

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



UROŠ ŠINKOVEC

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



UROŠ ŠINKOVEC

IZDELAVA IN VREDNOTENJE ALGINATNIH
MIKRODELCEV S PROTEINSKO UČINKOVINO

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF ALGINATE
MICROPARTICLES WITH PROTEIN DRUG

Ljubljana, 2012

Diplomsko naložbo sem opravljal v farmacevtski družbi Lek d.d., v Razvojnem centru Slovenija na področju Farmacevtska tehnologija v skupini Novi dostavní sistemi, pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Mateje Cegnar, mag. farm..

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Janezu Kerču, mag. farm. za napotke in pomoč pri delu, somentorici doc. dr. Mateji Cegnar, mag. farm. za strokovne nasvete pri eksperimentalnem delu in Ani Miklavžin za nesebično pomoč pri delu v laboratoriju.

Posebno zahvalo namenjam tudi moji Niki in družini, ki so me vseskozi spodbujali in podpirali tokom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorice doc. dr. Mateje Cegnar, mag. farm..

Uroš Šinkovec

KAZALO VSEBINE

POVZETEK: III

ABSTRACT: IV

SEZNAM OKRAJŠAV: V

1. UVOD - 1 -

1.1 PROTEINI - 1 -

1.1.1 Osnove - 1 -

1.1.2 Problemi peroralnega vnosa proteinov v telo - 1 -

1.2 MIKROKAPSULE - 2 -

1.2.1 Definicija in razdelitev mikrokapsul - 2 -

1.2.2 Materiali in metode izdelave mikrokapsul - 3 -

1.2.3 Mehanizmi sproščanja učinkovine iz mikrokapsul - 6 -

1.3 POLIMERNI HIDROGELI - 6 -

1.3.1 Alginat - 7 -

1.3.2 Mehanizem tvorbe alginatnega gela - 8 -

1.3.3 Fizikalne lastnosti alginata - 9 -

1.3.4 Sproščanje ZU iz alginatnih mikrodelcev - 10 -

1.4 SPLOŠNO O METODAH - 11 -

1.4.1 Liofilizacija - 11 -

1.4.2 UV/VIS absorpcijska spektroskopija - 12 -

1.4.3 Gelska elektroforeza - 13 -

1.4.4 SEM – vrstična elektronska mikroskopija - 13 -

2. NAMEN DELA - 15 -

3. MATERIALI IN METODE - 16 -

3.1 MATERIALI - 16 -

3.2 APARATURE - 19 -

3.3 METODE - 19 -

3.3.1 Umeritvene premice BSA - 19 -

3.3.2 Priprava raztopin - 22 -

3.3.3 Priprava placebo mikrodelcev - 23 -

3.3.4 Priprava mikrodelcev z BSA - 23 -

3.3.5 Liofilizacija - 24 -

3.3.6 Sušenje na zraku	- 24 -
3.3.7 Morfološko vrednotenje mikrodelcev z SEM mikroskopom	- 24 -
3.3.8 Morfološko vrednotenje in merjenje velikosti MD pod optičnim mikroskopom	- 24 -
3.3.9 Vgrajevanje proteina v mikrodelce	- 25 -
3.3.10 Sproščanje BSA iz MD v različnih medijih	- 26 -
3.3.11 UV/VIS analiza vzorcev z BSA pri sproščanju BSA iz mikrodelcev	- 26 -
3.3.12 Izračun koncentracije in mase BSA	- 27 -
3.3.13 Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza s sistemom Novex®	- 27 -
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	- 29 -
4.1 DOLOČITEV OPTIMALNIH POGOJEV IZDELAVE ALGINATNIH MIKRODELCEV.....	29 -
4.1.1 Vpliv procesnih parametrov izdelave na morfologijo MD – Alginat 40G	- 29 -
4.1.2 Vpliv procesnih parametrov izdelava na morfologijo MD – Alginat 70G	- 34 -
4.1.3 Optična mikroskopija mikrodelcev	- 38 -
4.1.4 SEM mikrodelcev	- 41 -
4.1.5 Merjenje velikosti alginatnih mikrodelcev pod optičnim mikroskopom	- 42 -
4.2 VGRADNJA IN SPROŠČANJE GOVEJEGA SERUMSKEGA ALBUMINA (BSA) IZ ALGINATNIH MIKRODELCEV	47 -
4.2.1 Vgradnja BSA v mikrodelce	- 47 -
4.2.2 Sproščanje BSA iz alginatnih mikrodelcev v 10x PBS pufru	- 48 -
4.2.3 Sproščanje BSA iz alginatnih mikrodelcev v 1x PBS pufru	- 51 -
4.2.4 Sproščanje BSA iz alginatnih mikrodelcev v mediju s spremembou pH	- 53 -
4.2.5 Izdelava in analiza izbrane formulacije alginatnih mikrodelcev	- 55 -
4.2.5.1 Velikost mikrodelcev	- 55 -
4.2.5.2 Sproščanje BSA iz alginatnih mikrodelcev v mediju s spremembou pH	- 57 -
4.2.5.3 NaDS-PAGE elektroforeza	- 58 -
4.2.5.4 Sproščanje BSA iz alginatnih mikrodelcev z dodatkom pospeševalcev sproščanja v mediju s spremembou pH (pH 3,0 → pH 7,0)	- 59 -
5. SKLEPI	- 61 -
6. LITERATURA	- 62 -

POVZETEK:

Mikrodelci (MD) so majhni, trdni delci veliki od 1-2000 µm. Ogrodne snovi so največkrat naravni ali sintezi polimeri. Eden od naravnih polimerov je polisaharid alginat, ki tvori dve vrsti gelov: kislinski gel v kislem in ionotropni gel v prisotnosti večvalentnih ionov.

V prvem delu eksperimentalnega dela smo izdelali MD z vibrirajočo membrano, kjer nastale alginatne kapljice gelirajo v raztopini premreževalca. Proučevali smo vplive velikosti šobe (150 µm, 250 µm, 500 µm), vrste alginata (40G in 70G), koncentracije alginata (2,0 % in 2,5 %), koncentracije premreževalca CaCl_2 (0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,5 M) ter načina sušenja MD (liofilizacija ali sušenje na zraku) na morfologijo in velikost MD s pomočjo optične in vrstične elektronske mikroskopije. Ugotovili smo, da velikost šobe, vrsta sušenja in koncentracija alginata najbolj vplivajo na velikost in morfologijo MD. Pričakovano smo pri večji šobi in večji koncentraciji alginata dobili večje MD (1500 µm), kot pri manjši šobi in nižji koncentraciji alginata (350 µm). Liofilizacija je ohranila začetno velikost MD in jih naredila bolj porozne, medtem ko so bili na zraku sušeni MD manjši, njihova površina pa je bila bolj zalita (gladka).

V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo goveji serumski albumin (BSA) vgrajevali v alginatno ogrodje s pomočjo 250 µm šobe in proučevali vplive medija za sproščanje (10x PBS ("phosphate buffered saline"), 1x PBS, medij s sprememboto pH), vrste alginata, koncentracije premreževalca (0,1 M in 0,5 M), liofilizacije MD ter dodatka pomožnih snovi (razgrajevalo Ac-Di-Sol in površinsko aktivna snov n-decil-maltopiranozid) na sproščanje BSA iz MD. Učinkovitost vgradnje proteina v MD je bila med 50 in 80 %; višja je bila pri uporabi bolj premreženega alginata 70G v raztopini z višjo koncentracijo CaCl_2 0,5 M. Vsi proučevani parametri so vplivali na količino sproščenega BSA iz MD. V pufru s povišano ionsko močjo (10x PBS) se je sprostilo 20-50 % proteina, največ pri manj premreženih in sveže izdelanih MD. V pufru s fiziološko osmolarnostjo (1x PBS) se je sprostilo manj vgrajenega proteina (10-40 %), največ iz manj premreženih in liofiliziranih MD. Pri najbolj premreženih MD se protein iz njih ni sprostil. V mediju s pH 3 so alginatni MD zadržali sproščanje proteina in ga nato po dvigu pH na 7 sprostili. Po dvigu pH na 7 se je iz MD sprostilo 20-50 % vgrajenega proteina. Vključevanje pomožnih snovi v MD (razgrajevalo Ac-Di-Sol in PAS n-decil-maltopiranozid) je dodatno povečalo količino sproščenega proteina za 20 %. Protein se tekom vgrajevanja in sproščanja ni razgradil, kar smo pokazali z gelsko elektroforezo.

ABSTRACT:

Microparticles are small, solid particles ranging in size from 1-2000 µm. They are made of natural or synthetic polymers. One of the naturally occurring polymers is polysaccharide alginate, which forms two types of gel: acidic gel under acidic conditions and ionotropic gel in the presence of multivalent cations.

In the first part of our work alginate microparticles were prepared using a vibrating nozzle technique where alginate droplets were ionically gelled in the solution of crosslinker (CaCl_2). The effects of the nozzle's size (150 µm, 250 µm, 500 µm), alginate type (40G and 70G), alginate concentration (2,0 % and 2,5 %), crosslinker CaCl_2 concentration (0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,5 M) and drying process (lyophilization or air drying) on the microparticle's size and morphology were evaluated with optical and scanning electron microscopy. Nozzle's size, alginate concentration and drying process showed the most important effect on microparticle's size and morphology. As expected larger nozzle size and higher alginate concentration resulted in larger microparticles (1500 µm) compared to smaller nozzle and lower alginate concentration (350 µm). Lyophilized microparticles remained the initial size of freshly prepared microparticles and were more porous than air-dried microparticles that had smaller particle size and smoother surface area.

After optimization process bovine serum albumin (BSA) was incorporated in microparticles using 250 µm nozzle. The effect of alginate type, crosslinker concentration (0,1 M and 0,5 M), dissolution medium (10x PBS (phosphate buffered saline), 1x PBS, pH 3 to pH 7 medium), lyophilization process and various excipients (disintegrant Ac-Di-Sol and surface active agent n-decyl-maltopyranoside) on the amount of BSA released from microparticles were evaluated. Entrapment efficiency (EE) of the protein in microparticles was 50-80 %; higher EE was achieved with more crosslinked microparticles (alginate 70G, 0,5 M CaCl_2). Results show that all parameters influenced the amount of the BSA released from microparticles. In buffer with high ionic strength (10x PBS) 20-50 % of the protein was released from microparticles; higher amount from less crosslinked and fresh microparticles. In buffer with physiological osmolarity (1x PBS) 10-40 % of the protein was released from microparticles; higher amount from less crosslinked lyophilized microparticles. For the most crosslinked microparticles no protein was released. In medium with pH 3 no protein was released from microparticles, but when the pH was increased to 7, protein started to release from microparticles. App. 20-50 % of the incorporated BSA was released after increasing the pH to 7. Incorporation of excipients in microparticles (disintegrant Ac-Di-Sol and surface active agent n-decyl-maltopyranoside) contributed to protein release to additional 20%. BSA showed no degradation products during preparation of microparticles and release as determined by gel electrophoresis.

SEZNAM OKRAJŠAV:

Alginat 40G - alginat z nižjim deležem guluronske kislina

Alginat 70G - alginat z višjim deležem guluronske kislina

BSA – goveji serumski albumin (bovine serum albumin)

BU – biološka uporabnost

EE – učinkovitost vgradnje (entrapment efficiency)

EF – elektroforeza

FO – farmacevtska oblika

G – guluronska kislina

M – manuronska kislina

MD - mikrodelci

MM – molekuska masa

NaDS – natrijev dodecil sulfat

PBS – fosfatni pufer (phosphate buffered saline)

PLA – polimlečna kislina

PVA – polivinil alkohol

SEM – vrstični elektronski mikroskop (scanning electron microscope)

ZU – zdravilna učinkovina

1. UVOD

1.1 PROTEINI

1.1.1 Osnove

Proteini so kompleksne biološke makromolekule sestavljene iz ene ali več polipeptidnih verig. Polipeptidi so sestavljeni iz osnovnih enot - aminokislin, te pa so med seboj povezane s peptidno vezjo. Če je polipeptidna veriga sestavljena iz nekaj aminokislin pa do 40 aminokislin, govorimo o peptidih, če pa je aminokislina več kot 40, učinkovino že uvrščamo med proteine (1). Proteine delimo v tri razrede: globularne, strukturne in membranske (2).

V telesu imajo proteini zelo pomembne funkcije, od strukturne v mišicah in citoskeletu, sodelujejo v signalnih poteh med celicami, imunskem odzivu, celičnem ciklu, pritrjevanju celic in tudi kot encimi v in izven celic. Večina proteinov se zvije v 3-dimenzionalno strukturo, ki jo imenujemo nativna konformacija, zgolj preko fizikalno-kemijskih lastnosti aminokislin, drugi pa rabijo pomoč molekul šaperonov, ki pomagajo pri zvitju proteina v nativno konformacijo. Poznamo 4 nivoje zgradbe proteinov: primarna (aminokislinska zgradba), sekundarna (alfa vijačnica, beta ravnina in zavoj; stabilizirana je preko vodikovih vezi), terciarna (celotna zgradba sekundarnih delov stabiliziranih z interakcijami kot so hidrofobne interakcije, solni mostovi, disulfidne vezi in posttranslacijske modifikacije) in kvartarna (sestavljena iz več proteinskih podenot, ki tvorijo kompleks). Slednji sta najpogosteje odgovorni za biološko aktivnost proteina. Pomembno vlogo pri biološki aktivnosti imajo tudi posttranslacijske modifikacije (npr. dodatek funkcionalne skupine, proteina ali peptida, sprememba kemijske narave aminokislin ali strukture proteina) (1, 2, 3).

1.1.2 Problemi peroralnega vnosa proteinov v telo

Število proteinskih zdravilnih učinkovin se iz leta v leto povečuje (v fazi odkrivanja je več kot 2500, v predklinični fazi 900 in v fazi kliničnega preizkušanja je več kot 1600 biotehnoloških zdravil), saj delujejo bolj specifično in imajo zato manj stranskih učinkov kot klasična zdravila. Njihova običajna parenteralna dostava v telo je problematična s strani pacienta (npr. strah pred iglami), zato iščejo nove načine za učinkovit in poceni peroralni dostavni sistem za proteine v telo. Peroralno jemanje zdravila je najbolj zaželena pot vnosa proteina v telo, vendar se zaužiti proteini skozi proces prebave lahko razgradijo.

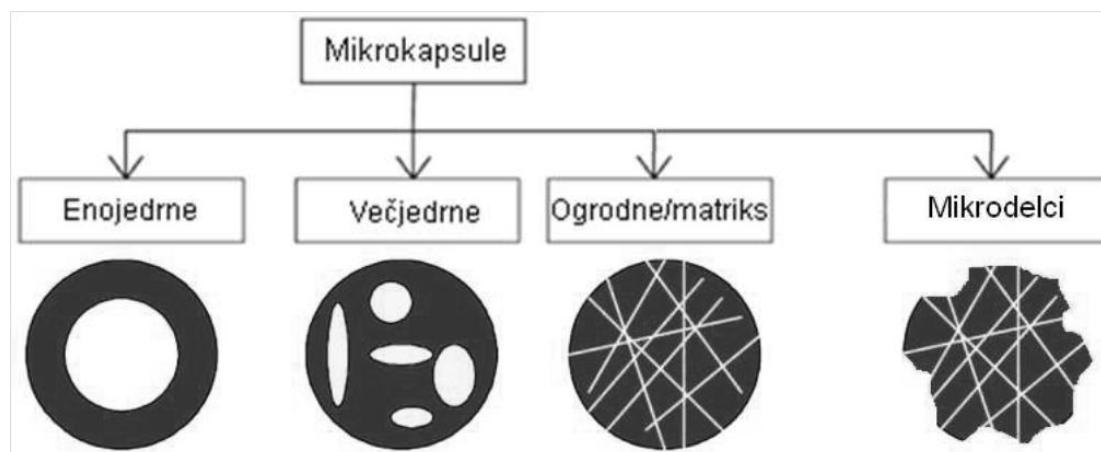
Najprej pride v želodcu do denaturacije proteinov zaradi izpostavljenosti kislini in nato še do encimske hidrolize polipeptidnih verig. Poleg tega se proteini v črevesju zaradi zelo slabe permeabilnosti slabo absorbirajo v kri. Biološko uporabnost (BU) proteinov lahko povečamo z uporabo pospeševalcev penetracije in inhibitorjev encimov, vendar to fiziološko ni zaželeno. Lahko pa BU povečamo s farmacevtskimi tehnološkimi pristopi, da zaščitimo protein z gastrorezistentno oblogo pred kislino v želodcu in proteolizo, povečamo koncentracijo proteina na mestu absorpcije z hitrim sproščanjem iz farmacevtske oblike (FO) ali z mukoadhezivno oblogo dosežemo daljše zadrževanje FO blizu enterocitom (1).

Zato je enkapsulacija proteina v polimerno ogrodje ena od možnosti zaščite proteinske učinkovine, ki lahko poveča BU proteina.

1.2 MIKROKAPSULE

1.2.1 Definicija in razdelitev mikrokapsul

Mikrokapsule so praviloma okrogle oblike velike od 1 μm do 2 mm pridobljene z mikroenkapsuliranjem. Sestavljeni so iz ogrodja – matriksa, ki je največkrat polimer in učinkovine (tekoče ali trdne), ki jo enkapsuliramo. Izraz mikrokapsula ima precej širok pomen. Razdelitev mikrokapsul je predstavljena na sliki 1.



Slika 1 - Morfološka razdelitev mikrokapsul (4).

Glede na strukturo ločimo različne vrste mikrokapsul. Prvemu tipu pravimo filmski tip mikrokapsul, kjer je jedro ali več manjših jedrc obdanih z oblogo. Naslednji tip so mikrosfere ali ogrodni tip mikrokapsul, kjer sta enkapsulirana substanca in nosilni polimer enakomerno dispergirana po celotnem volumnu delca. Ti delci so praviloma okroglih

oblik. Zadnjim pa pravimo mikrodelci, ki so po sestavi enaki mikrosferam, le da so nepravilnih oblik (4).

1.2.2 Materiali in metode izdelave mikrokapsul

Materiali, ki so primerni za tvorbo ogrodja oz. ovojnice mikrokapsul, morajo biti netoksični, po izdelavi morajo zagotavljati mehansko stabilnost FO, biti morajo biokompatibilni in vsekakor kompatibilni z zdravilno učinkovino oz. proteinom (4).

