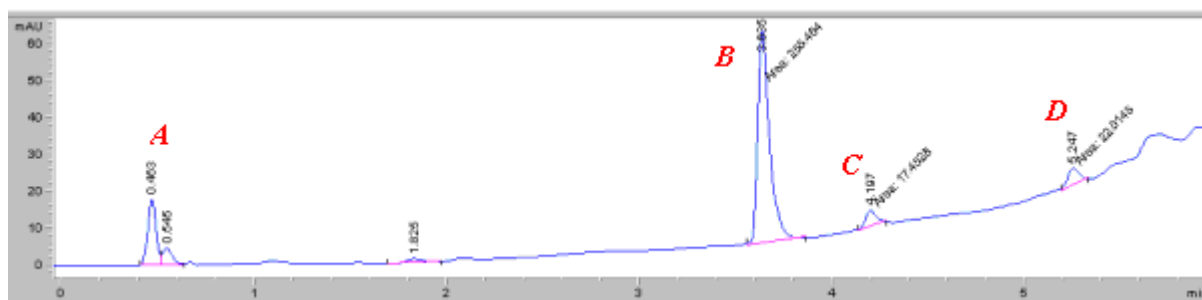
Mobilna faza B: 98% acetonitril

Kromatografski vrhovi: **A** – voda (tr = 0,5 - 0,7 min)

B – nečistoče iz kolone (tr = 1,9 min)

C – nečistoče iz kolone (tr = 4,2 min)

D – nečistoče iz kolone (tr = 4,7 min)



Slika 28: Kromatogram raztopine heparina (0,5 mg/mL) s klorkrezolom.

Kolona: Chromolith Performance RP-8

Mobilna faza A: voda

Mobilna faza B: 98% acetonitril

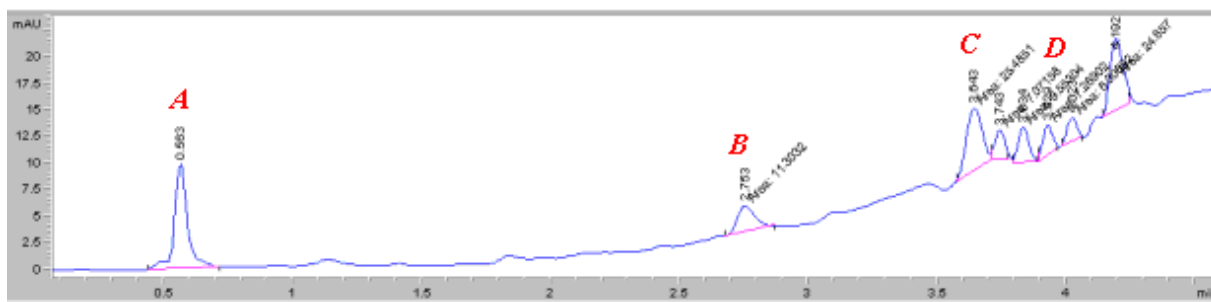
Kromatografski vrhovi: **A** – najverjetneje heparin (tr = 0,5 min)

B – klorkrezol (tr = 3,6 min)

C – verjetno nečistoče iz kolone (tr = 4,2 min)

D – verjetno nečistoče iz kolone (tr = 5,2 min)

Najvišji vrh pri 3,6 min je klorkrezol (to smo kasneje tudi potrdili s standardom klorkrezola), heparin pa se verjetno skriva v vrhu topila (vode) (slika 28). To sklepamo tudi glede na to, da je bil tam pri kasnejših LC-MS analizah.



Slika 29: Kromatogram receptorskega medija, v katerega smo sproščali heparin iz termoreverzibilnega hidrogela z nanodelci.

Kolona: Chromolith Performance RP-8

Mobilna faza A: voda

Mobilna faza B: 98% acetonitril

Kromatografski vrhovi: **A** – verjetneje heparin ($t_r = 0,6$ min)

B – verjetno nečistoče iz kolone ($t_r = 2,7$ min)

C – klorkrezol ($t_r = 3,6$ min)

D – verjetno različno dolgi fragmenti hitosana ($t_r = 3,7 - 4,2$ min)

Vrh pri 0,6 min je verjetno vrh heparina, vrh pri 3,6 min je klorkrezol (to smo kasneje tudi potrdili s standardom klorkrezola), vrhovi pri 3,7 min in naprej pa so verjetno različno dolgi fragmenti hitosana (slika 29).

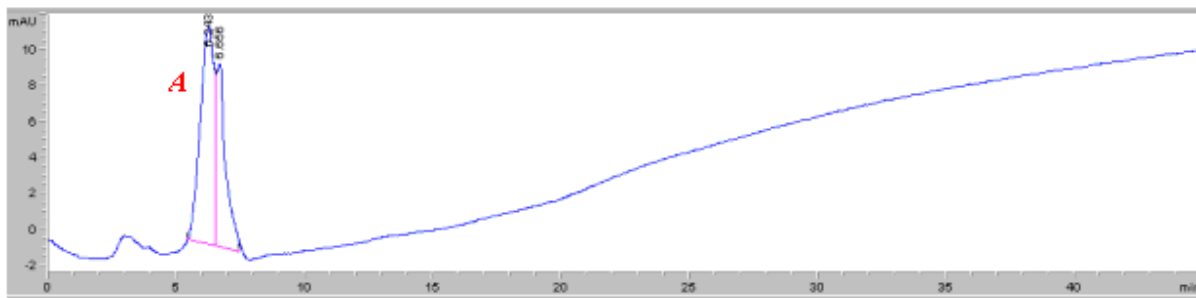
Iz dobljenih kromatogramov nismo uspeli točno določiti, kateri vrh pripada heparinu. Možno je, da se je heparin eluiral skupaj s topilom (vodo).

3) Kolona: Agilent Zorbax GF-250, 250 x 9,4 mm, 4,5 μ m

Kolona je primerna za vodotopne makromolekule. Ločevanje poteka na osnovi gelske izključitvene filtracije - glede na velikost molekul (ang. size exclusion chromatography).

Parametri meritve:

- Pretok: 1 mL/min
- Volumen injiciranja: 25 μ l
- Valovna dolžina detekcije: 195 nm
- Mobilna faza: voda



Slika 30: Kromatogram standardne raztopine heparina 0,5 mg/mL.

Kolona: Agilent Zorbax GF-250

Mobilna faza: voda

Kromatografska vrhova: **A** – najverjetneje višjemolekularni heparini ($t_r = 6,2$ min; $t_r = 6,6$ min)

Kot lahko vidimo na sliki 30, se bazna linija ni stabilizirala še 45 minut po injiciranju vzorca, kar morda pomeni, da se višjemolekularni heparini sicer hitro eluirajo (vrhova pri 6,2 in 6,6 min), nizkomolekularni pa ostanejo na koloni retenirani zelo dolgo.



Slika 31: Kromatogram slepega vzorca (voda).

Kolona: Agilent Zorbax GF-250

Mobilna faza: voda

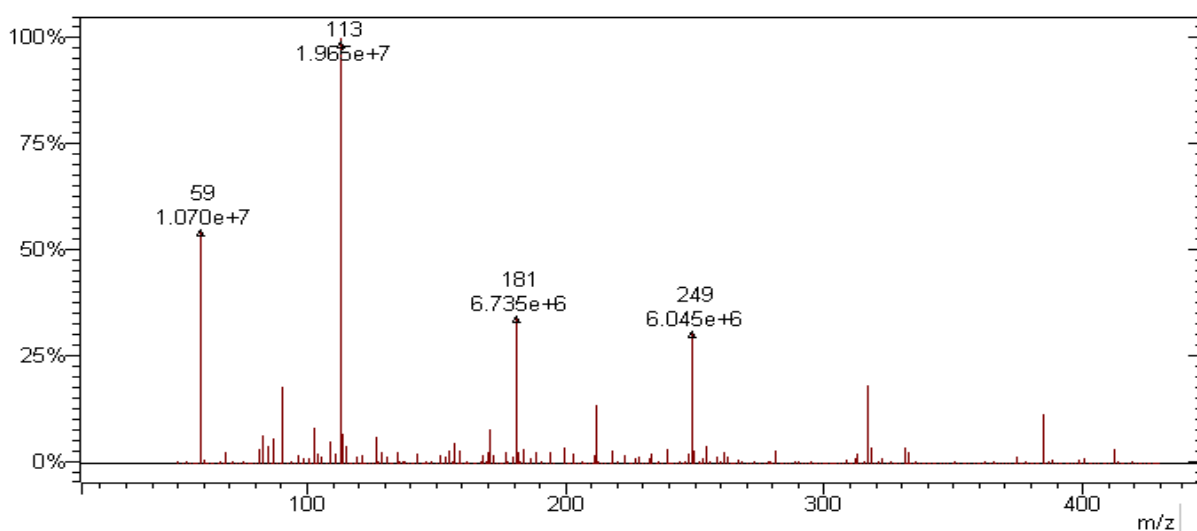
Kromatografski vrh: **A** – nečistoče iz kolone

Na koloni je bilo od njene prejšnje uporabe zelo veliko nečistoč, ki so ob vsakem injiciranju prihajale iz kolone in so močno absorbirale UV pri 195 nm, kar je preprečilo detekcijo heparina, ki pa zelo slabo absorbira UV. Če primerjamo sliki 30 in 31, vidimo, da kromatografski vrh A, ki smo ga dobili pri slepem vzorcu, prekriva vrh heparina in s tem onemogoča analizo.

4.3.2 LC/MS

Ker s HPLC nismo uspeli ločiti vrha heparina od ostalih vrhov, smo poskusili še z analizno metodo LC/MS – tekočinska kromatografija/masna spektrometrija. Uporabili smo masni detektor tipa trojni kvadrupol Varian 1200L sklopljen z Varianovim tekočinskim kromatografom visoke ločljivosti z binarno črpalko Prostar LC 210 in avtomatskim vzorčevalnikom Prostar 420.

Najprej smo posneli masni spekter standardne raztopine heparina, ki smo jo direktno in brez kolone infundirali v masni detektor. Makromolekula heparina je fragmentirala že v ionskem izvoru in največji odziv je dajal vrh pri $m/z = 113$ v negativnem načinu ionizacije (slika 32).