Za tvorbo ogrodja ali ovojnice so primerni naslednji materiali:

- Proteini - albumin, kazein, želatina, gluten
- Ogljikovi hidrati - maltodekstrini, dekstran, škrob, modificirani škrobi
- Gumiji - agar, Na-alginat, karagenani, arabski gumi, pektini
- Derivati celuloze - metilceluloza, etilceluloza, karboksimetil celuloza, celulozni acetat-ftalat, hidroksipropil metilceluloza, hidroksipropil celuloza
- Ostali ogljikovi hidrati - hitosan, ciklodekstrini
- Lipidi - voski, monoglyceridi, diglyceridi, naravne masti in olja, frakcionirane in hidrogenirane masti, lecitin, parafin
- Ostali vodotopni polimeri - polietilen glikol, polivinil pirolidon, polivinil alkohol (PVA)
- Ostali nevodotopni polimeri - polimlečna kislina, polikaprolakton

Kot pomožne snovi lahko uporabljamo:

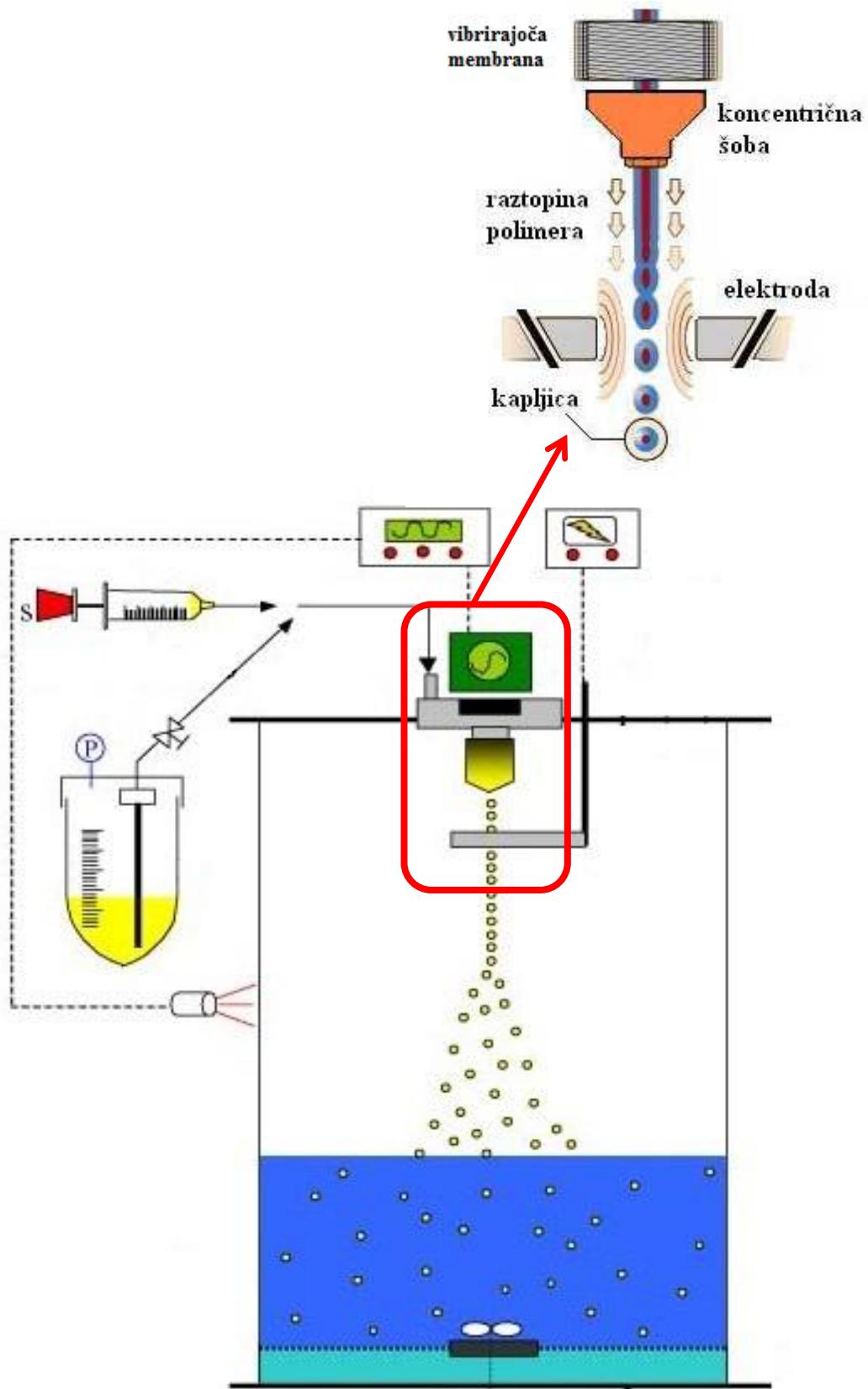
- Površinsko aktivne snovi/stabilizatorje - PVA, poloksamere, estre sorbitana, lecitin
- Modifikatorje sproščanja - celulozne derivate, PVA, polimetakrilate
- Polnila - mikrokristalna celuloza, lakoza, saharoza, glukoza
- Mehčala - polietilen glikol, triacetin
- Razgrajevala - premrežena karboksimetil celuloza, škrob
- Stabilizatorje - antioksidanti, konzervansi
- Barvila, arome

Mikrokapsuliranje je postopek, pri katerem drobne kapljice ali delce obdamo s slojem polimera. S tem fizično ločimo notranjo fazo od okolja. Metode izdelave lahko razdelimo v 3 sklope:

1. Kemijske metode : medpovršinska polimerizacija, "in situ" polimerizacija
2. Fizikalno-kemijske metode: metoda koacervacije, metode z odstranjevanja topila, metode z ohlajevanjem dispergirane taline, tehnologije s superkritičnimi fluidi, oblaganje plast na plast
3. Fizikalno-mehanske: metode z razprševanjem, metode ekstruzije curka tekočine, mikrokapsuliranje z iztiskanjem talin, oblaganje z razprševanjem

Za to diplomsko nalogu smo izbrali ekstruzijo curka tekočine. Princip metode temelji na razbitju laminarnega curka tekočine v enako velike kapljice z uporabo različnih tehnik. Pri enostavnih metodah črpamo raztopino ogrodnega materiala skozi enojno šobo, pri naprednejših metodah ko-ekstruzije pa uporabljamo koncentrično šobo, pri kateri jedrni material črpamo skozi notranjo, ogrodni material pa skozi zunanjo šobo. Ovojnicu nastalih mikrokapsul nato utrdimo z odparevanjem topila, ohlajanjem in s kemijskim ali termičnim premreženjem. Za razbitje laminarnega curka tekočine uporabljamo različne metode: metoda z vibrirajočo membrano, "jett cutter" metoda, elektrostatska ekstruzija, metoda s ko-aksialnim tokom zraka (4). Uporabljeni enkapsulator Inotech IE-50R (slika 2) je osnovan na metodi z vibrirajočo membrano.

Pri tej metodi potiskamo raztopino polimera in zdravilne učinkovine skozi koncentrično šobo s pomočjo peristaltične črpalke in brizge ali s kompresorjem, da nastane laminaren curek tekočine, ki ga na enakomerno velike kapljice razbije vibrirajoča membrana, ki se nahaja nad šobo enkapsulatorja. Nastale kapljice lahko opcijsko potujejo skozi električno polje, ki ga ustvari elektroda. Pri tem se njihova površina nabije, kar privede do elektrostatskih odbojnih sil med kapljicami. S tem preprečimo njihovo zlepljenje med padanjem v raztopino premreževalca. Spreminjamо lahko različne procesne spremenljivke (velikost šobe, hitrost pretoka raztopine, amplitudo in frekvenco nihanja membrane, moč električnega polja) in s tem pripravimo različno velike mikrokapsule. Dobra lastnost te metode je, da nastanejo mikrokapsule z ozko porazdelitvijo velikosti. Omejeni pa smo z viskoznostjo raztopin, ki ne sme biti previsoka. Ta naprava omogoča mile pogoje izdelave mikrodelcev, ki so ključni v primeru labilnih ZU, kot so proteini (4).



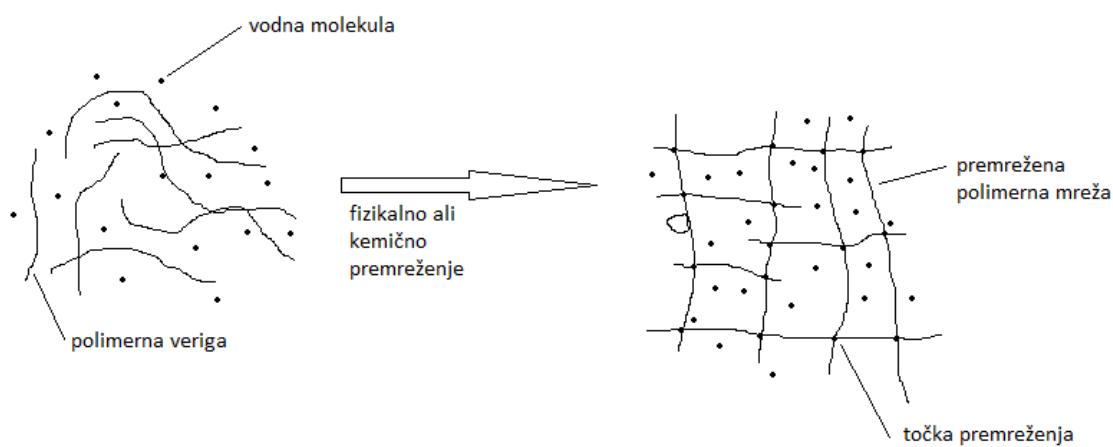
Slika 2: Shema delovanja enkapsulatorja Inotech IE-50R (5).

1.2.3 Mehanizmi sproščanja učinkovine iz mikrokapsul

Če je v mikrokapsulah tekoče jedro, se lahko iz njega sprosti vsa učinkovina ob mehanskem pretrganju ovojnice. Ta se lahko odpre še na druge načine. Lahko se raztopi ali stali zaradi spremembe temperature, spremembe pH ali ionske moči. Učinkovina pa lahko preide ovojnico z difuzijo. Pri ogrodnem tipu mikrokapsul sta za sproščanje ZU odgovorna dva procesa in sicer erozija in difuzija. Ogrodje se začne v spremenjenem okolju (npr. povišana ionska moč) rahljati. Polimerne verige se razpletejo in sprostijo ZU v medij. Drug način sproščanja je difuzija skozi polimerno ogrodje. Na hitrost difuzije ZU skozi ogrodje vpliva gostota premreženja polimera, velikost ZU, interakcije ZU-polimer. Velikost ZU je še posebej pomembna pri proteinih. Če je protein prevelik, se ta proces močno upočasni ali celo ustavi. V praksi je pogosto opažen "burst" učinek (takošnja sprostitev velike količine ZU iz mikrodelcev) ali pa kombinacija več profilov sproščanja (6).

1.3 POLIMERNI HIDROGELI

Polimerni hidrogeli tvorijo tridimenzionalne strukturne mreže, ki vežejo velike količine vode. Običajno jo vsebujejo več kot 50 % celotne mase. Čeprav na makroskopskem nivoju izkazujejo lastnosti trdnih snovi, se na mikroskopskem nivoju obnašajo kot raztopine. Tvorimo jih lahko s kemičnim ali fizikalnim premreženjem (slika 3).



Slika 3: Shematski opis tvorbe hidrogela s premreženjem.

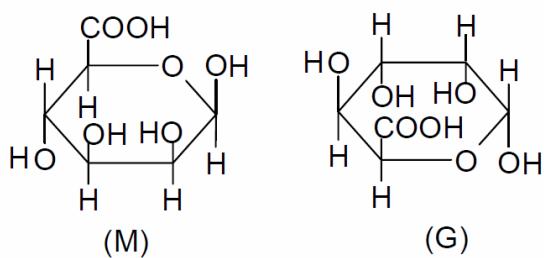
Polimere lahko pridobivamo sintetično ali ekstrahiramo iz naravnih materialov. Iz njih nastanejo različni hidrogeli zaradi različne kemične sestave, ki se razlikujejo glede hidrofobnosti, gostote premreženosti, idr. (7, 8).

Za izvedbo te diplomske naloge smo izbrali dve vrsti Na-alginata z različnima deležema β -D-manuronske in α -L-guluronske kisline.

1.3.1 Alginat

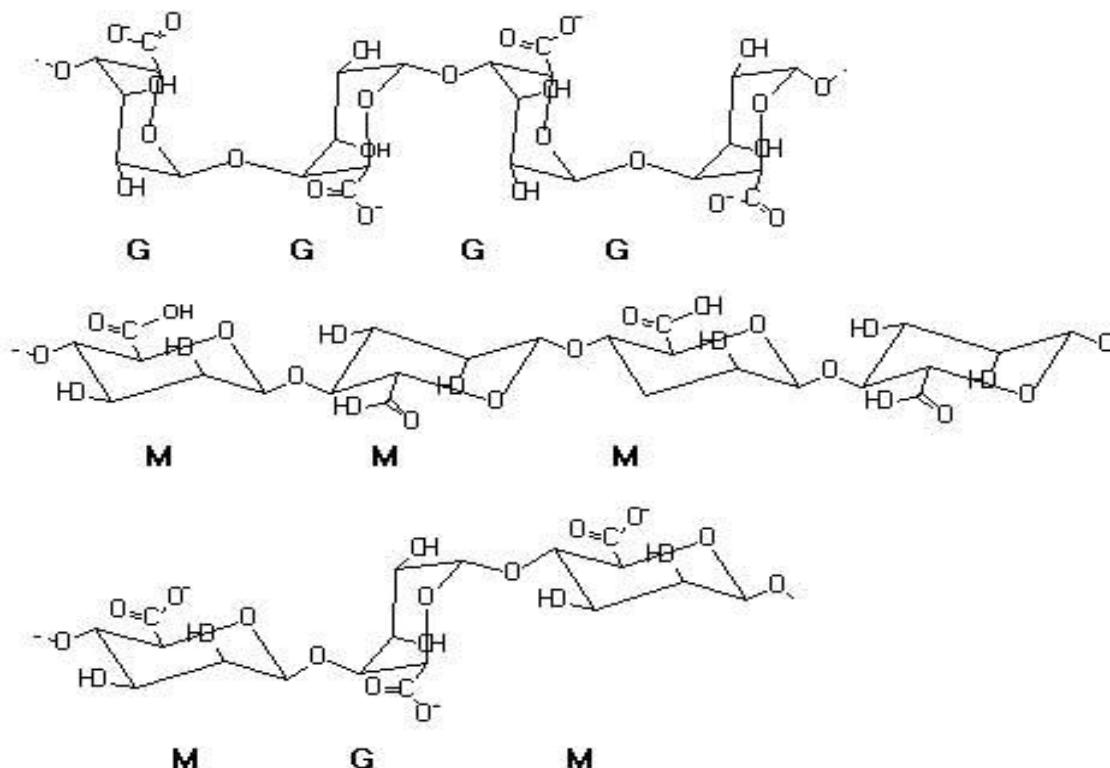
Alginska kislina oz. natrijeva sol alginske kisline je dobro znan polisaharidni biopolimer, ki se zaradi svoje sposobnosti geliranja v vodnih raztopinah široko uporablja v prehrambeni industriji kot zgoščevalo, gelirno sredstvo in utrjevalo (6). Alginat je zaradi svojih lastnosti zelo primeren kot ogrodje za enkapsulacijo različnih proteinov in celic. V alginatnem ogrodju je relativno inertno vodno okolje ugodno za proteine in celice. Alginatno ogrodje je precej porozno kar omogoča vgrajenim nizkomolekularnim molekulam hitro difuzijo skozi gel in hitrost sproščanja lahko kontroliramo z oblaganjem s polimeri. V vodnih raztopinah se alginatno ogrodje razgradi ter je biorazgradljivo v normalnih fizioloških pogojih. Izdelava mikrokapsul poteka pri sobni temperaturi brez prisotnosti organskih topil (9).

Alginat pridobivajo iz rjavih alg, v katerih predstavlja do 40 % suhe mase. Nahaja se v intracelularnemu matriksu v obliki mešanice soli različnih kationov, ki so v morju (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} in Na^+). Po ekstrakciji in čiščenju nečistot (težke kovine, endotoksi, proteini, ...) ga lahko kupimo v obliki natrijeve soli. Alginska kislina sodi v skupino linearnih nerazvezenih polisaharidov, ki so sestavljeni iz različne količine monomerov β -D-manuronske in α -L-guluronske kisline povezanih z 1,4 glikozidno vezjo (slika 4) (9).



Slika 4: Struktura β-D-manuronske (M) in α-L-guluronske kisline (G).

Kislini sestavljata homopolimerne odseke, ki se izmenjujejo vzdolž polimerne verige. Te homopolimerne odseke občasno prekine odsek, kjer se izmenjujeta β -D-manuronska in α -L-guluronska kislina (slika 5) (9).



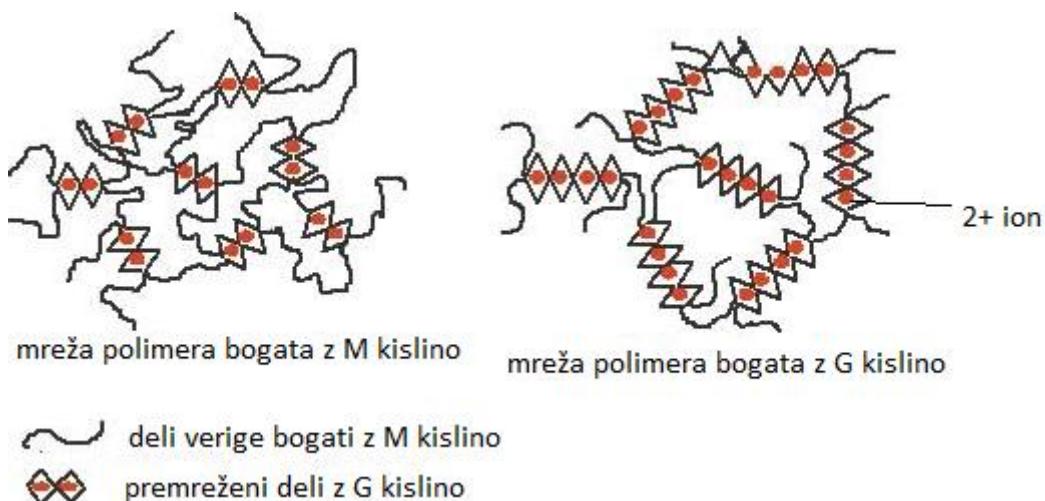
Slika 5: Prikaz polimernih odsekov guluronske in manuronske kisline v alginatu.

Sestava in obseg različnih polimernih odsekov odražata fizikalne lastnosti alginata, ta se med vrstami rjavih alg razlikuje. Viskoznost raztopin je predvsem odvisna od molekulske mase polimera (9).

1.3.2 Mehanizem tvorbe alginatnega gela

Alginska kislina je v neionizirani obliki v vodi netopna. Topnost soli alginske kisline pa je odvisna od pH raztopine in vrste prisotnih kationov (6).

IONOTROPNI GEL: Alginatne mikrodelce lahko pripravimo z ekstruzijo raztopine Na-alginata, v katerem je dispergirana ZU v kapljice, ki padajo v premreževalni medij. Ta lahko vsebuje različne katione kot npr. Ca^{2+} , Sr^{2+} ali Ba^{2+} . Magnezijevi ioni in enovalentni kationi ne tvorijo gela. Gel tvorijo tudi drugi bivalentni kationi (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , ...) vendar se ne uporabljajo zaradi toksičnosti. Geliranje poteče predvsem zaradi izmenjave Na^+ iz guluronskih kislin z bivalentnimi kationi, ki povežejo med sabo guluronske kisline in tvorijo tipično strukturo "škatle za jajca", ki je prikazana na sliki 6. Struktura je dodatno stabilizirana z vodikovimi vezmi. Interakcije pa niso le elektrostatske ampak tudi koordinativne z večivalentnim kationom kot kelatnim centrom. Gel tvorijo le poliguluronski odseki z minimalno dolžino 20 monomerov (6).



Slika 6: Shema premreženja alginata.

KISLINSKI GEL: Druga vrsta gela nastane pri določenih pogojih, ko pH raztopine znižamo pod pKa guluronske ($pK_a = 3,65$) in manuronske ($pK_a = 3,38$) kisline, ko so karboksilne skupine na polimeru protonirane (polimer je netopen). Nastane tako imenovani kislinski gel, za katerega domnevajo, da je stabiliziran z intramolekularnimi vodikovimi vezmi. Ob hitri spremembi pH pa se lahko alginska kislina izobori. K tvorbi gela največ prispevajo poliguluronski in v manjši meri tudi polimanuronski odseki, zato ob večjem deležu poli-G odsekov nastane močnejši gel (6, 9).

1.3.3 Fizikalne lastnosti alginata

Funkcionalne in fizikalne lastnosti premreženega alginata so odvisne od sekvenčne sestave polimernih verig in molekulske mase. Elastičnost alginatnih polimerov v raztopinah narašča v naslednjem vrstnem redu $GG < MM < MG$. To se lahko razloži s povezavami med monomernimi enotami. GG so povezani z α (1,4) glikozidno vezjo, ki tvori bolj zaprto strukturo, ki je manj fleksibilna. MM monomerji pa se povezujejo z β (1,4) glikozidno vezjo, ki pa oblikuje bolj ravno strukturo, ki omogoča večjo fleksibilnost. Povezava med GM monomerji pa spremeni smer običajne homolinearne strukture, kar zmanjša togost bloka. Mikrodelci z najmanjšo fleksibilnostjo, visoko mehanično odpornostjo in poroznostjo so iz visokoguluronskega alginata ($>70\%$ delež guluronske kisline). Geli iz alginata z večjim deležem manuronske kisline pa so bolj elastični, manj odporni na stresne pogoje in manj porozni. Pri molekulski masi nad $2,4 \times 10^5$ g/mol je moč geliranja neodvisna od molekulske mase, pod določeno vrednostjo molekulske mase pa je sposobnost tvorbe gela omejena. Gel se tvori v širokem temperaturnem območju $0-100^\circ\text{C}$ (6).

Kemična reaktivnost: Mikrookolje v alginatu je lahko precej inertno do proteinskih učinkovin in celic (običajno vsebuje alginatni gel do 95 % vode), vendar pa pozitivno nabit protein lahko konkurira kationu za vezavo na prosto karboksilno mesto na alginatu. Nekateri proteini so na ta problem zelo občutljivi (npr. TGF- β_1) in zato je potrebno dodati alginatu aditive, ki preprečijo tvorbo takšnih kompleksov, tako da protein ohrani svojo aktivnost (6).

Kemična stabilnost: Razgradnjo alginata premreženega s Ca^{2+} lahko dosežemo z uporabo kelatorjev (EDTA, laktat, citrat, fosfat), ki odstranijo Ca^{2+} ione. Premreženje gela se zmanjša in ta postane nestabilen. To lahko vodi do sprostiteve ujete ZU in raztopljanja alginatnega polimera. Enako lahko dosežemo z visoko koncentracijo Mg^{2+} ali Na^+ ionov. Torej tudi visoka ionska moč pospeši razpad alginatnega gela. Alginati z nizkim deležem poliguluronskih odsekov in z nižjo molekulsko maso izpustijo proteine z večjo hitrostjo in obratno (6).

Biološke lastnosti: Alginat poleg biokompatibilnosti, netoksičnosti in biorazgradljivosti izkazuje tudi bioadhezivne lastnosti. V raznih študijah so dokazali, da ima v primerjavi z nekaterimi polimeri (polistiren, hitosan, karboksimetil celuloza, PLA) največjo mukoadhezivno moč. Z mukoadhezijo se poveča čas zadrževanja ob membranah enterocitov in s tem se lahko poveča tudi biološka uporabnost zaradi večje absorpcije ZU. Razgradnja alginata poteka v debelem črevesju z encimi, ki jih izločajo kolonske mikroflore. V primeru neparenteralne aplikacije FO velja za neimunogenega, biokompatibilnega in netoksičnega (6, 9).

1.3.4 Sproščanje ZU iz alginatnih mikrodelcev

Dejavniki, ki vplivajo na sproščanje ZU iz alginatnih mikrodelcev so (6):

- pH medija - pogojuje nabrekanje ogrodja in mehanizem sproščanja učinkovine. V nevtralnem bo potekala difuzija raztopljene ZU skozi nabreklo ogrodje mikrodelca in tudi erozija mikrodelca. V kislem okolju pa bo potekala le difuzija ZU skozi netopno ogrodje alginske kisline.
- Velikost, topnost in naboj učinkovine - večje slabo topne ZU se bodo sproščale zaradi nabrekanja in erozije matriksa mikrodelca. Mikrodelec v kislem okolju ne nabreka, erozije pa tudi skoraj ni, zato bo sproščanje minimalno. V nevtralnem okolju bo potekala difuzija raztopljene ZU skozi nabreklo plast in sproščanje z

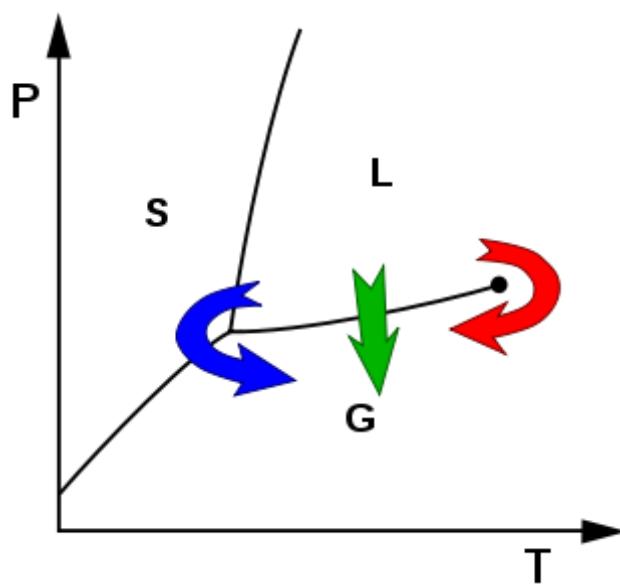
erozijo matriksa. Hitrost difuzije pa je obratno sorazmerna molekulski masi ZU. Manjše dobro topne ZU se sproščajo z difuzijo skoraj neodvisno od pH medija. Vpliv naboja bo v kislem manjši, v nevtralnem pa se bodo pozitivno nabite ZU sproščale relativno počasneje, negativno nabite pa relativno hitreje.

- Premreženje alginata - Odvisno je od vrste, valence in velikosti uporabljenega kationa.

1.4 SPLOŠNO O METODAH

1.4.1 Liofilizacija

Biološke materiale moramo pogosto posušiti, da jih lahko shranimo ali pripravimo za transport. Sušenje pogosto povzroči zmanjšanje njihove biološke aktivnosti zaradi poškodb (npr. denaturacija), ki pri tem nastanejo. Liofilizacija ali sušenje z zamrzovanjem je metoda, ki signifikantno zmanjša te poškodbe. Je zelo draga metoda, ki jo uporabljamo le za drage in temperaturno najbolj občutljive materiale. Temelji na zamrznitvi vode, kateri sledi sušenje pri znižanem tlaku. Voda v materialu sublimira neposredno iz trdnega v plinasto stanje. Na sliki 7 je predstavljen fazni diagram. Liofilizacija poteka po poti modre puščice okrog trojne točke.



Slika 7: Fazni diagram (12).

Faza zamrzovanja je najbolj kritičen del postopka, saj moramo biološki ali organski material zamrzniti hitro na zelo nizko temperaturo (npr. s tekočim dušikom), da tvorimo majhne kristale, ki manj poškodujejo material. V prvi fazi sušenja damo material v

neprodušno zaprto komoro in ustvarimo podtlak z vakuumsko črpalko. S tem omogočimo sublimacijo ledu iz materiala. V tej fazi odstranimo 95 % vode, ki je nevezana. Vzorec se ne tali, ker je sublimacija endotermen proces. V fazi sekundarnega sušenja je lahko temperatura višja od temperature tališča, cilj te faze pa je odstranjevanje fizikalno vezane vode. Po koncu druge faze sušenja imamo v vzorcu še okoli 0,5 % vode in kemično vezano vodo, ki pa je z liofilizacijo ne moremo odstraniti (11). Prednosti liofilizacije so, da lahko sušimo termolabilne snovi in pri tem ohranimo njihovo kemijsko stabilnost in biološko aktivnost. Dobimo porozen produkt, ki je zelo dobro topen, prav tako pa produkt lažje prenaša temperaturne spremembe in je precej lažji za transport. Edini slabosti tega načina sušenja sta dolgotrajnost in energetska potratnost procesa (11).

1.4.2 UV/VIS absorpcijska spektroskopija

Absorpcija elektromagnetnega valovanja (od 185 nm do 700 nm) povzroči v organskih molekulah v ultravijoličnem in vidnem spektru svetlobe vzbujanje valenčnih elektronov π in neveznih (prostih) n elektronskih parov na atomih kisika, dušika in žvepla. Te elektrone s pomočjo elektromagnetne energije spravimo v višja energetska stanja. V molekulah imamo kromofore – strukture, ki vsebujejo elektrone, ki jih lahko premaknemo v višja energijska stanja s fotoni svetlobe. Uporabni so le tisti kromofori, ki absorbirajo svetlobo nad 200 nm. Molekule vzbudimo z elektromagnetnim valovanjem, absorbirani del vpadne svetlobe v odvisnosti od valovne dolžine imenujemo absorpcijski spekter. Iz absorpcijskega spektra vidimo, pri katerih valovnih dolžinah je absorpcija svetlobe najintenzivnejša – pri katerih valovnih dolžinah je energija fotonov ravno pravščja za prehod elektronov v vzbujeno stanje (3).

Za analizo proteinov merimo absorpcijo UV svetlobe v raztopini vzorca pri 280 nm. Svetlobo take valovne dolžine absorbirajo aromatski obroči, predvsem aminokislini tirozin in triptofan. Za natančno določitev koncentracije moramo poleg vzorčne raztopine izmeriti še absorbenco standardne raztopine z znano koncentracijo oz. narediti moramo umeritveno premico v linearinem koncentracijskem območju, zaradi omejitev Beer-Lambertovega zakona. Ta pravi, da je količina absorbiranega sevanja (A) proporcionalna dolžini kivete (l) z raztopino, ki jo obsevamo, koncentraciji molekul analita (c) in molekularnemu absorpcijskemu koeficientu snovi (ϵ), ki je specifična karakteristika za neko snov pri določeni valovni dolžini in koncentraciji (3).

$$\text{Beer} - \text{Lambertov zakon (enačba): } A = \epsilon l c$$

1.4.3 Gelska elektroforeza

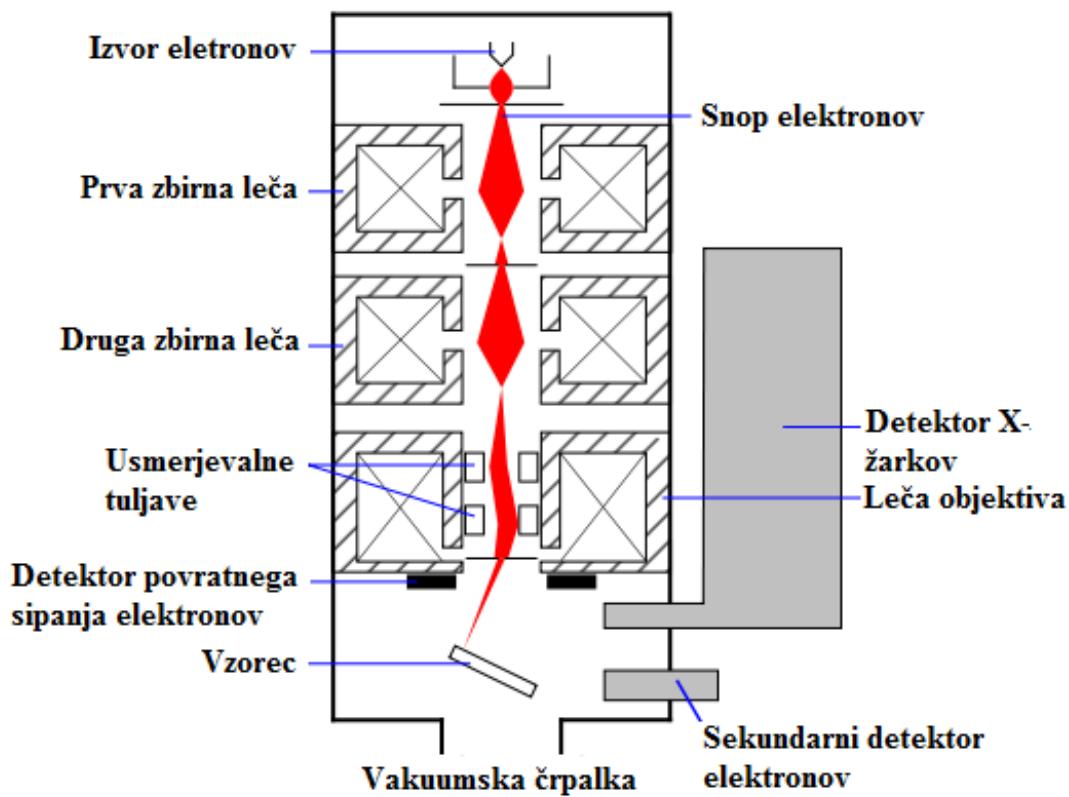
Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih molekul (proteinov) v električnem polju. Potujejo v smeri elektrode z nasprotnim nabojem. Hitrost njihovega potovanja je odvisna od celokupnega naboja, oblike, velikosti, kar vodi do njihove ločitve. Elektroforeza tako omogoča ločitev delcev z različnimi naboji, saj imajo različne elektroforezne mobilnosti, poleg tega lahko ločujemo tudi delce z enakimi naboji, kadar se razlikujejo po velikosti oziroma obliki, saj nanje deluje različna zavorna sila (10).

Za ločitev bioloških makromolekul (proteini, nukleinske kisline) uporabljamo predvsem gelsko elektroforezo: poliakrilamidno za proteine in agarozno za nukleinske kisline. Gel deluje kot molekulsko sito, v katerem večje molekule potujejo počasneje, manjše pa hitreje. Poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) poteka v gelskem matriksu, ki nastane po polimerizaciji akrilamida in N,N-metilenbisakrilamida. Poroznost gela je odvisna od njegove premreženosti. Poznamo dve vrsti PAGE: nativno in denaturacijsko v prisotnosti površinsko aktivne snovi natrijevega dodecil sulfata (NaDS). Nativna PAGE poteka v razmerah, ki ohranijo nativno konformacijo molekul, zato ti ne izgubijo biološke aktivnosti, ločba pa poteka na osnovi njihove velikosti in naboja. NaDS PAGE je bolj uporabljana tehnika, saj ločujemo proteine le na osnovi njihove velikosti. Proteine v vzorcu najprej denaturiramo z NaDS, disulfidne vezi pa prekinemo z reducentom 2-merkaptoetanolom ali ditiotreitolom. NaDS se veže na verige denaturiranega proteina in jim da močan negativni nabolj, tako da med proteinimi ni razlik v naboju, zato se lahko ločijo le na podlagi razlike v molekulski masi proteina. Po elektroforezi ločene proteine detektiramo z barvili (npr. "coomasie brilliant blue") ali z barvanjem s srebrovimi ioni. Prvo je hitrejše, enostavnejše in zato tudi bolj uporabljano. Barvilo tvori s pozitivno nabitimi aminskimi skupinami stabilne komplekse in jih obarva modro (3, 10).

1.4.4 SEM – vrstična elektronska mikroskopija

Vrstični elektronski mikroskop uporablja za opazovanje površine vzorca curek elektronov, ki potuje po površini vzorca po vzporednih črtah. Shema vrstičnega elektronskega mikroskopa je predstavljena na sliki 8. Sestavljen je iz vira elektronov, v katerem nastane snop pospešenih elektronov, ki ga odklanjajo in fokusirajo elektronske leče. Detektor sprejema elektrone in elektromagnetna valovanja, ki nastanejo ob interakciji snopa elektronov z vzorcem. Vse to krmili elektronika, ki optimizira proces in izkaže rezultat v

obliki slike. Zelo nizek tlak, ki je potreben v komori, zagotavlja vakuumska črpalka. Vzorce, ki so neprevodni, moramo pripraviti na analizo z naprševanjem dobro prevodne kovine (zlato, srebro), ostale vzorce pa lahko običajno preučujemo brez predpriprave. Ločljivost takega mikroskopa je okrog 1 nm, kolikor je premer najožjega curka elektronov. Maksimalna povečava je 200000x, torej več kot stokrat večja kot pri svetlobnem mikroskopu (13).



Slika 8: Shema vrstičnega elektronskega mikroskopa (14).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je vgraditi modelno proteinsko učinkovino v alginatne mikrodelce kot potencialni dostavni sistem za peroralni vnos proteina. Mikrodelce bomo izdelali s postopkom ionotropnega geliranja s Ca^{2+} ioni z uporabo enkapsulatorja Inotech IE-50R, ki omogoča izdelavo mikrodelcev z metodo vibrirajoče membrane. Preučevali bomo vpliv vrste alginata (MM, delež manuronske in guluronske kisline), koncentracije alginata, stopnje premreženja s Ca^{2+} ioni, dodatek pospeševalcev sproščanja proteina iz mikrodelcev (razgrajevala, površinsko aktivne snovi), vrste sušenja (liofilizacija, sušenje na zraku), idr. na lastnosti izdelanih mikrodelcev. Določali bomo velikost in morfologijo mikrodelcev pod optičnim in SEM mikroskopom, učinkovitost vgrajevanja in sproščanja proteina v različnih biorelevantnih medijih (simuliran pH želodčnega in črevesnega medija).

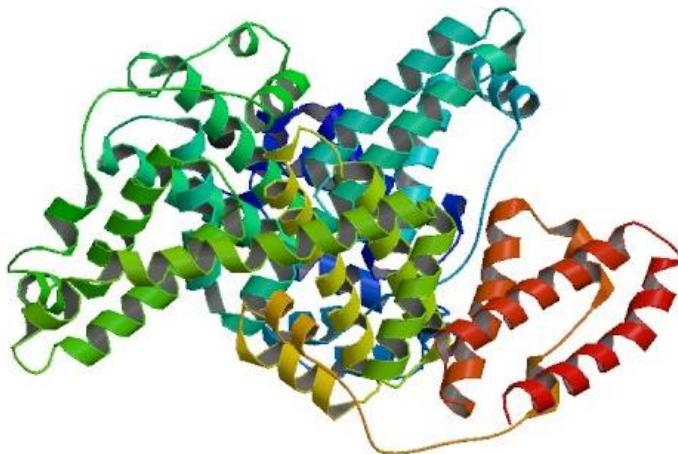
Cilj naloge je oblikovati mikrodelce čim manjših velikosti ($<1000 \mu\text{m}$), ki bi omogočili dobro prodiranje proteina in lokalno zadrževanje sistema ob črevesni sluznici (mukoadhezija). Vgrajeni protein naj bi se relativno hitro sprostil (da dosežemo ustrezni koncentracijski gradient pri $\text{pH} > 6,0$), medtem ko naj bi bilo v kislih pogojih sproščanje proteina zadržano.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Modelni protein:

BSA (Sigma®, ZDA) – goveji serumski albumin je enoverižen polipeptid sestavljen iz 583 aminokislinskih enot in je neglikoziliran (slika 9). Molekulska masa BSA je 66,430 kDa, izoelektrično točko (pI) ima pri pH 4,7 (15). Je bel do rumenkast prašek, v raztopini moten do rumenkast. Je dobro topen in zelo stabilen v raztopinah. Pri temperaturi nad 50°C denaturira (16).



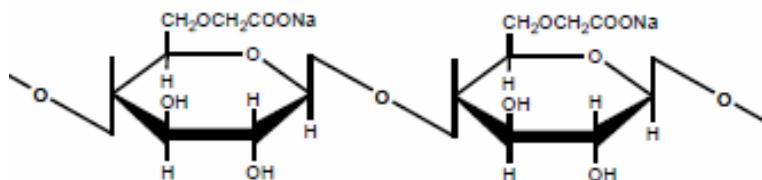
Slika 9: Goveji serumski albumin (17).

Polimeri:

- Protanal® LF 10/60 – Natrijev alginat. Bel do rumenkast prašek, skoraj brez okusa in vonja. Vsebuje 65-75 % guluronske kisline in 25-35 % manuronske kisline. (FMC Biopolymer, Norveška) – **Alginat 70G**
- Protanal® LF 10/60 LS – Natrijev alginat. Bel do rumenkast prašek, skoraj brez okusa in vonja. Vsebuje 35-45 % guluronske kisline in 55-65 % manuronske kisline. (FMC Biopolymer, Norveška) – **Alginat 40G**

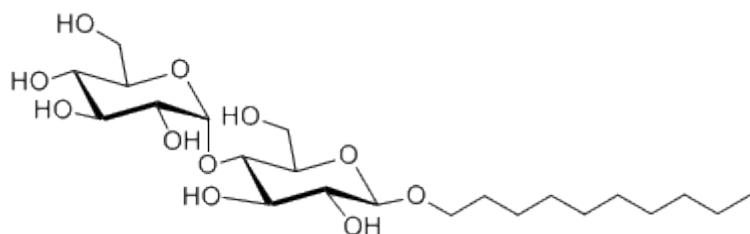
Pospeševalci sproščanja:

- Razgrajevalo: Ac-Di-Sol® – Natrijeva sol premrežene karboksimetilceluloze (slika 10).