Slika 32: Masni spekter standardne raztopine heparina (0,5 mg/mL) direktno injicirane v LC- MS.

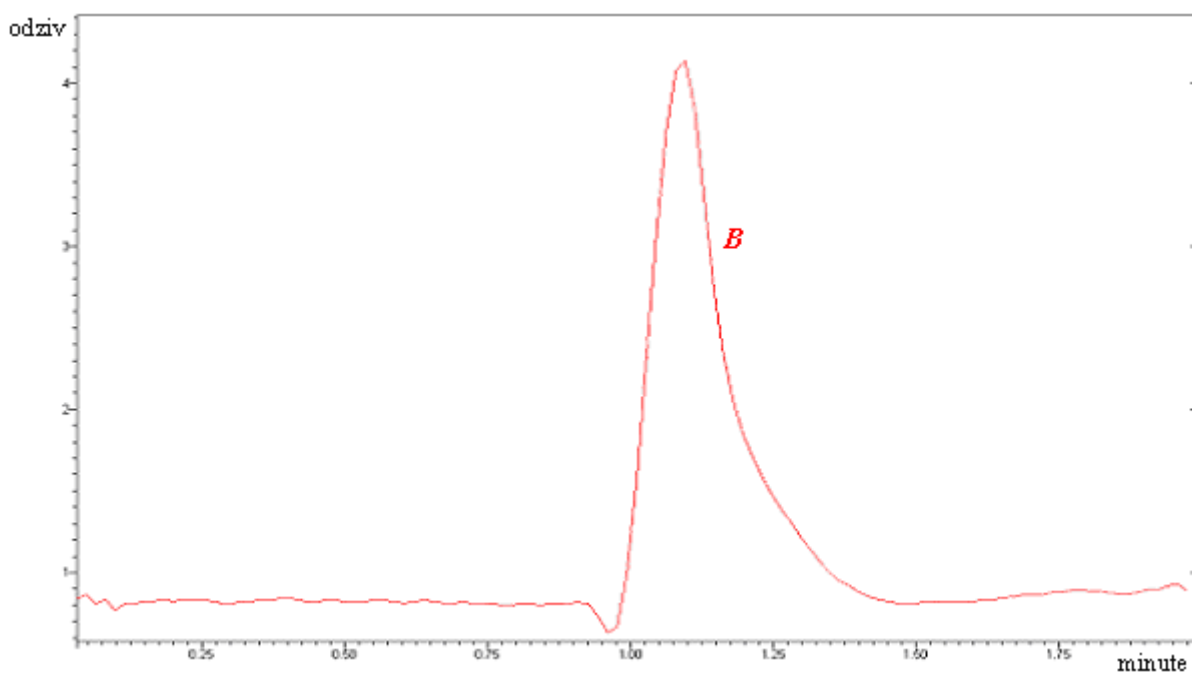
Nato smo posneli kromatogram slepega vzorca (voda), standardne raztopine heparina (0,5 mg/mL) in receptorskega medija, v katerega smo sproščali heparin iz termoreverzibilnega hidrogela z nanodelci. Dobili smo kromatograme, kjer je absciso grafa predstavljal čas (min), ordinato pa odziv (counts).

Kolona: Chromolith Performance RP-8, 100 x 4,6 mmParametri meritve:

- Pretok: 2 mL/min
- Volumen injiciranja: 5 μ L
- Mobilna faza:
 - A: 2 mM amonijev acetat (pH = 7,09)
 - B: 98% acetonitril
 - Gradient: predstavljen v preglednici III

Preglednica III: Gradient mobilne faze.

čas od začetka injiciranja (s)	% mobilne faze B
0	5
15	8
90	15



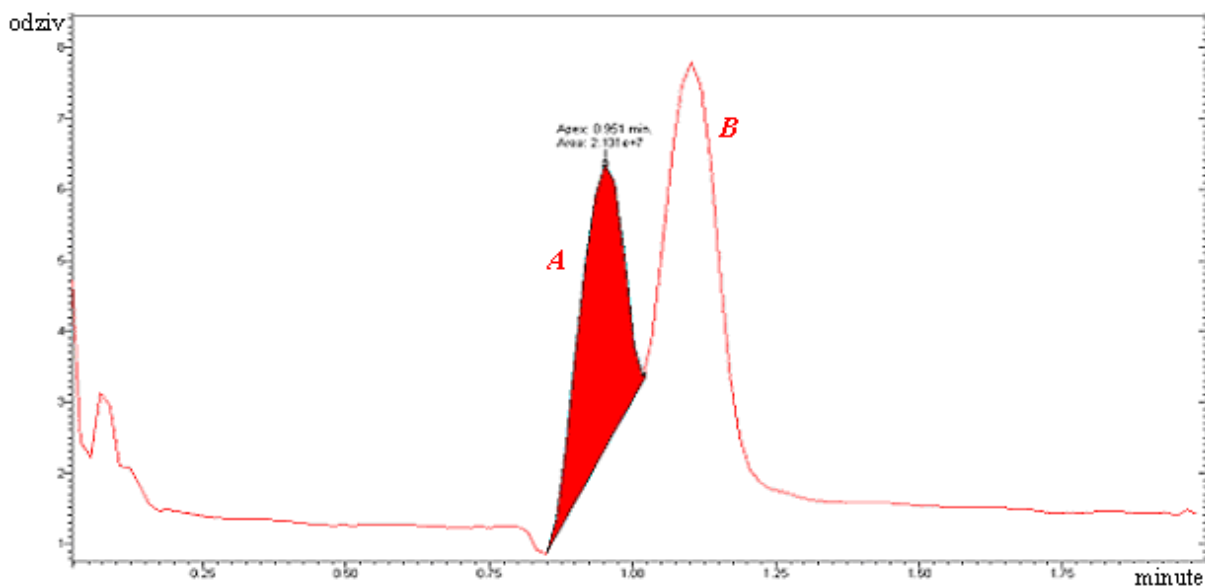
Slika 33: Kromatogram slepega vzorca (voda).