Slika 10: Natrijeva karboksimetilceluloza.

- PAS: n-decil- β -D-maltopiranozid (slika 11) – površinsko aktivna snov primerna za povečanje topnosti proteinov brez denaturacije. (Affimetrix, ZDA)



Slika 11: n-decil- β -D-maltopiranozid.

Reagenti za pripravo pufernih raztopin:

- Klorovodikova kislina (37 %) – bistra, brezbarvna in kadeča se raztopina vodikovega klorida z ostrom vonjem. Je zelo korozivna in v stiku s kožo povzroča poškodbe. (Merck, Nemčija)
- Natrijev hidroksid ($> 99,0 \%$) – dobimo v obliki belih kroglic, je zelo higroskopen, zato mora biti dobro zaprt v vsebniku. Ob stiku s kožo povzroča razjede in je koroziven. (Merck, Nemčija)
- Natrijev klorid ($> 99,0 \%$) – brezbarvni kristali, brez vonja, zelo dobro topni v vodi. (Merck, Nemčija)
- Kalijev klorid ($> 99,0 \%$) – bel prašek, dobro topen v vodi. (Merck, Nemčija)
- Kalijev dihidrogen fosfat ($> 99,0 \%$) – bel prašek, higroskopen in dobro topen v vodi. (Merck, Nemčija)
- Dinatrijev hidrogen fosfat ($> 99,0 \%$) – bel prašek, zelo higroskopen in dobro topen v vodi. (Merck, Nemčija)

- Natrijev dihidrogen fosfat monohidrat (> 99,0 %) – bel prašek, higroskopen in dobro topen v vodi. (Merck, Nemčija)

Medij za pripravo alginatnih mikrodelcev:

Kalcijev klorid, brezvodni (> 98,0 %) – bel, kristaliničen higroskopen prašek. Dobro topen v vodi in etanolu.

Pufer za raztopljanje proteina:

V čašo natehtamo 4,45 g NaH₂PO₄ monohidrata, 4,38 g NaCl in dodamo 496 g demineralizirane vode. Ko se soli raztopijo, dodamo še 1,62 mL (32 % m/V) NaOH in umerimo pH 7,0 z 1 M NaOH.

Mediji za sproščanje proteina iz mikrodelcev:

- 10x fosfatni pufer pH 7,4 (10x PBS) – V 400 mL demineralizirane vode smo raztopili 40,0 g NaCl, 1,0 g KCl, 7,2 g Na₂HPO₄ in 1,2 g KH₂PO₄. Ko se je vse raztopilo, smo umerili pH 7,4 z 0,1 M NaOH. Nato smo dopolnili do 500 mL v bučko z demineralizirano vodo.
- 1x fosfatni pufer pH 7,4 (1x PBS) – V 400 mL demineralizirane vode smo raztopili 4,0 g NaCl, 0,1 g KCl, 0,72 g Na₂HPO₄ in 0,12 g KH₂PO₄. Ko se je vse raztopilo, smo umerili pH 7,4 z 0,1 M NaOH. Nato smo dopolnili do 500 mL v bučko z demineralizirano vodo.
- pH 3,0 medij – V 500 mL bučko smo odmerili 5,0 mL 0,1 M HCl in dopolnili do 500 mL z demineralizirano vodo. Nato smo v 0,001 M HCl raztopili 2,0 g NaCl, 0,51 g KCl in 0,032 g CaCl₂ in umerili pH raztopine na 3,0 z 0,1 M HCl.

Elektroforeza:

- Nu-PAGE® 4-12 % Bis-Tris gel (Invitrogen, ZDA) – predpripravljen gel vsebuje poliakrilamid z naraščajočo koncentracijo od 4 do 12 %.
- Nu-PAGE® Sample reducing agent (Invitrogen, ZDA) – vsebuje 500 mM reducentsa ditiotreitol (10x).
- Nu-PAGE® Sample buffer (Invitrogen, ZDA) – nanašalni pufer za vzorec vsebuje denaturant litijev dodecil sulfat (4xSB).

- Nu-PAGE® MES SDS Running buffer (Invitrogen, ZDA) – razvijalni pufer (20x); Pufer vsebuje 50 mM MES (2-morfolinetansulfonska kislina), 50 mM Tris Base (tri(hidroksimetil) aminometan), 0,1 % NaDS in 1 mM EDTA (etilendiamintetraocetna kislina). Pufer smo po navodilu pripravili tako, da smo zmešali 40 mL razvijalnega pufra z 760 mL demineralizirane vode.
- Novex® Sharp pre-stained protein standards (Invitrogen, ZDA) – obarvani proteinski standardi iz 12 proteinov velikosti od 3,5 – 260 kDa.
- Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen, ZDA) – modro barvilo Coomasie® brilliant blue za barvanje proteinov.

Filtracija mikrodelcev:

Membranski celulozno-acetatni filtri (velikost por 0,45 µm), Whatmann, Nemčija

3.2 APARATURE

- Analitska tehnica XP 205, Mettler Toledo, Švica
- Precizna tehnica BP 1200, Sartorius, Nemčija
- Kontaktni termometer, HI 9063 Hanna, Nemčija
- Magnetno mešalo MST digital IKA, Nemčija
- Liofilizator, Lio 5P Kambič, Slovenija
- Mešalnik za epruvete, Thermomixer comfort Eppendorf, Nemčija
- Stereo mikroskop, SZH10 Olympus s kamero DP12 Olympus, Japonska
- Enkapsulator, IE-50R Inotech, Švica
- UV/VIS spektrofotometer Safire² Tecan, Avstrija
- Centrifuga Sigma 3-30k Sartorius, Nemčija
- pH meter, SevenMulti Mettler Toledo, ZDA
- Avtomatske pipete, Mettler Toledo, ZDA
- SEM JSM-7001F Jeol, Japonska
- Powerease® 500 power supplly (Invitrogen, ZDA) – enota za električno napajanje.

3.3 METODE

3.3.1 Umeritvene premice BSA

Osnovno raztopino BSA s koncentracijo 50 mg BSA/mL smo v bučki redčili 50x s pufrom za raztopljanje proteina, da smo dobili raztopino s koncentracijo 1 mg BSA/mL. To smo

naprej redčili z različnimi mediji (1x PBS, 10x PBS, pH 3, pH 7) na točno določene koncentracije (glej preglednico 1). Za vsako umeritveno premico smo naredili 3 paralelke. Rezultatom smo odšteli absorbanco pripadajočega slepega vzorca. Izračunali smo povprečje in standardno deviacijo.

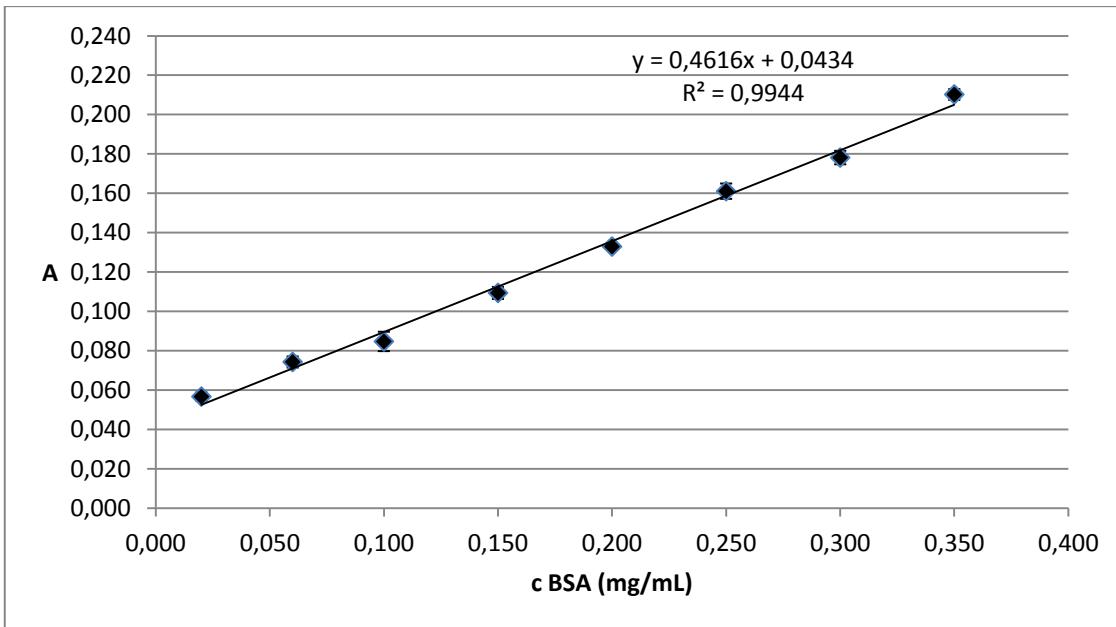
Preglednica 1: Koncentracije BSA v raztopinah za umeritvene premice.

Št. vzorca	Koncentracija BSA (mg/mL)	V standarda BSA (1 mg/mL) + V medija* {µL}
1	0,020	20 + 980
2	0,060	60 + 940
3	0,100	100 + 900
4	0,150	150 + 850
5	0,200	200 + 800
6	0,250	250 + 750
7	0,300	300 + 700
8	0,350	350 + 650

* - 1x PBS, 10x PBS, pH 3, pH 7

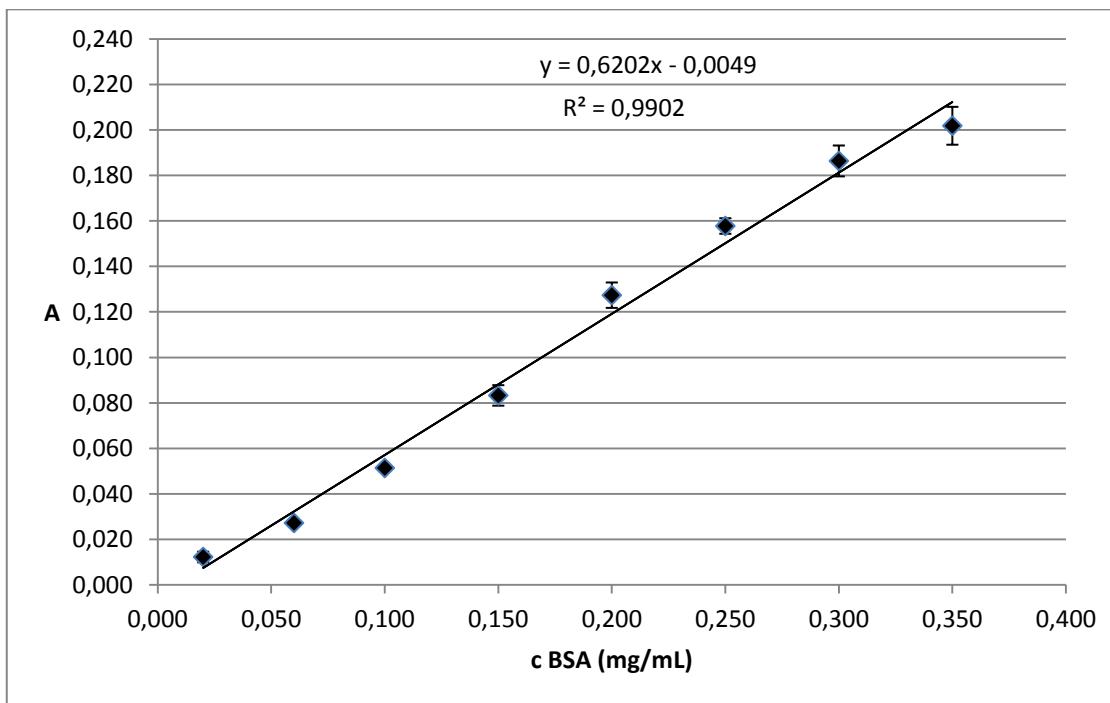
Umeritvene premice:

- 10xPBS



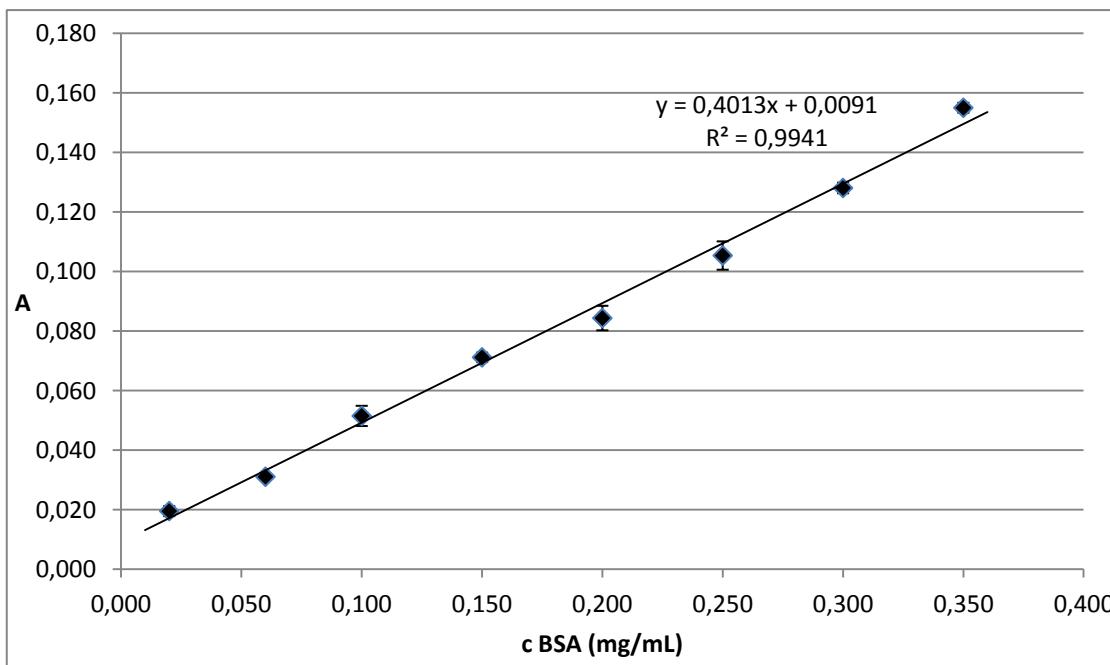
Graf 1: Umeritvena premica za BSA v 10xPBS pufru ($\lambda=280$ nm).

■ 1x PBS



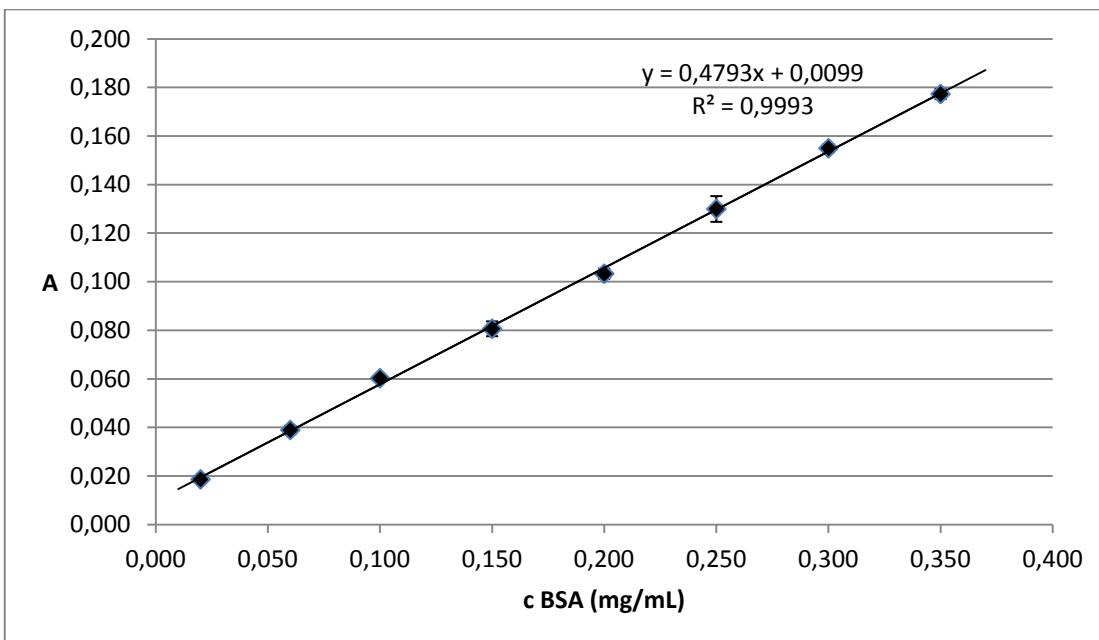
Graf 2: Umeritvena premica za BSA v 1xPBS pufru ($\lambda=280$ nm).

■ pH 3 medij



Graf 3: Umeritvena premica za BSA v pH 3 mediju ($\lambda=280$ nm).

■ pH 7 medij



Graf 4: Umeritvena premica za BSA v pH 7 mediju ($\lambda=280$ nm).

3.3.2 Priprava raztopin

Alginat: Pripravili smo 2 koncentraciji vsakega od obeh alginatov: 2,0 % in 2,5 % (m/V). Pripravili smo ju tako, da smo v čašo natehtali alginat ter ga raztopili v demineralizirani vodi na magnetnem mešalu čez noč.

CaCl_2 : Pripravili smo 4 koncentracije premreževalnega medija CaCl_2 . 0,5 M, 0,2 M, 0,1 M in 0,05 M raztopino smo pripravili tako, da smo natehtali CaCl_2 v čaše in ga raztopili v demineralizirani vodi.

Raztopina BSA: 50 mg/mL raztopino BSA smo pripravili tako, da smo na analitski tehnicni natehtali liofilizirani BSA in ga raztopili v čaši s pufrom za raztopljanje proteina ob počasnem mešanju na magnetnem mešalu.

20 % (m(BSA)/m(alginat)) raztopina BSA in alginata v vodi: V vsebnik smo odmerili 35,0 mL 2,0 % raztopine alginata in nato dodali 2800 μL 50 mg/mL raztopine BSA ter na nizkih obratih mešali 15 min na magnetnem mešalu.

20 % (m(BSA)/m(alginat)) raztopina BSA in alginata 40G v vodi + 4 % AcDiSol: V vsebnik smo odmerili 35,0 mL 2,0 % raztopine alginata 40G in primešali 28 mg razgrajevala Ac-Di-Sol®. Nato smo dodali 2800 μL 50 mg/mL raztopine BSA ter na nizkih obratih mešali 15 min na magnetnem mešalu.

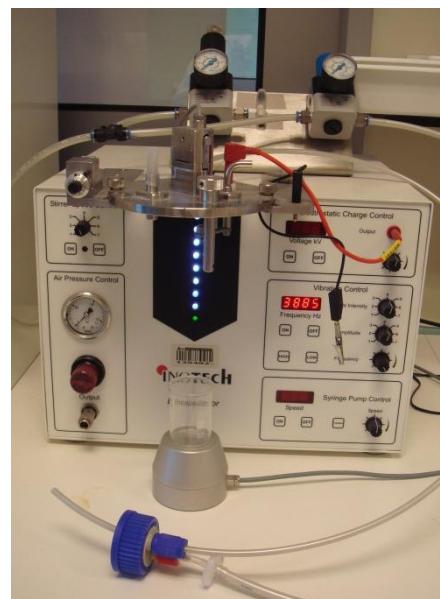
20 % (m(BSA)/m(alginat)) raztopina BSA in alginata 40G v vodi + 4 % AcDiSol + n-decil- β -maltopiranozid: V vsebnik smo odmerili 35,0 mL 2,0 % raztopine alginata 40G in primešali 28 mg razgrajevala Ac-Di-Sol® in 280 mg PAS n-decil- β -maltopiranozida. Nato smo dodali 2800 μ L 50 mg/mL raztopine BSA ter na nizkih obratih mešali 15 min na magnetnem mešalu.

3.3.3 Priprava placebo mikrodelcev

Mikrodelce smo izdelali s kapljično metodo z napravo Inotech IE-50 R. Uporabljali smo enokanalne šobe velikosti 150 μ m, 250 μ m in 500 μ m. Raztopino alginata smo dovajali skozi šobo s 50 mL brizgo. V čaše smo odmerili 40,0 mL raztopin CaCl₂ s koncentracijami 0,5 M, 0,2 M, 0,1 M in 0,05 M, ki smo jih podstavili pod šobo na magnetno mešalo. Vklopili smo magnetno mešalo in nastavili obrate na 7. stopnjo, amplitudo na 5. stopnjo in nato začeli z dovajanjem alginata. Nato smo vklopili stroboskop in nihajočo membrano. Dokler ni bil curek enakomeren in enakomerno prekinjen, kar smo uravnali s hitrostjo dovajanja alginata skozi šobo in frekvenco nihanja membrane, ki je prekinjala curek, smo tekočino lovili v čašo za odpad. Kapljice alginata smo lovili v čaše s CaCl₂ in jih dali na magnetno mešalo, kjer smo pustili mikrodelce utrjevati 30 min. Po utrjevanju smo mikrodelce filtrirali z odsesavanjem na nuči in jih prenesli v vsebnike za sušenje.

3.3.4 Priprava mikrodelcev z BSA

Mikrodelce s proteinom smo izdelali na isti napravi, le z manjšimi modifikacijami. Uporabljali smo 250 μ m šobo. Raztopino BSA v alginatu smo dovajali iz steklene posode s pokrovčkom pod nadtlakom dušika. Tlak smo nadzirali na posebnem ventilu nad napravo. Modifikacijo naprave smo naredili zaradi boljše ponovljivosti pretoka tekočine skozi napravo v primerjavi s starim načinom s pomočjo brizge. V čaše smo odmerili 40,0 mL raztopine CaCl₂ s koncentracijo 0,5 M in 0,1 M in jih podstavili pod šobo naprave ter vklopili magnetno mešalo in ga nastavili na 7. stopnjo.



Slika 12: Enkapsulator Inotech IE-50R.

Amplitudo smo pustili nastavljeni na 5. stopnji. Najprej smo uravnali pretok alginata skozi šobo s pomočjo ventila za nadzor nadtlaka dušika, nato pa vklopili stroboskop in nastavili frekvenco vibrirajoče membrane, da je bil curek enakomerno prekinjen. Prve frakcije curka smo lovili v čašo za odpad. Ko je bil curek ustrezni, smo lovili kapljice v čaše z raztopino premreževalca CaCl_2 . Mikrodelce smo utrjevali 30 min na magnetnem mešalu. Po utrjevanju smo mikrodelce filtrirali z odsesavanjem na nuči in jih prenesli v viale za sproščanje ali liofilizacijo.

3.3.5 Liofilizacija

Po filtriranju smo mikrodelce prenesli v viale, jih zamrznili v tekočem dušiku, viale položili na pladnje in liofilizirali pri -100°C in pri tlaku 0,008 mbar 24 h v liofilizatorju Lio 5P (slika 13).

3.3.6 Sušenje na zraku

Mikrodelce smo po filtriranju prenesli na folijo in jih tako sušili dan ali dva. Ko so se popolnoma posušili smo jih prenesli v viale.



Slika 13: Liofilizator Kambič Lio 5P.

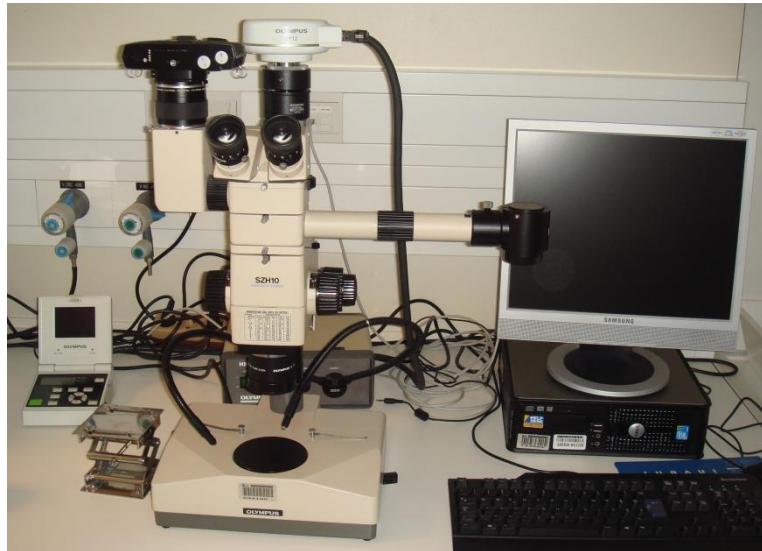
3.3.7 Morfološko vrednotenje mikrodelcev z SEM mikroskopom

Liofilizirane in na zraku posušene mikrodelce smo prenesli na dvostranski trak iz ogljika in jih analizirali. Opazovali smo strukturo površine mikrodelcev.

3.3.8 Morfološko vrednotenje in merjenje velikosti MD pod optičnim mikroskopom

Sveže in posušene mikrodelce smo opazovali pod optičnim mikroskopom (slika 14). Dobljene slike smo obdelali s programskim paketom analiSys®. Mikrodelce smo dali na objektno steklo, jim izmerili velikost ter opazovali njihovo strukturo in obliko. V vsakem

vzorcu smo izbrali 4 mikodelce. Vsakemu mikodelcu smo velikost izmerili trikrat in nato rezultate povprečili. Velikost smo izmerili svežim MD takoj po nučiranju, ter po sušenju na zraku in po sušenju z liofilizacijo.



Slika 14: Mikroskop SZH10 Olympus s kamero DP12 Olympus.

3.3.9 Vgrajevanje proteina v mikodelce

Učinkovitost vgradnje (EE) BSA v mikodelce smo računali po naslednji enačbi:

$$EE\% = \frac{m_1(BSA)}{m_0(BSA)} \times 100\%$$

pri čemer predstavlja m_1 maso vgrajenega BSA, ki je ostala v mikodelcih po 30 min utrjevanja v CaCl_2 in m_0 je masa BSA v neutrjenih mikodelcih.

Računali smo tudi začetni in končni delež BSA v mikodelcih. Začetni delež smo računali po enačbi:

$$Li\% = \frac{m_0(BSA)}{m(\text{mikodelcev})} \times 100\%$$

pri čemer predstavlja m_0 maso BSA v neutrjenih MD in m predstavlja maso svežih mikodelcev, ki smo jih stehtali po filtraciji.

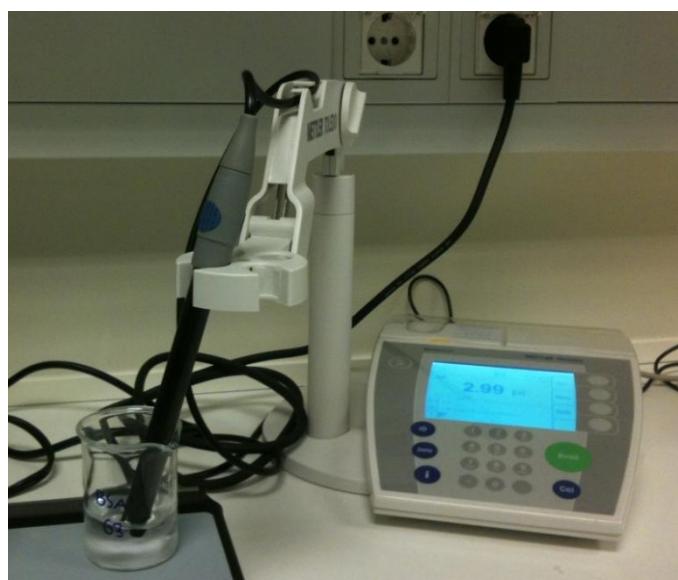
Končni delež BSA v mikrodelcih smo računali po enačbi:

$$Lf\% = \frac{m_1(BSA)}{m(mikrodelcev)} \times 100\%$$

pri čemer predstavlja m_1 maso BSA, ki je ostala v mikrodelcih po 30 min utrjevanja v CaCl_2 , m pa predstavlja maso svežih mikrodelcev, ki smo jih stehtali po filtraciji.

3.3.10 Sproščanje BSA iz MD v različnih medijih (10x PBS, 1x PBS in v mediju s spremembo pH iz 3 na 7)

Sproščanje BSA iz mikrodelcev smo izvajali v različnih medijih. Določeno količino izdelanih MD smo prenesli v vialo ali čašo, dodali 20,0 mL medija in mešali na magnetnem mešalu na temperaturi 37°C (slika 15). Vzorčili smo ob času 0 h, 1 h, 3 h, 5 h in 24 h. Pri sproščanju s spremembou pH medija smo prvi 2 uri sproščali v 20 mL medija s pH 3,0, po tem času pa smo dodali 10 mL 1x PBS pufra in umerili pH na 7,0 z dodatkom 0,1 M NaOH. Volumni dodanega HCl in NaOH so bili zanemarljivi. Vzorčili smo 1000 µL medija ob času 0 h, 0,5 h, 1,5 h, 2,0 h (dvig pH na 7), 2,5 h, 3,0 h, 5,0 h in 24 h.



Slika 15: Sproščanje BSA iz mikrodelcev v mediju s pH 3.

3.3.11 UV/VIS analiza vzorcev z BSA pri sproščanju BSA iz mikrodelcev

Koncentracijo BSA v vzorcih smo določili z UV/VIS metodo s spektrofotometrom. Vzorce smo ob točno določenih urah jemali iz vial z mikrodelci. Odvzeli smo 1000 µL vzorca in 500 µL takoj nadomestili s svežim medijem. Epruvete smo centrifugirali na 20000 rpm 15 min pri 5°C. Po centrifugiranju smo 500 µL supernatanta prenesli v drugo epruveto, preostali supernatant z usedlino vred pa smo vrnili v vialo za sproščanje.

Koncentracijo smo določali tako, da smo $300 \mu\text{L}$ supernatanta prenesli v mikrotitrsko ploščico in izmerili absorbance na spektrofotometru pri valovni dolžini 280 nm . Za slepi vzorec smo vzeli sveži medij.

3.3.12 Izračun koncentracije in mase BSA

Koncentracijo BSA v raztopinah smo računali po naslednji enačbi:

$$c(\text{BSA}) = \frac{(A(\text{vzorca}) - A(\text{slepa})) - m}{b}$$

$A(\text{vzorca})$ – absorbanca vzorca iz raztopine

$A(\text{slepa})$ – absorbanca slepe raztopine

m, b – faktorja vzeta iz umeritvene premice $y = b*x + m$

Maso BSA v mediju ob n-tem vzorcu smo računali po naslednji enačbi:

$$m(\text{BSA})_n = c_n * V + \sum_{n=1}^i c_n * 0,5mL$$

$m(\text{BSA})_n$ – masa BSA v mediju ob n-tem vzorcu (mg)

n – število vzorcev: 1, 2, 3, ..., i

c_n – koncentracija BSA v mediju ob n-tem vzorcu (mg/mL)

V – volumen medija (mL)

$0,5 \text{ mL}$ – volumen odvzetega vzorca, ki je šel na analizo

Delež sproščenega proteina v mediju smo računali po naslednji enačbi:

$$X_n(\text{BSA}) = \left(\frac{m_n(\text{BSA})}{m_0(\text{BSA})} \right) \times 100\%$$

X_n - delež sproščenega BSA v mediju ob n-tem jemanju vzorca (%)

m_0 – teoretična masa BSA v MD (mg)

3.3.13 Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza (NaDS-PAGE) s sistemom Novex®

Priprava vzorcev za nanos na gel:

- Vzorci BSA iz raztopine premreževalca po filtraciji mikrodelcev: K $13 \mu\text{L}$ izhodnega vzorca smo dodali $2 \mu\text{L}$ reducenta in $5 \mu\text{L}$ nanašalnega pufra. Na gel smo nanesli $10 \mu\text{L}$ vzorca.
- Vzorci BSA iz raztopine medija za sproščanje ob času 24 h: K $19,5 \mu\text{L}$ izhodnega vzorca smo dodali $3 \mu\text{L}$ reducenta in $7,5 \mu\text{L}$ nanašalnega pufra. Na gel smo nanesli $25 \mu\text{L}$ vzorca.

- Vzorec standardne raztopine BSA c=50 mg/mL: K 6,5 µL izhodnega vzorca smo dodali 1 µL reducenta in 2,5 µL nanašalnega pufra. Na gel smo nanesli 5 µL vzorca.
- Standard velikosti proteinov (3,5-260 kDa): Na gel smo nanesli 5 µL standarda.

Vzorce smo centrifugirali 10 s na 6000 rpm pri sobni temperaturi. Nato smo jih mešali 5 min na 70°C.

Vzorce smo nanesli na gel v naslednjem zaporedju:

- 1- Standard velikosti proteinov (3,5 kDa-260 kDa); nanešeno 5 µL vzorca.
- 2- Standard BSA (50 mg/mL); nanešeno 5 µL vzorca.
- 3- CaCl₂ BSA-58 (~0,45 mg/mL BSA); nanešeno 10 µL vzorca.
- 4- CaCl₂ BSA-60 (~0,45 mg/mL BSA); nanešeno 10 µL vzorca.
- 5- CaCl₂ BSA-62 (~0,45 mg/mL BSA); nanešeno 10 µL vzorca.
- 6- Vzorec ob 24 h BSA-58 (~0,04 mg/mL BSA); nanešeno 25 µL vzorca.
- 7- Vzorec ob 24 h BSA-60 (~0,04 mg/mL BSA); nanešeno 25 µL vzorca.
- 8- Vzorec ob 24 h BSA-62 (~0,04 mg/mL BSA); nanešeno 25 µL vzorca.

Elektroforeza:

Pripravili smo elektroforezno kadičko in gel. Gel smo vzeli iz vrečke in ga najprej sprali z demineralizirano vodo in še enkrat z razvijalnim pufrom na strani z žepki. Kaseto z gelom smo vstavili v kadičko in jo napolnili z razvijalnim pufrom (slika 16). Vzorce smo odpipetirali na dno žepkov v gelu. Elektroforezo smo izvajali 35 min pri napetosti 200 V, začetnemu toku 125 mA in končnemu toku 80 mA.

Barvanje proteinov:

Po koncu elektroforeze smo gel sprali z demineralizirano vodo. Potem smo ga dali v petrijevko in dolili 40 mL barvila za proteine, ki smo ga prej segreli na 50°C. Gel smo barvali 30 min ob rahlem stresanju. Po barvanju smo odlili barvilo in gel razbarvali preko noči v demineralizirani vodi.



Slika 16: Komplet za elektroforezo.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 DOLOČITEV OPTIMALNIH POGOJEV IZDELAVE ALGINATNIH MIKRODELCEV

Mikrodelce smo vrednotili vizualno po ocenah predstavljenih v preglednici 2. Primerjali smo MD, ki smo jih izdelali z različno velikostjo šobe in posušili bodisi na zraku ali z liofilizacijo. Ocenjevali smo izgled, obliko in zlepljenost mikrodelcev med seboj in na podlago. Na koncu smo podali povprečno oceno.

Preglednica 2: Razlaga ocen morfologije mikrodelcev.

OCENA	POMEN
1	Mikrodelci so popolnoma neobstojni že po filtriranju.
2	Mikrodelci se zlepijo med sabo, so nepravilnih oblik.
3	Mikrodelci so nepravilnih oblik, lahko tudi zlepljeni med sabo.
4	Mikrodelci so delno pravilnih oblik, ne lepijo se med sabo, lepo odstopijo od podlage.
5	Mikrodelci so lepe okrogle oblike, ločeni med seboj in lepo odstopijo od podlage.

*rumenoobarvanje okanca v tabeli pomeni, da so se mikrodelci prilepili na podlago med sušenjem na zraku

4.1.1 Vpliv procesnih parametrov izdelave (velikost šobe, koncentracija alginata, stopnja premreženja, način sušenja) na morfologijo MD – Alginat 40G

Izdelali smo MD s 3 šobami velikosti 150 µm, 250 µm in 500 µm. Uporabili smo alginat 40G v koncentraciji 2,0 % in 2,5 % (m/V). MD smo premrežili v CaCl₂ koncentracije 0,5 M, 0,2 M, 0,1 M in 0,05 M. Na koncu smo jih posušili z liofilizacijo in na zraku.

A) Alginat 40G 2,0 %

Preglednica 3: Vzorci izdelani iz 2,0 % alginata 40G s 150 µm šobo.

Alginat 40G 2,0%	Šoba= 150µm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 3400Hz	Povp. velikost MD (µm)
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	
27	zrak	0,5	1	/
27	liofilizacija	0,5	1	344
28	zrak	0,2	1	/
28	liofilizacija	0,2	1	446
29	zrak	0,1	1	/
29	liofilizacija	0,1	2	409
30	zrak	0,05	2	/
30	liofilizacija	0,05	2	510
			Povprečna ocena zrak:	1,3
			Povprečna ocena liof:	1,5

Preglednica 4: Vzorci izdelani iz 2,0 % alginata 40G s 250 µm šobo.

Alginat 40G 2,0%	Šoba= 250µm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 3010Hz	Povp. velikost MD (µm)
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	
43	zrak	0,5	3	465
43	liofilizacija	0,5	3	631
44	zrak	0,2	2	/
44	liofilizacija	0,2	3	591
45	zrak	0,1	1	/
45	liofilizacija	0,1	4	758
46	zrak	0,05	2	/
46	liofilizacija	0,05	4	721
			Povprečna ocena zrak:	2,0
			Povprečna ocena liof:	3,5

Preglednica 5: Vzorci izdelani iz 2,0 % alginata 40G s 500 µm šobo.

Alginat 40G 2,0%	Šoba= 500µm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 3860Hz	Povp. velikost MD (µm)
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	
47	zrak	0,5	5	764
47	liofilizacija	0,5	5	842
48	zrak	0,2	5	714
48	liofilizacija	0,2	5	1007
49	zrak	0,1	5	709
49	liofilizacija	0,1	5	974
50	zrak	0,05	4	651
50	liofilizacija	0,05	5	1089
			Povprečna ocena zrak:	4,8
			Povprečna ocena liof:	5,0

B) Alginat 40G 2,5 %

Preglednica 6: Vzorci izdelani iz 2,5 % alginata 40G s 150 µm šobo.

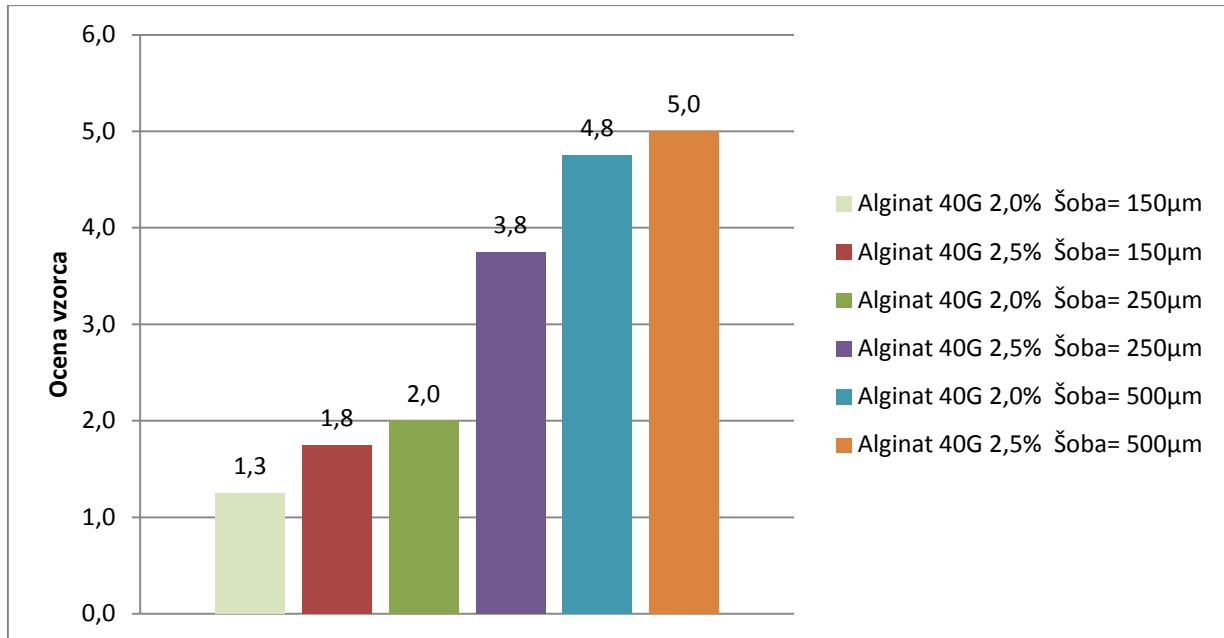
Alginat 40G 2,5%	Šoba= 150µm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 3022Hz	
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	Povp. velikost MD (µm)
35	zrak	0,5	1	/
35	liofilizacija	0,5	3	482
36	zrak	0,2	2	/
36	liofilizacija	0,2	4	396
37	zrak	0,1	2	/
37	liofilizacija	0,1	4	584
38	zrak	0,05	2	/
38	liofilizacija	0,05	3	502
		Povprečna ocena zrak:	1,8	
		Povprečna ocena liof:	3,5	

Preglednica 7: Vzorci izdelani iz 2,5 % alginata 40G s 250 µm šobo.