Kolona: Chromolith Performance RP-8

Mobilna faza A: 2 mM amonijev acetat (pH = 7,09)

Mobilna faza B: 98% acetonitril

Kromatografski vrh: **B** – najverjetneje nečistoče iz kolone (tr = 1,1 min)



Slika 34: Kromatogram standardne raztopine heparina (0,5 mg/mL).

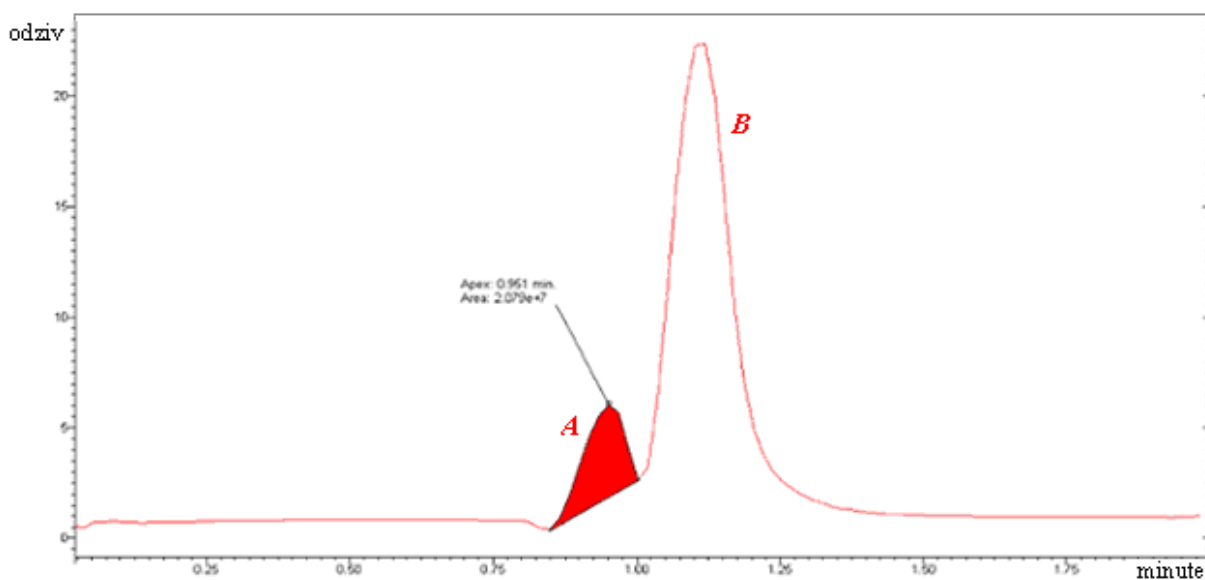
Kolona: Chromolith Performance RP-8

Mobilna faza A: 2 mM amonijev acetat (pH = 7,09)

Mobilna faza B: 98% acetonitril

Kromatografska vrhova: **A** – heparin (tr = 0,96 min)

B – najverjetneje nečistoče iz kolone (tr = 1,1 min)



Slika 35: Kromatogram receptorskega medija, v katerega smo sproščali heparin (0,0835 mg/ml) iz termoreverzibilnega hidrogela z nanodelci.

Kolona: Chromolith Performance RP-8

Mobilna faza A: 2 mM amonijev acetat (pH = 7,09)