Alginat 40G 2,5%	Šoba= 250µm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 3200Hz	
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	Povp. velikost MD (µm)
31	zrak	0,5	5	503
31	liofilizacija	0,5	5	815
32	zrak	0,2	5	/
32	liofilizacija	0,2	5	668
33	zrak	0,1	4	/
33	liofilizacija	0,1	5	679
34	zrak	0,05	1	/
34	liofilizacija	0,05	4	656
		Povprečna ocena zrak:	3,8	
		Povprečna ocena liof:	4,8	

Preglednica 8: Vzorci izdelani iz 2,5 % alginata 40G s 500 µm šobo.

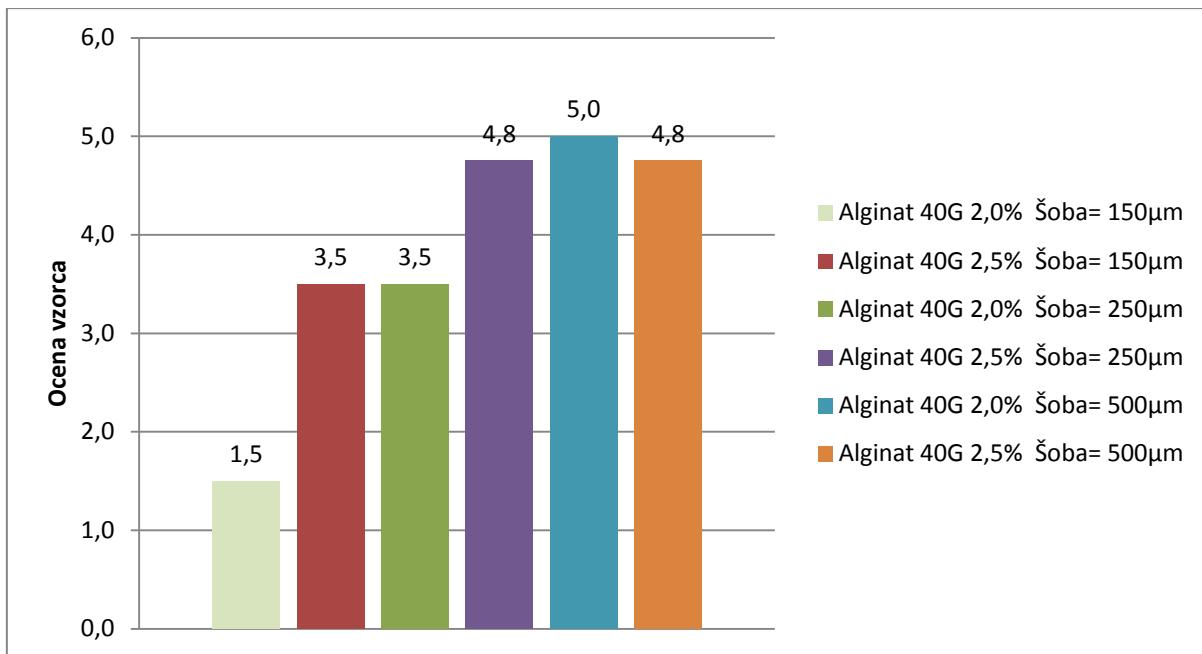
Alginat 40G 2,5%	Šoba= 500µm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 3860Hz	
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	Povp. velikost MD (µm)
39	zrak	0,5	5	988
39	liofilizacija	0,5	5	1119
40	zrak	0,2	5	919
40	liofilizacija	0,2	5	1307
41	zrak	0,1	5	744
41	liofilizacija	0,1	4	686
42	zrak	0,05	5	850
42	liofilizacija	0,05	5	1322
		Povprečna ocena zrak:	5,0	
		Povprečna ocena liof:	4,8	



Graf 5: Vizualna ocena MD, sušenih na zraku, izdelanih z različno velikostjo šobe pri dveh koncentracijah alginata 40G 2,0 % in 2,5 %.

Na grafu 5 vidimo, da imajo MD, ki smo jih izdelali z večjo šobo, boljše ocene. Lepše MD smo dobili pri višji koncentraciji (2,5 %) alginata 40G, kot pri nižji koncentraciji (2,0 %) na isti šobi. Iz preglednic 3-8 in grafa 5 je razvidno, da smo MD lahko posušili na zraku le pri izdelavi z največjo 500 µm šobo, saj so bile ocene pri manjših šobah precej nižje.

Lepljenje MD na podlago pri alginatu 40G ni bilo obsežno, vendar pa so MD pogosto izgubili svojo obliko, še posebej pri velikosti šobe 150 µm. Taki MD neprimerne oblike niso primerni za nadaljnjo uporabo.



Graf 6: Vizualna ocena MD, sušenih z liofilizacijo, izdelanih z različno velikostjo šobe pri dveh koncentracijah alginata 40G 2,0 % in 2,5 %.

Liofilizacija je bila bolj primerna za sušenje MD manjših velikosti, kar se vidi iz primerjave ocen iz grafov 5 in 6. Na grafu 6 so ocene morfologije MD opazno višje kot na grafu 5. Ponovno smo pri uporabi šobe z velikostjo 500 µm dobili najlepše MD. Vendar pa so bili ti MD večji kot je bil cilj diplomske naloge, da izdelamo MD <1000 µm. V nekaterih primerih z uporabo manjše šobe pa so se MD posušili v obliki vlknastih struktur, kar ni bil naš cilj, saj smo želeli izdelati MD pretežno sferičnih oblik.

Iz literature je znano, da koncentracija alginata v raztopini pomembno vpliva na tvorbo MD (18,19). Večja koncentracija alginata se odrazi v večji gostoti ogrodja MD in tako nastanejo lepši MD. To so pokazali tudi naši rezultati, kljub temu da smo MD izdelali pri dokaj nizkih koncentracijah alginata 40G z nizko razliko 2,0 - 2,5 % (z namenom, da dobimo čim manjše MD). Pri našem delu in izbranih parametrih je imela najpomembnejšo vlogo na tvorbo MD velikost šobe. Primerni sta bili 250 µm in 500 µm šobi, 150 µm pa se je izkazala za neprimerno. Pri 150 µm velikosti šobe so najverjetneje v raztopino CaCl₂ kapljale manjše kapljice, ki so težje obdržale obliko primerno za nadaljnjo uporabo.

4.1.2 Vpliv procesnih parametrov izdelava (velikost šobe, koncentracija alginata, stopnja premreženja, način sušenja) na morfologijo MD – Alginat 70G

Izdelali smo MD s 3 šobami velikosti 150 µm, 250 µm in 500 µm. Alginat 70G smo uporabili v koncentraciji 2,0 % in 2,5 % (m/V). MD smo premrežili v CaCl₂ koncentracije 0,5 M, 0,2 M, 0,1 M in 0,05 M. Na koncu smo jih posušili z liofilizacijo in na zraku.

A) Alginat 70G 2,0 %

Preglednica 9: Vzorci izdelani iz 2,0 % alginata 70G s 150 µm šobo.

Alginat 70G 2,0%	Šoba= 150µm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 4560Hz	Povp. velikost MD (µm)
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	
67	zrak	0,5	2	/
67	liofilizacija	0,5	2	341
68	zrak	0,2	2	/
68	liofilizacija	0,2	2	/
69	zrak	0,1	2	/
69	liofilizacija	0,1	2	244
70	zrak	0,05	2	/
70	liofilizacija	0,05	2	/
			Povprečna ocena zrak:	2,0
			Povprečna ocena liof:	2,0

Preglednica 10: Vzorci izdelani iz 2,0 % alginata 70G s 250 µm šobo.

Alginat 70G 2,0%	Šoba= 250µm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 3120Hz	Povp. velikost MD (µm)
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	
59	zrak	0,5	2	/
59	liofilizacija	0,5	3	415
60	zrak	0,2	3	/
60	liofilizacija	0,2	2	495
61	zrak	0,1	3	/
61	liofilizacija	0,1	2	515
62	zrak	0,05	2	/
62	liofilizacija	0,05	2	/
			Povprečna ocena zrak:	2,5
			Povprečna ocena liof:	2,3

Preglednica 11: Vzorci izdelani iz 2,0 % alginata 70G s 500 µm šobo.

Alginat 70G 2,0%	Šoba= 500µm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 3100Hz	Povp. velikost MD (µm)
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	
51	zrak	0,5	3	/
51	liofilizacija	0,5	3	1326
52	zrak	0,2	4	997
52	liofilizacija	0,2	4	950
53	zrak	0,1	4	832
53	liofilizacija	0,1	4	1144
54	zrak	0,05	3	/
54	liofilizacija	0,05	4	1294
			Povprečna ocena zrak:	3,5
			Povprečna ocena liof:	3,8

B) Alginat 70G 2,5 %

Preglednica 12: Vzorci izdelani iz 2,5 % alginata 70G s 150 µm šobo.

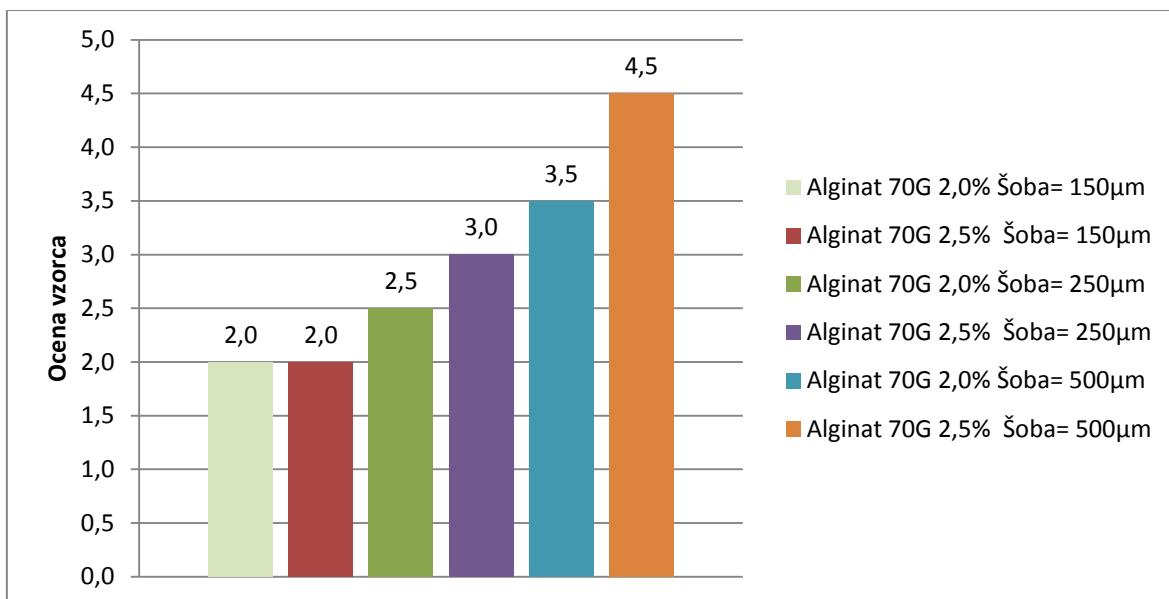
Alginat 70G 2,5%	Šoba= 150µm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 4390Hz	Povp. velikost MD (µm)
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	
71	zrak	0,5	2	/
71	liofilizacija	0,5	2	557
72	zrak	0,2	2	/
72	liofilizacija	0,2	3	475
73	zrak	0,1	2	/
73	liofilizacija	0,1	2	/
74	zrak	0,05	2	/
74	liofilizacija	0,05	3	598
			Povprečna ocena zrak:	2,0
			Povprečna ocena liof:	2,5

Preglednica 13: Vzorci izdelani iz 2,5 % alginata 70G s 250 µm šobo.

Alginat 70G 2,5%	Šoba= 250µm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 3120Hz	Povp. velikost MD (µm)
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	
63	zrak	0,5	3	/
63	liofilizacija	0,5	5	620
64	zrak	0,2	3	493
64	liofilizacija	0,2	4	596
65	zrak	0,1	3	/
65	liofilizacija	0,1	2	/
66	zrak	0,05	3	/
66	liofilizacija	0,05	3	606
			Povprečna ocena zrak:	3,0
			Povprečna ocena liof:	3,5

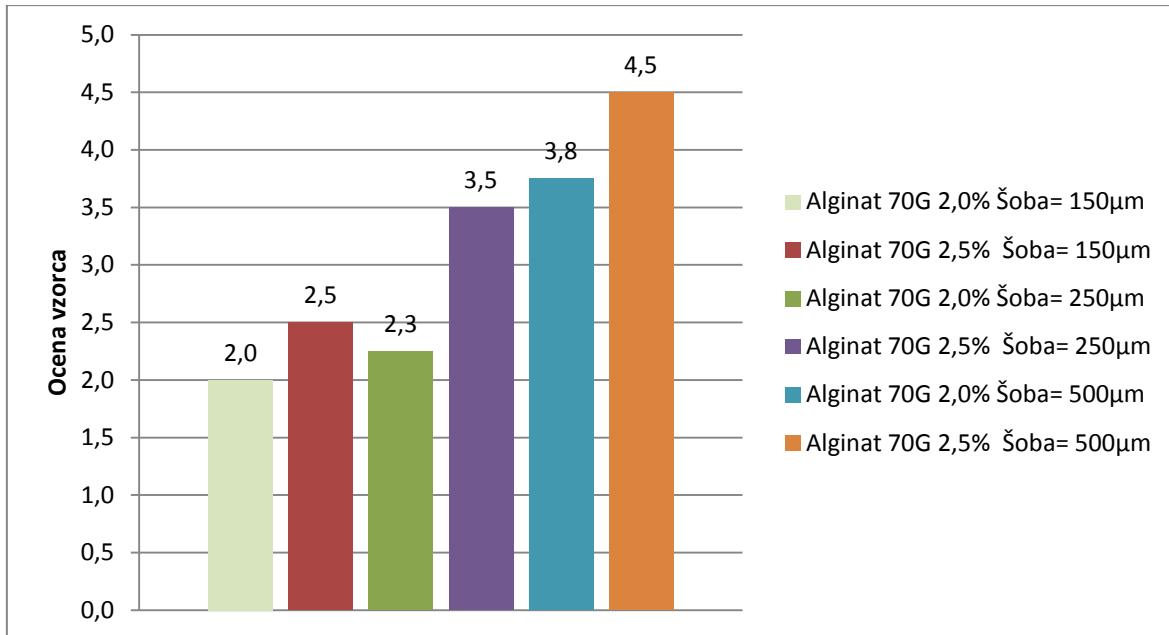
Preglednica 14: Vzorci izdelani iz 2,5 % alginata 70G s 500 μm šobo.

Alginat 70G 2,5%	Šoba= 500 μm	Čas mešanja= 30 min	frekvenca - 2990Hz	Povp. velikost MD (μm)
Št. Vzorca	Vrsta sušenja	M CaCl ₂ (mol/L)	Ocena vzorca	
55	zrak	0,5	5	866
55	liofilizacija	0,5	4	1194
56	zrak	0,2	5	804
56	liofilizacija	0,2	4	1233
57	zrak	0,1	3	926
57	liofilizacija	0,1	5	1800
58	zrak	0,05	5	/
58	liofilizacija	0,05	5	1700
		Povprečna ocena zrak:	4,5	
		Povprečna ocena liof:	4,5	



Graf 7: Vizualna ocena MD, sušenih na zraku in izdelanih z različno velikostjo šobe pri koncentracijah alginata 70G 2,0 % in 2,5 %.

Graf 7 prikazuje ocene MD, ki so bile višje, če smo jih izdelali z večjo šobo ter z večjo koncentracijo alginata 70G. Na podlagi primerjave rezultatov iz preglednic 9-14 in ocen iz grafa 7 za alginat 70G in rezultatov za alginat 40G (graf 5 in preglednice 3-8) vidimo, da je alginat 70G manj primeren za sušenje na zraku kot alginat 40G, saj so se MD bolj lepili na podlago pri alginatu 70G. Spet smo opazili, da so iz bolj koncentriranega alginata 70G nastali lepši mikrodelci. Pri uporabi večje šobe smo dobili večje in lepše MD, ki so obdržali sferično obliko tudi po sušenju na zraku.



Graf 8: Vizualna ocena MD, sušenih z liofilizacijo in izdelanih z različno velikostjo šobe pri koncentracijah alginata 70G 2,0 % in 2,5 %.

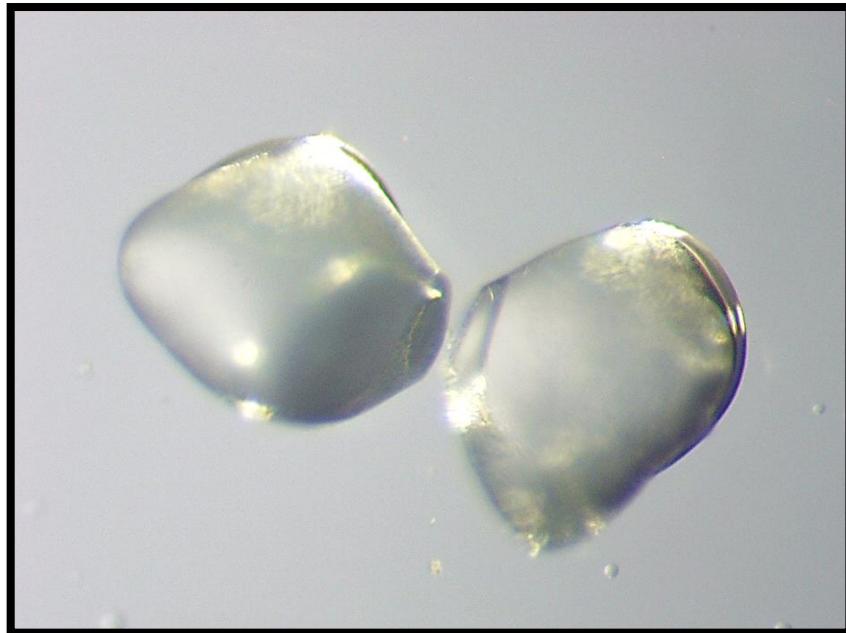
Graf 8 prikazuje ocene MD, ki so boljše, če so bili MD izdelani z večjo šobo in z višjo koncentracijo alginata. Iz grafov 7 in 8 je razvidno, da so bili liofilizirani mikrodelci podobni MD sušenim na zraku. Z večanjem velikosti šobe se je izgled MD izboljšal. Tudi večja koncentracija alginata 70G je izboljšala izgled MD.