Mobilna faza B: 98% acetonitril

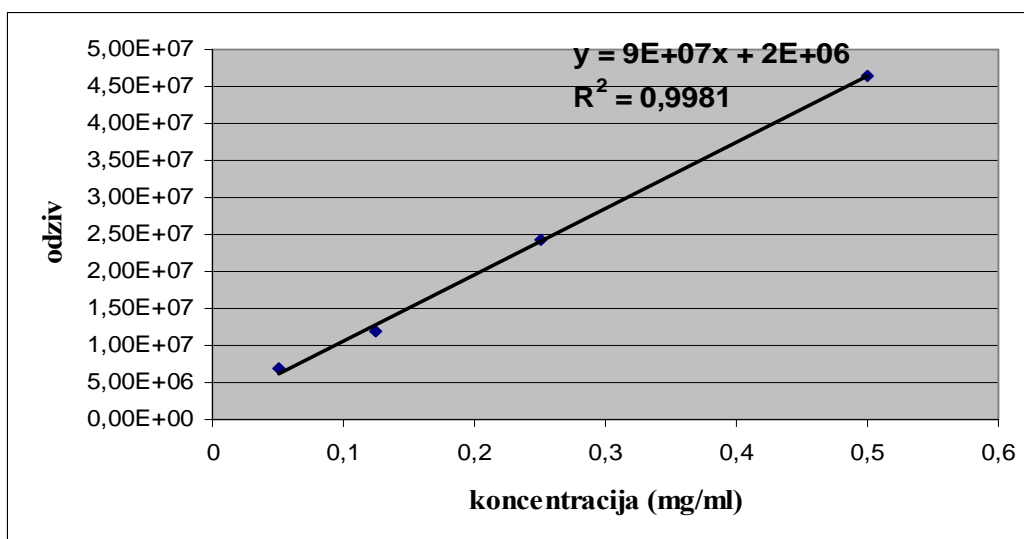
Kromatografska vrhova: **A** – heparin ($t_r = 0,96$ min); kasneje se je izkazalo, da predstavlja vrh A ne samo heparin, ampak tudi poloksamer 407 (sliki 37 in 38)

B – najverjetneje nečistoče iz kolone in snovi iz matriksa ($t_r = 1,1$ min)

Na sliki 34 in 35 vidimo po dva vrhova. Vrh pri času 0,96 min pripada heparinu, vrh desno od njega je enak kot pri slepem vzorcu (najverjetneje nečistoče iz kolone). Po injiciranju različnih vzorcev heparina smo opazili premosorazmerno odvisnost odziva od koncentracije heparina v vzorcu, zato smo lahko pripravili umeritveno premico.

Priprava umeritvene premice

Izhajali smo iz standardne raztopine heparina naslednjih koncentracij: 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL in 0,05 mg/mL. Analiziranim standardnim raztopinam smo izmerili površine pod kromatografskimi vrhovi in iz dobljenih podatkov izračunali umeritveno premico. Dobili smo umeritveno premico z visokim regresijskim koeficientom (slika 36).



Slika 36: Umeritvena premica: odvisnost odziva od koncentracije heparina.

Pred začetkom priprave vzorcev za sproščanje heparina iz termoreverzibilnih hidrogelov smo želeli še preveriti, kakšen je vpliv samega poloksamera 407. Pripravili smo vzorec

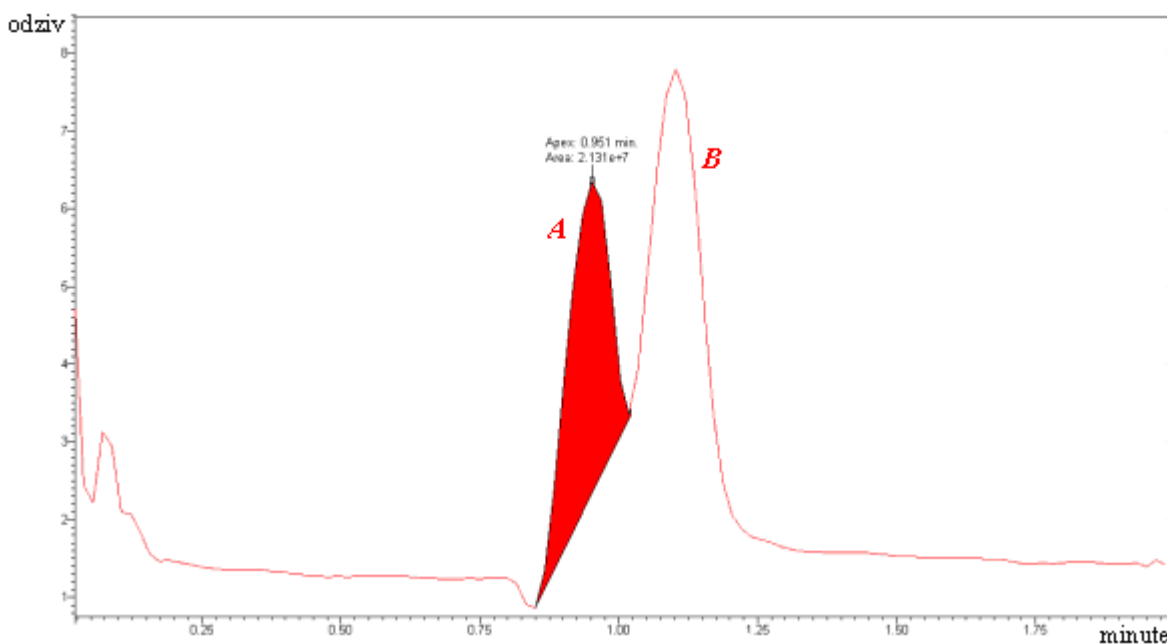
termoreverzibilnega hidrogela, ki ni vseboval hitosanskih nanodelcev s heparinom (vzorec 1) in vzorec s heparinom (vzorec 2).

Vzorec 1

Medij (izotonična raztopina KCl) + 17,4% poloksamer 407 v vodi.

Vzorec 2

Raztopina heparina s koncentracijo 0,0835 mg/mL.



Slika 37: Kromatogram receptorskega medija, v katerega smo sproščali poloksamer 407 iz termoreverzibilnega hidrogela brez nanodelcev (vzorec 1).

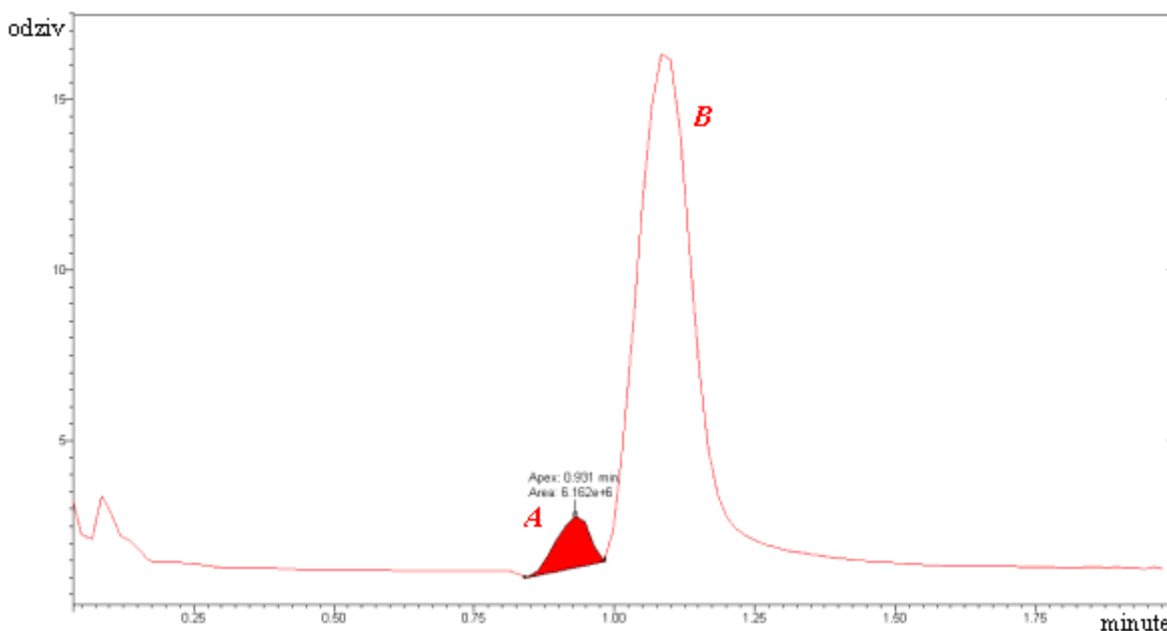
Kolona: Chromolith Performance RP-8

Mobilna faza A: 2 mM amonijev acetat (pH = 7,09)

Mobilna faza B: 98% acetonitril

Kromatografska vrhova: **A** – poloksamer 407 (tr = 0,96 min)

B – najverjetneje nečistoče iz kolone (tr = 1,1 min)



Slika 38: Kromatogram raztopine heparina s koncentracijo 0,0835 mg/mL (vzorec 2).

Kolona: Chromolith Performance RP-8

Mobilna faza A: 2 mM amonijev acetat (pH = 7,09)

Mobilna faza B: 98% acetonitril

Kromatografska vrhova: **A** – heparin (tr = 0,96 min)

B – najverjetneje nečistoče iz kolone (tr = 1,1 min)

Kot smo pričakovali, smo pri vzorcu s heparinom (vzorec 2) dobili kromatografski vrh pri 0,96 min (retencijski čas heparina). Predvidevali smo, da pri vzorcu, ki ne vsebuje heparina (vzorec 1), ne bomo dobili kromatografskega vrha pri času 0,96 min. Vendar, kot lahko vidimo na sliki 37, temu ni tako. Ugotovili smo, da poloksamer 407 prav tako kot heparin daje visok odziv pri signalu $m/z = 113$, ter da imata poloksamer in heparin enak retencijski čas. Noben izmed ostalih signalov (m/z), ki smo jih dobili pri masnem spektru standardne raztopine heparina (slika 32), ni dajal dovolj velik odziv, ki bi se ga dalo kvantificirati.

Kljub temu, da nam analizne metode za kvantifikacijo heparina ni uspelo razviti, smo prišli do določenih spoznanj, ki bodo pomagala pri nadaljnjem razvoju metode.

5. SKLEP

V prvem delu diplomske naloge smo z metodo samoasociiranja nasprotno nabitih polielektrolitov izdelali hitosanske nanodelce s heparinom v različnih masnih razmerjih.