Glede na dobljene rezultate lahko povzamemo:

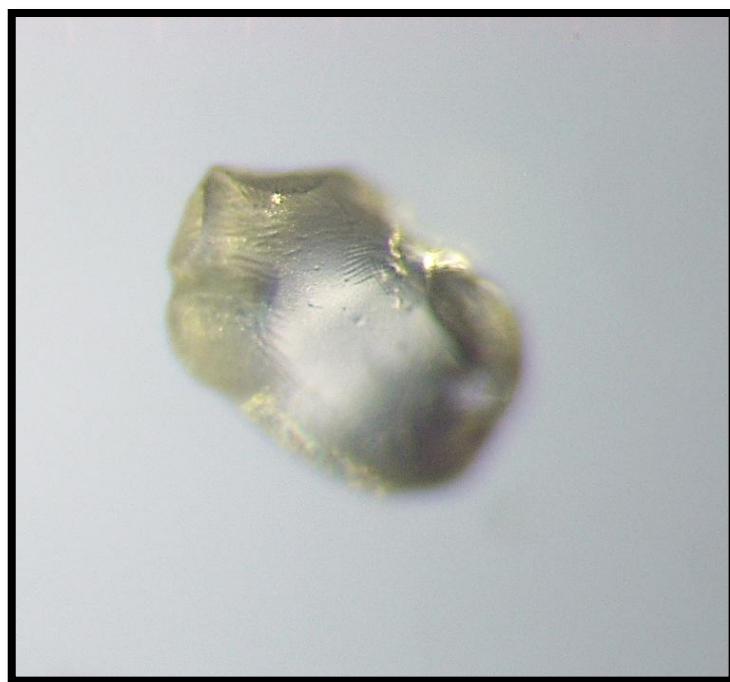
- Večja ko je šoba, lepsi mikrodelci nastanejo. Pri večji šobi nastanejo večje kapljice, ki lažje ohranijo svojo strukturo in so zato manj občutljive za vse obremenitve (trki, difuzija polimera v raztopino, lepljenje MD med sabo ali na podlago).
- Z večanjem koncentracije alginata dobimo na isti šobi morfološko lepše MD. Večja koncentracija alginata po premreženju daje bolj gost gel, ki lažje obdrži svojo obliko. Bolj ko mikrodelci obdržijo svojo obliko, manj se lepijo med sabo in na podlago. Razlike smo opazili, kljub majhni razlike v koncentraciji alginata.
- Med alginatom 40G, ki ima manj guluronske kisline in alginatom 70G z več guluronske kisline ni bistvene razlike v izgledu nastalih mikrodelcev. Pri alginatu 70G je bilo več težav pri sušenju MD na zraku, saj so se lepili na podlago.

4.1.3 Optična mikroskopija mikrodelcev

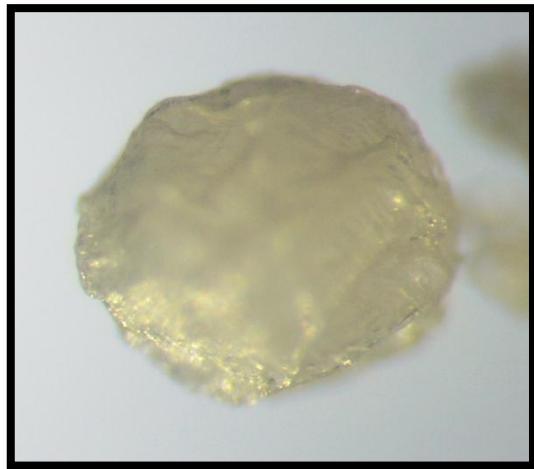
Na sliki 17 so predstavljeni sveži mikrodelci, ki smo jih slikali pod optičnim mikroskopom takoj po nučiranju, sliki 18 in 19 pa predstavljata MD, ki smo jih posušili bodisi na zraku ali z liofilizacijo.



Slika 17: Mokri mikrodelci; alginat 40G 2,5 %; šoba 250 μm ; velikost levi 482 μm in desni 475 μm .

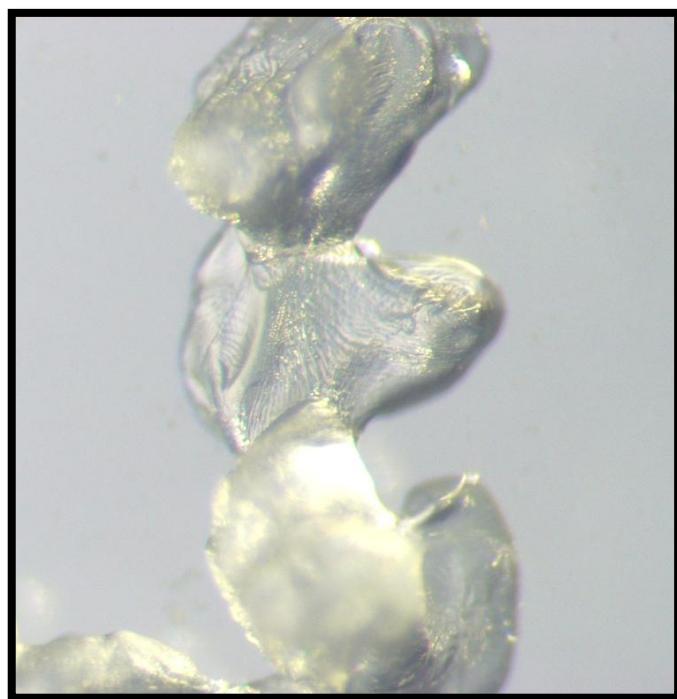


Slika 18: Na zraku sušeni mikrodelci; alginat 40G 2,5 %; šoba 250 μm ; velikost 507 μm .

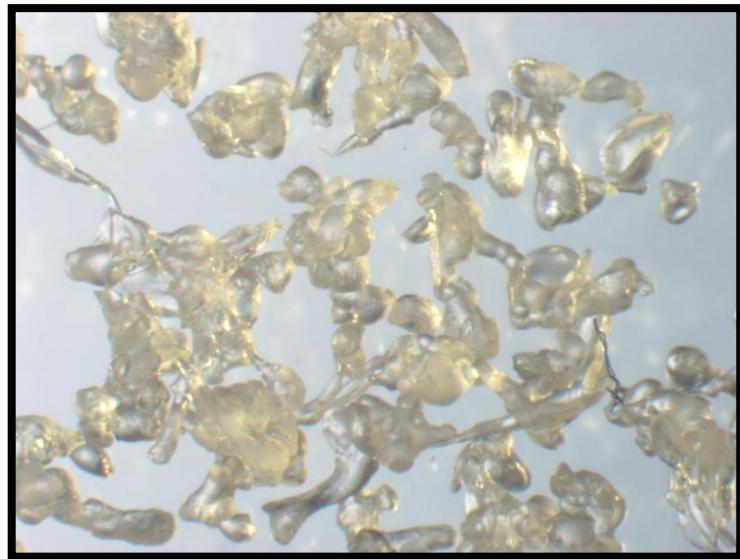


Slika 19: Liofilizirani mikrodelci; alginat 40G 2,5 %; šoba 250 µm, velikost 668 µm.

Slike 20-22 prikazujejo različne primere zlepljenih ali drugače deformiranih MD, ki niso primerni za nadaljnjo uporabo. Na sliki 20 so predstavljeni sveži mikrodelci, ki smo jih slikali takoj po nučiranju, sliki 21 in 22 pa predstavljata MD, ki smo jih posušili bodisi na zraku ali z liofilizacijo.



Slika 20: Sveži mikrodelci; alginat 40G 2,0 %; šoba 150 µm; velikost 476 µm.



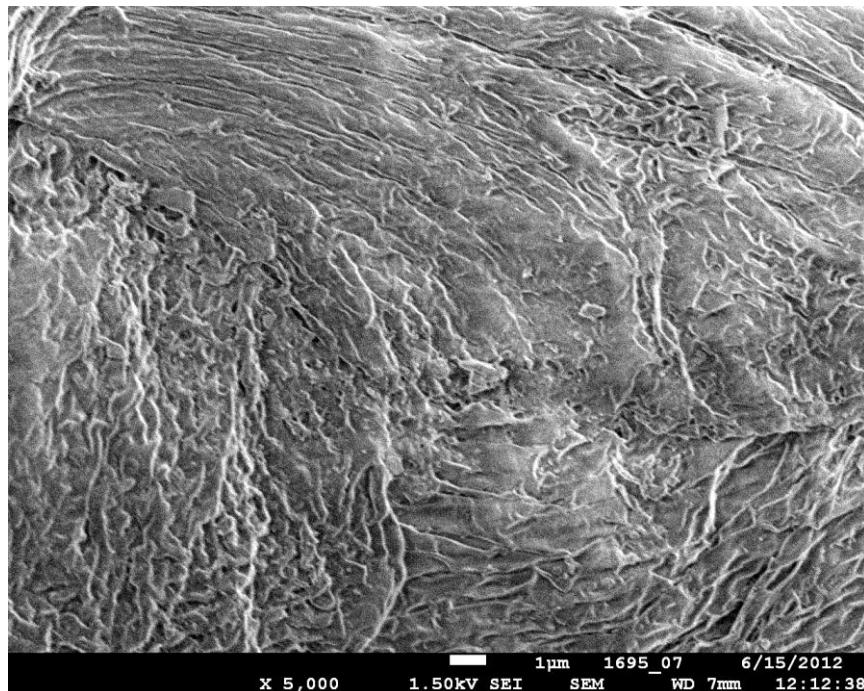
Slika 21: Na zraku sušeni mikrodelci; alginat 40G 2,0 %; šoba 250 µm, velikost ~465 µm.



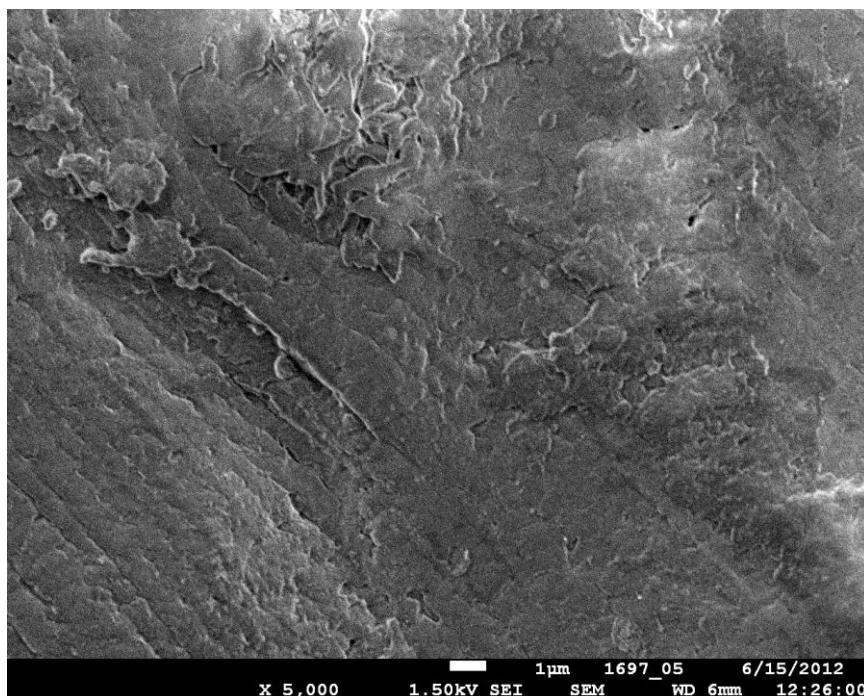
Slika 22: Liofilizirani mikrodelci; alginat 70G 2,0 %; šoba 250 µm; velikost ~500 µm.

4.1.4 SEM mikrodelcev

Mikrodelce smo liofilizirali ali posušili na zraku. Na sliki 23 vidimo površino liofiliziranega MD, slika 24 pa prikazuje površino MD, sušenega na zraku.



Slika 23: Površina liofiliziranega MD (alginat 40G, 0,1 M CaCl₂, šoba 250 μm) pod SEM mikroskopom; 5000x povečava.

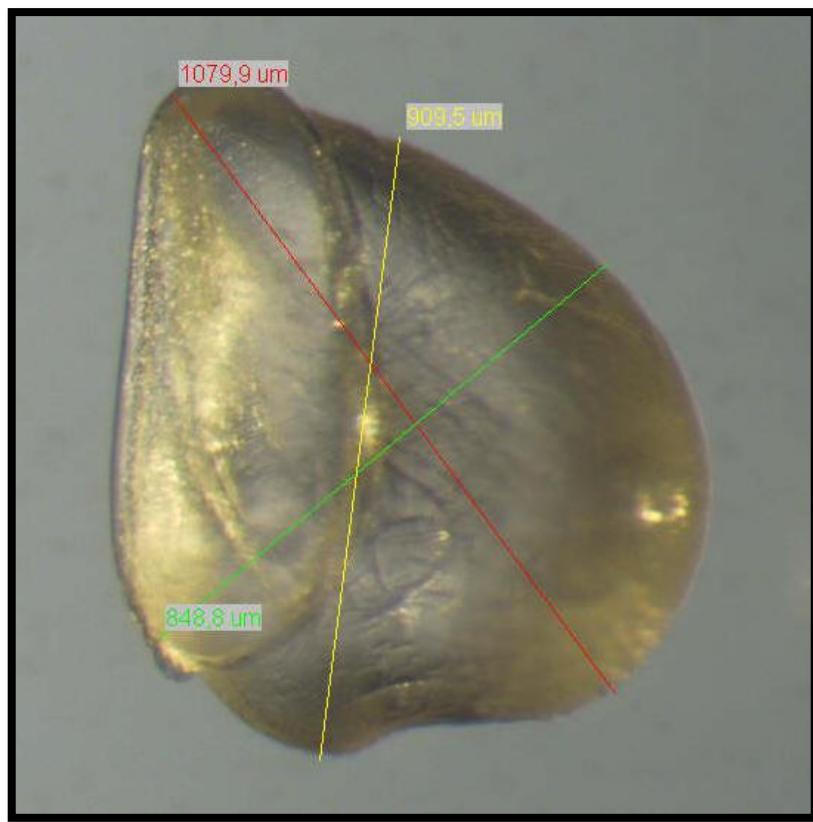


Slika 24: Površina MD, sušenega na zraku (alginat 40G, 0,1 M CaCl₂, šoba 250 μm), pod SEM mikroskopom; 5000x povečava.

Površina liofliziranih MD je groba in luknjičasta. Takšno strukturo imajo verjetno zaradi hitre sublimacije zamrznjene vode iz alginatnega ogrodja in nastanka por. Površina MD, sušenih na zraku, je precej bolj gladka in ni opaznih poroznih struktur. Voda počasi izpareva iz alginatnega ogrodja, zato se MD krčijo počasi, pri tem pa ostane gladka površina, podobna svežim MD. Opažanja potrjujejo tudi literurni podatki (20).

4.1.5 Merjenje velikosti alginatnih mikodelcev pod optičnim mikroskopom

Velikost alginatnih mikodelcev smo izmerili pod stereomikroskopom s pomočjo programske opreme. V preglednicah 15-17 so predstavljene povprečne velikosti MD (μm). Velikost smo izmerili svežim MD takoj po nučiranju, ter po sušenju na zraku in po sušenju z liofilizacijo. Kjer vrednost ni zapisana, teh delcev ni bilo smiselno meritи zaradi neustrezne oblike MD. Slika 25 predstavlja način meritve velikosti mikodelcev pod mikroskopom.



Slika 25: Primer meritve velikosti na zraku sušenega MD; alginat 70G 2,5 %; šoba 500 μm .

Preglednica 15: Velikosti alginatnih mikrodelcev (μm) izdelanih s 150 μm šobo.

MOKRI					
šoba= 150 μm	alginat:	70G 2,00 %	70G 2,50 %	40G 2,00 %	40G 2,50 %
c(CaCl ₂)=					
	0,5 M	563	531	424	324
	0,2 M	494	591	307	407
	0,1 M	586	542	409	512
	0,05 M	442	385	268	380
ZRAK					
šoba= 150 μm	alginat:	70G 2,00 %	70G 2,50 %	40G 2,00 %	40G 2,50 %
c(CaCl ₂)=					
	0,5 M	/	/	/	/
	0,2 M	/	/	/	/
	0,1 M	/	/	/	/
	0,05 M	/	/	/	/
LIOFILIZIRANI					
šoba= 150 μm	alginat:	70G 2,00 %	70G 2,50 %	40G 2,00 %	40G 2,50 %
c(CaCl ₂)=					
	0,5 M	341	558	343	482
	0,2 M	/	475	446	396
	0,1 M	244	/	409	584
	0,05 M	/	599	509	502

Preglednica 16: Velikosti alginatnih mikrodelcev (μm) izdelanih s $250 \mu\text{m}$ šobo.

MOKRI					
šoba= $250 \mu\text{m}$	alginat:	70G 2,00 %	70G 2,50 %	40G 2,00 %	40G 2,50 %
c(CaCl ₂)=					
	0,5 M	708	823	827	466
	0,2 M	836	728	785	567
	0,1 M	621	623	762	288
	0,05 M	768	954	486	354
ZRAK					
šoba= $250 \mu\text{m}$	alginat:	70G 2,00 %	70G 2,50 %	40G 2,00 %	40G 2,50 %
c(CaCl ₂)=					
	0,5 M	/	/	464	502
	0,2 M	/	493	/	/
	0,1 M	/	/	/	/
	0,05 M	/	/	/	/
LIOFILIZIRANI					
šoba= $250 \mu\text{m}$	alginat:	70G 2,00 %	70G 2,50 %	40G 2,00 %	40G 2,50 %
c(CaCl ₂)=					
	0,5 M	415	619	630	814
	0,2 M	495	596	591	667
	0,1 M	515	/	758	679
	0,05 M	/	606	721	656

Preglednica 17: Velikosti alginatnih mikrodelcev (μm) izdelanih s 500 μm šobo.

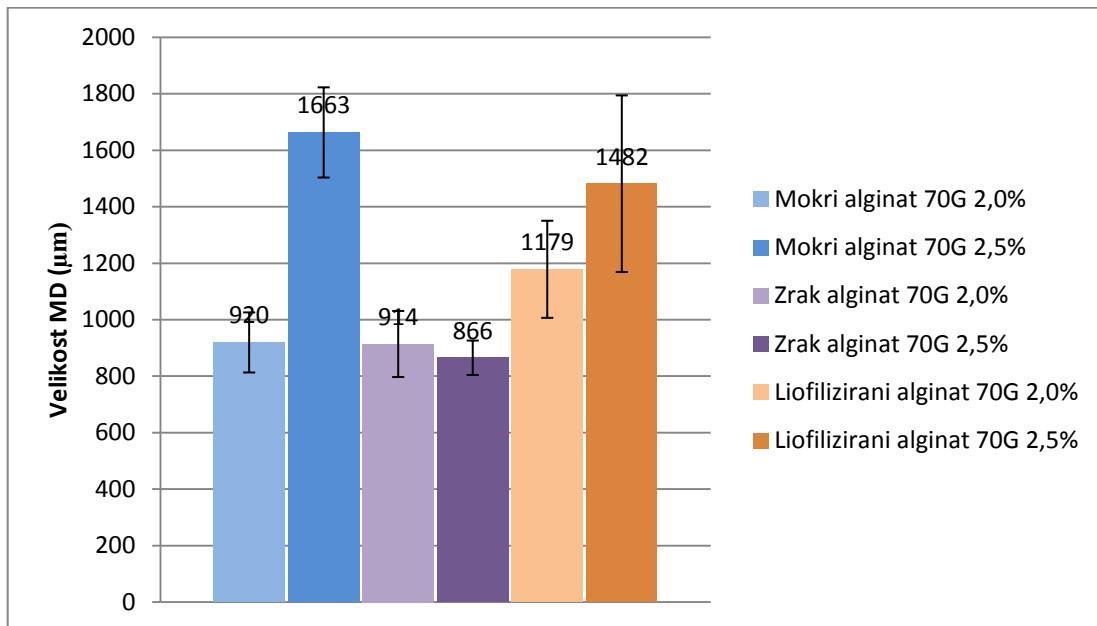
MOKRI					
šoba= 500 μm	alginat:	70G 2,00 %	70G 2,50 %	40G 2,00 %	40G 2,50 %
	c(CaCl ₂)=				
	0,5 M	866	1805	973	1290
	0,2 M	1017	1476	1022	1514
	0,1 M	796	1584	757	1464
	0,05 M	999	1786	1070	1773
<hr/>					
ZRAK					
šoba= 500 μm	alginat:	70G 2,00 %	70G 2,50 %	40G 2,00 %	40G 2,50 %
	c(CaCl ₂)=				
	0,5 M	/	866	764	987
	0,2 M	997	804	713	919
	0,1 M	831	926	708	743
	0,05 M	/	/	651	849
<hr/>					
LIOFILIZIRANI					
šoba= 500 μm	alginat:	70G 2,00 %	70G 2,50 %	40G 2,00 %	40G 2,50 %
	c(CaCl ₂)=				
	0,5 M	1326	1194	842	1118
	0,2 M	950	1233	1006	1306
	0,1 M	1143	1799	974	686
	0,05 M	1294	1699	1089	1322

Iz preglednic 15-17 je razvidno, da koncentracija CaCl₂ v premreževalnem mediju nima vpliva na velikost delcev. Na velikost MD najbolj vplivata velikost šobe in koncentracija alginata v raztopini. Večja ko je šoba, večji mikrodelci nastanejo (21). Bolj koncentriran alginat pa vpliva na večjo velikost nastalih MD (22).