- ❖ Pri vseh masnih razmerjih so nastali delci nanometrskih velikosti. Izdelani nanodelci so imeli povprečni premer v območju 150-210 nm.
- ❖ Zeta potencial nanodelcev je bil med -35 do 45 mV. Ker so imeli nanodelci visoke vrednosti zeta potenciala, so bile disperzije fizikalno stabilne.
- ❖ Polidisperzni indeks nanodelcev je bil med 0,20-0,25, kar kaže na precejšnjo homogenost vzorcev oziroma prisotnost delcev podobnih velikosti.
- ❖ Disperzije nanodelcev so bile fizikalno stabilne v obdobju dveh tednov, saj se njihova velikost, vrednosti ZP in PI v tem času niso bistveno spreminjale.
- ❖ Na nastanek nanodelcev vpliva masno razmerje med hitosanom in heparinom. Z večanjem masnega razmerja na račun hitosana so nastajali večji nanodelci z višjo vrednostjo ZP. Prišli smo do spoznanja, da so masna razmerja med posameznimi sestavinami nanodelcev pomembna, saj vplivajo na velikost in zeta potencial delcev ter s tem na fizikalno stabilnost disperzij.

V drugem delu naloge smo izdelali termoreverzibilne hidrogelne iz poloksamera 407 in kombinacije poloksamerov 407 in 188 za podkožno aplikacijo. Kot medij za izdelavo hidrogelov smo uporabili prečiščeno vodo, PBS, raztopine heparina in hitosana, ter disperzije nanodelcev. Hidrogelom smo določili temperaturo geliranja, viskoznost in hitrost raztapljanja.

- ❖ Višje koncentracije poloksamera 407 znižajo temperaturo geliranja, povišajo viskoznost in upočasnijo raztapljanje gela. Raztapljanje gela je upočasnjeno zaradi povečane viskoznosti gela in rigidnosti gelske strukture.
- ❖ Dodatek P188 k P407 zmanjša viskoznost, pospeši raztapljanje gelov in poviša temperaturo geliranja, najverjetneje zaradi nastanka mešanih micelov.
- ❖ PBS zniža temperaturo geliranja v primerjavi z vodo, ker poveča ionsko moč medija zaradi česar pride do izsoljevanja.

- ❖ Heparin zniža temperaturo geliranja v primerjavi z vodo, kar nakazuje, da heparin pospešuje micelizacijo in združevanje micelov. Stopnja združevanja micelov je še bolj izrazita z naraščajočo koncentracijo dodanega heparina. Višja je koncentracija heparina, nižja je temperatura geliranja.
- ❖ Hitosan zniža temperaturo geliranja, poveča viskoznost in upočasni raztapljanje gelov v primerjavi z vodo.
- ❖ Heparin in PBS delujeta sinergistično pri znižanju temperature geliranja, povišanju viskoznosti in upočasnitvi raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov iz P407.
- ❖ Z izbiro ustreznega medija, koncentracije in vrste poloksamera lahko vplivamo na temperaturo geliranja, viskoznost in hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov.
- ❖ Zaključimo lahko, da nam je uspelo izdelati termoreverzibilni hidrogel, iz 17,4% P407+1,6% P188 v disperziji nanodelcev (hitosan:heparin = 1:1), ki ima ustrezno viskoznost in temperaturo geliranja za podkožno aplikacijo.

V zadnjem delu diplomske naloge smo poskušali razviti ustrezno analizo metodo za kvantifikacijo heparina. Kljub temu, da nam analize metode ni uspelo razviti, smo prišli do določenih spoznanj, ki bodo pomagala pri nadaljnjem razvoju analize metode.

- ❖ Heparin zelo slabo absorbira UV svetlobo in ne fluorescira, zato ga je zelo težko zaznati s HPLC detektorji.
- ❖ Heparin je zelo hidrofilna molekula in se zaradi tega zelo nerada zadrži na reverzno faznih kolonah.
- ❖ Separacija z izključitveno kromatografijo oziroma z gelskimi kolonami se ni izkazala za primerno, ker je heparin zmes več makromolekul z različnimi dolžinami verig, kar daje različne in razvlečene vrhove, ki se jih težko kvantificira in težko spere iz gelske kolone.
- ❖ Masni detektor bi utegnil biti primeren za detekcijo heparina, če bi uspeli doseči ločbo od poloksamera, ki je dajal enak m/z signal, kar je onemogočalo kvantifikacijo heparina ob njegovi prisotnosti v vzorcu.
- ❖ Razvoj metode za detekcijo heparina bi lahko vključeval metodo s tvorbo ionskih parov s katero bi lahko izboljšali retencijo heparina. Druga možnost bi bila

derivatizacija heparina, s čimer bi mu lahko povečali lipofilnost ali pa izboljšali UV absorpcijo ali oboje.

6. LITERATURA

1. Štrukelj B., Kos J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2007: 210-247.
2. Obermajer N., Kos J., Kristl J. Nanodelci: sodobni dostavni sistemi za učinkovine in antigene celicam imunskega sistema. *Farm Vestn* 2007; 58: 39-44.
3. Malvern Instruments Ltd. Size theory. Zetasizer Nano User Manual. MAN0317; 2008: 14-1 do 14-6.
4. <http://www.ijs.si/ijs/dept/epr/Biofizika/06%20in%2007-Samoorganizacija.pdf>; dostopano: december 2010.
5. Malvern Instruments Ltd. Zeta Potential theory. Zetasizer Nano User Manual. MAN0317; 2008: 16-1 do 16-11.
6. Hamman J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar Drugs* 2010; 8: 1305-1322.
7. Kerec Kos M. Uporaba hitosana v farmaciji. *Farm Vestn* 2006; 57: 287-291.
8. Lin Y. H., Chang C. H., Wu Y. S., Hsu Y. M., Chiou S. F., Chen Y. J.: Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Biomaterials* 2009; 30: 3332-3342.
9. Rang H. P., Dale M: M., Ritter J. M. *Pharmacology*. Churchill Livingstone, Fourth Edition, Edinburgh, 1999: 310-327.
10. <http://www.zdravila.net> (Heparin Krka 5.000 i.e./1 mL raztopina za injiciranje, SPC); dostopano: december 2010.

11. <http://en.wikipedia.org/wiki/Heparin>; dostopano: januar 2011.
12. Hirsh J., Fuster V., Ansell J., Halperin JL. American heart association/american college of cardiology foundation guide to warfarin therapy. *Circulation* 2003; 107: 1692-1711.
13. Šmitek J. Parenteralno dajanje zdravil – intramuskularna injekcija. *Obzor Zdr N* 2005; 39: 63-71.
14. Baixeli V. M., Negri M. Anatomija človeka - naravoslovni atlas, Mladinska knjiga, Ljubljana, 1986: 72.
15. Van Tomme S. R., Storm G., Hennink W. E. *In situ* gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Pharm* 2008; 355: 1-18.
16. Pavli M. Načrtovanje, izdelava in vrednotenje ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem na osnovi naravnih polimerov. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010.
17. Escobar-Chávez J. J., López-Cervantes M., Naik A. et al. Applications of thermoreversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci* 2006; 3: 339-358.
18. <http://www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/poloxamers-and-their-applications-0>; dostopano: januar 2011.
19. Dumortier G., Grossiord J. L., Agnely F., Chaumeil J. C. A review of Poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res* 2006; 23: 2709-2728.
20. Lutrol® L and Lutrol F-grades. Technical information. BASF 2010.
21. Poloxamers (1). BASF ExAct, 1999; 3: 5-9.

22. Lutrol® F 127. Technical information. BASF 2008.
23. Vaje iz fizikalne farmacije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2003, 39-52.
24. Zupančič Valant A. Uvod v reologijo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2007, 15-29, 93-97.
25. http://www.azom.com/Details.asp?ArticleID=3939#_What_is_Multipurpose_Titrator%20MPT2; dostopano: februar 2011.
26. Wei G., Ding P. T., Li S. M., Zheng J. M. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. *J Control Release* 2002; 83: 65-74.
27. Čerpnjak K. Vrednotenje koloidnih sistemov z lecitinom za dermalno aplikacijo askorbilpalmitata. *Diplomska naloga*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010.
28. Liu Z., Jiao Y., Liu F., Zhang Z. Heparin/chitosan nanoparticle carriers prepared by polyelectrolyte complexation. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83A: 806-812.
29. Yong C. S., Choi S. J., Quan Q. et al. Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium. *Eur J Pharm Sci* 2001; 226: 195-205.
30. Hoare T. R., Kohane D. S. Hidrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 2008; 49: 1993-2007.
31. Meenakshi P., Hetal T., Kasture P. V. Preparation and evaluation of thermoreversible formulations of flunarizine hydrochloride for nasal delivery. *Int J Pharm Pharm Sci* 2010; 2: 116-120.

32. Ricci E. J., Bentley M. V. L. B., Farah M., Breatas R. E. S., Marchetti J. M. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. *Eur J Pharm Sci* 2002; 17: 161-167.
33. Chung. Y., Lee S. Y., Tae G. The effect of heparin on the gellation of Pluronic F-127 hydrogel. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp* 2006; 284-285: 480-484.
34. Lee S. Y, Tae G., Ha Kim Y. Accelerated Micellization and Aggregation of Pluronic Micelles by Interaction with Heparin. *J Biomater Sci* 2010; 21: 727-739.
35. Artzner F., Geiger S., Olivier A. et al. Interactions between Poloxamers in Aqueous Solutions: Micellization and Gelation Studied by Differential Scanning Calorimetry, Small Angle X-ray Scattering, and Rheology. *Langmuir* 2007; 23: 5085-5092.
36. Lee K. Y., Cho C. W., Lee Y. B et al. Rheological Behavior of Poloxamer 407 Solution and Effect of Poly(ethylene glycol) on the Gelation. *J. Kor. Pharm. Sci.* 2003; 33: 15-19.
37. Cegnar M., Kristl J. Dostavni sistemi nanometrskih velikosti za vnos proteinov in genov. *Med Razgl* 2005; 44: 447-462.
38. Bhardwaj R., Blanchard J. Controlled-Release Delivery System for the α -MSH Analog Melanotan-I Using Poloxamer 407. *J Pharm Sci* 1996; 85: 915-919.
39. Choi H. G., Lee M. K., Kim M. H., Kim C. K. Effect of additives on the physicochemical properties of liquid suppository bases. *Int J Pharm* 1999; 190: 13-19.
40. Desai S. D., Blanchard J. In Vitro Evaluation of Pluronic F127-Based Controlled-Release Ocular Delivery Systems for Pilocarpine. *J Pharm Sci* 1998; 87: 226-230.