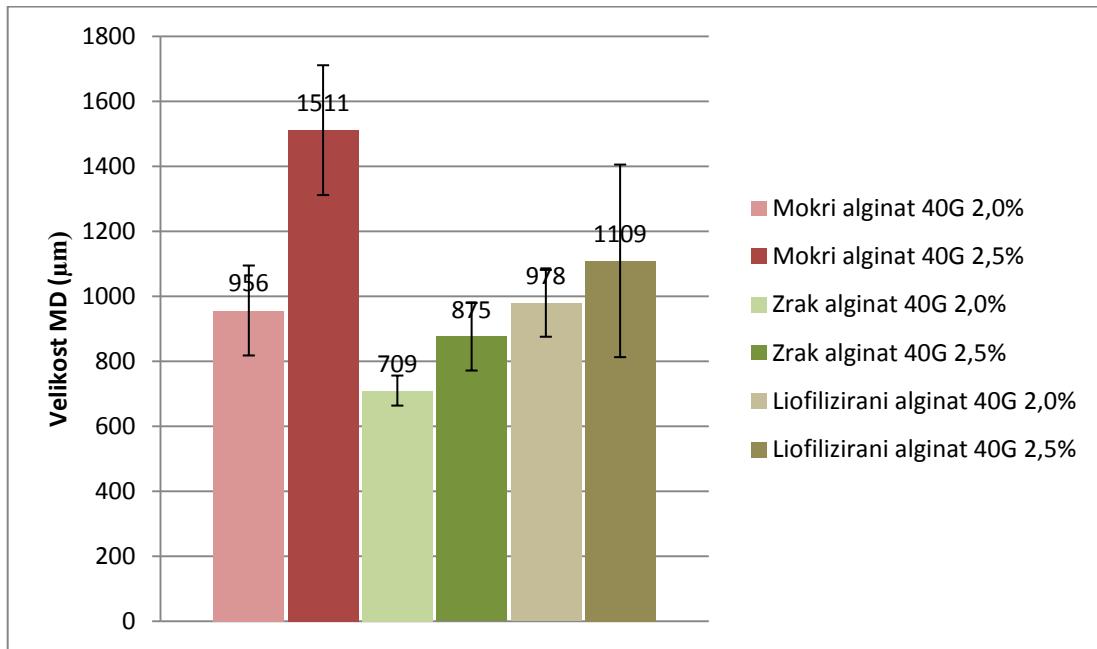
Sušenje mikrodelcev ima znaten vpliv na velikost MD. Sušenje na zraku mnogo bolj prispeva k zmanjšanju velikosti MD, medtem ko sušenje z liofilizacijo manj. Na zraku sušeni MD so precej manj porozni, kar se vidi na njihovih slikah pod SEM mikroskopom (glej sliko 24). Ker se sušijo navadno pri sobni temperaturi, voda počasi in enakomerno izhlapeva iz celotnega ogrodja MD, zato se polimerno ogrodje krči počasi. Pri liofilizaciji se velikost mikrodelcev manj spreminja. Mikrodelce po izdelavi zamrznemo v tekočem dušiku in voda, ujeta v ogrodje oz. led, med liofilizacijo sublimira (brez prehodne tekoče faze). Pri tem v ogrodju MD ostanejo večje pore, zunanjega struktura MD pa se ne spremeni. Takšni delci so zato precej bolj porozni in večji kot MD sušeni na zraku. Razlika v

poroznosti je dobro vidna, če primerjamo slike 23 in 24. Iz preglednic 15-17 razberemo tudi, da sušenje na zraku redko daje MD primerne za nadaljnjo uporabo (20).

Vpliv sušenja na velikost delcev je prikazano na grafih 9 in 10. Na zraku sušeni mikrodelci so manjši od sušenih z liofilizacijo. Liofilizirani so primerljivi s svežimi mikrodelci. Opazna je razlika med 2,0 % in 2,5 % raztopino alginata. Iz bolj koncentrirane raztopine nastanejo večji delci skoraj v vseh primerih. V literaturi lahko najdemo podatke, ki potrjujejo naše ugotovitve (20, 21, 22).



Graf 9: Povprečna velikost alginatnih MD (μm) izdelanih s 500 μm šobo – alginat 70G.



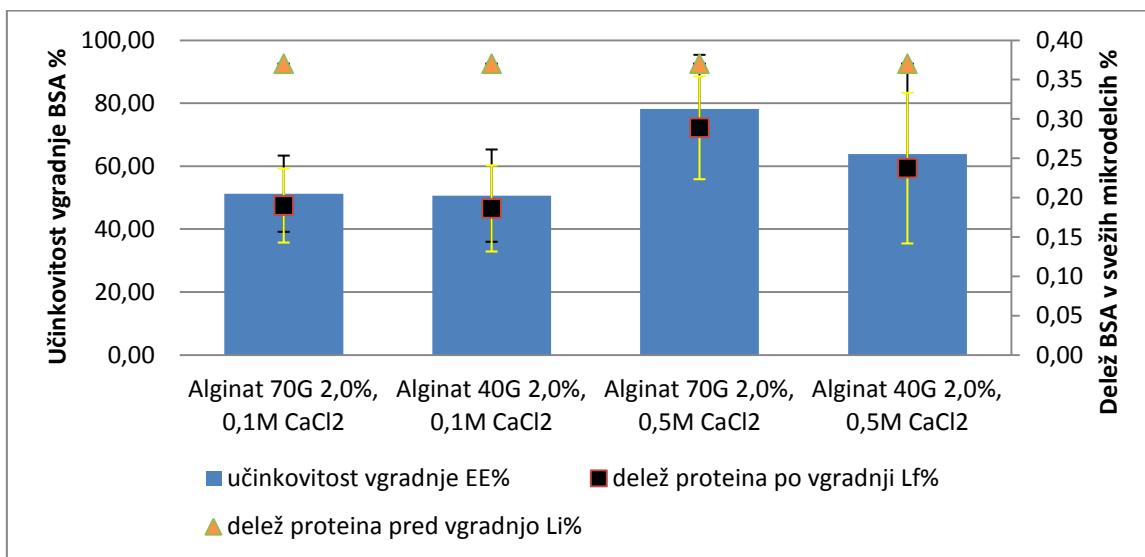
Graf 10: Povprečna velikost alginatnih MD (μm) izdelanih s 500 μm šobo – alginat 40G.

4.2 VGRADNJA IN SPROŠČANJE GOVEJEGA SERUMSKEGA ALBUMINA (BSA) IZ ALGINATNIH MIKRODELCEV

Na podlagi predhodnih poskusov izdelave MD smo za vrednotenje sproščanja izbrali postopek priprave MD s šobo velikosti 250 µm. Uporabili smo oba alginata v koncentraciji 2,0 %. Kot premreževalce smo uporabili CaCl₂ v koncentraciji 0,1 M in 0,5 M, da smo primerjali vpliv stopnje premreženja na sproščanje proteina iz ogrodja MD.

4.2.1 Vgradnja BSA v mikrodelce

Začetna koncentracija BSA v raztopini alginata je bila 20 % (m(BSA)/m(alginat)). Pri izdelavi MD pride do precejšnjih izgub BSA, saj se del alginata in proteina porazdeli v raztopini premreževalca, zato je končna vgradnja proteina pričakovano nižja. Graf 11 predstavlja izračunane deleže proteina na začetku in koncu vgradnje v MD, ter učinkovitost vgradnje (EE) proteina v MD (določanje – glej poglavje 3.3.9).

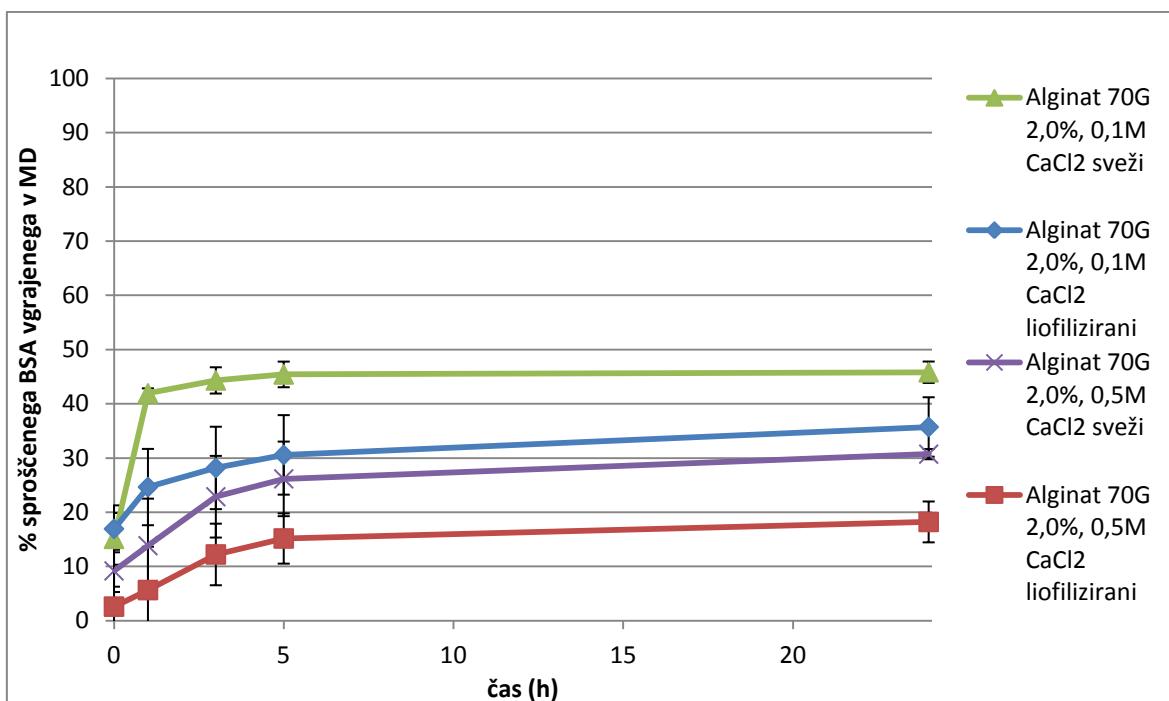


Graf 11: Delež in učinkovitost vgradnje BSA v mikrodelce (št. vzorcev= 4).

Če primerjamo delež vgrajenega BSA (graf 11) med obema koncentracijama premreževalca, opazimo, da se pri 0,5 M koncentraciji v MD vgradi več proteina, saj je premreženje ogrodja MD močnejše in protein težje zapusti ogrodje MD. Vidimo tudi, da je učinkovitost vgradnje pri nizki koncentraciji premreževalca CaCl₂ neodvisna od uporabljenega alginata, saj je bila EE% pri obeh alginatih 40G in 70G okrog 50 %. Pri višji koncentraciji premreževalca pa je opazna razlika med alginatoma 70G in 40G, saj alginat 70G zadrži v MD okrog 15 % več BSA kot alginat 40G.

4.2.2 Sproščanje BSA iz alginatnih mikrodelcev v 10x PBS pufru

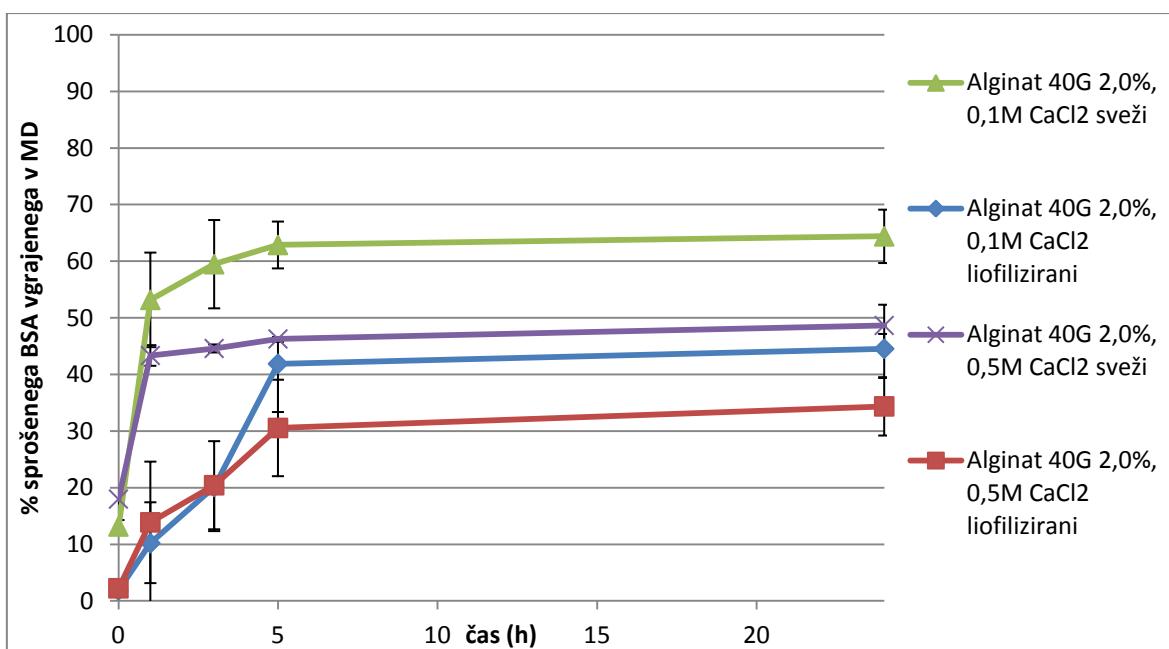
Na grafih 12 in 13 so predstavljeni rezultati sproščanja BSA iz mikrodelcev iz obeh alginatov v 10x PBS pufru s pH 7,4. Predvidevali smo, da se bodo v 10x PBS delci v večji meri razpustili zaradi visoke ionske moči pufra in tako sprostili večino vgrajenega BSA. Ugotavljali smo, kako stopnja premreženja in liofilizacija vplivata na delež sproščenega proteina v 10x PBS.



Graf 12: Sproščanje BSA iz alginatnih 70G MD v 10x PBS pufru.

Iz svežih mikrodelcev (graf 12) se v obeh primerih sprosti večji delež vgrajenega BSA kot iz liofiliziranih mikrodelcev. Pri svežih MD sta ogrodje in protein že hidratirana, zato se protein lažje sprosti v medij. Pri liofiliziranih MD pa se hidratirani sloj med procesom liofilizacije odstrani zato je možno, da se potem vzpostavijo drugačne interakcije med proteinom in strukturo polimera. Lahko, da se protein trdneje veže v strukturo MD ali celo spremeni (denaturira). Razlika pri MD pripravljenih v 0,5 M in 0,1 M CaCl₂ premreževalca je opazna v količini sproščenega BSA tako pri svežih, kot liofiliziranih MD. Bolj premreženi MD (0,5 M CaCl₂) so sprostili manj proteina, kot manj premreženi MD (0,1 M CaCl₂). To je najverjetnejše posledica večje premreženosti alginata 70G, ki v svojem ogrodju zadrži več BSA.

Graf 13 prikazuje krivulje sproščanja BSA iz mikrodelcev, ki so bili izdelani iz alginata 40G. Ta vsebuje manj guluronske kisline, ki je ključna pri zamreženju s Ca^{2+} ioni, zato pričakujemo, da bo celokupna količina sproščenega BSA iz mikrodelcev večja, ker je ogrodje MD šibkejše. Po pričakovanjih se je iz MD pri tem alginatu 40G sprostilo več proteina kot pri alginatu 70G. Ponovno se je iz MD iz bolj premreženega alginata 40G v 0,5 M CaCl_2 sprostilo manj BSA kot iz manj premreženega v 0,1 M CaCl_2 tako pri svežih kot pri liofiliziranih MD. Iz liofiliziranih MD sprostilo manj proteina v primerjavi s svežimi MD v obeh primerih.

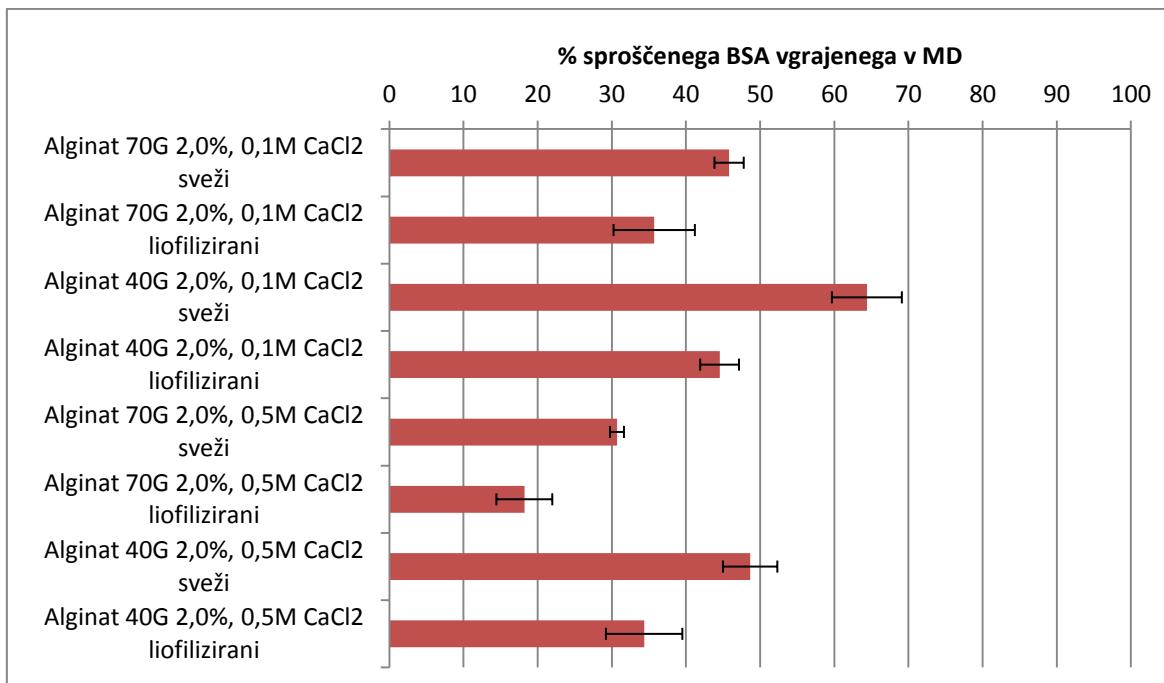


Graf 13: Sproščanje BSA iz alginatnih 40G MD v 10x PBS pufru.

Slika 26 prikazuje vzorca MD po 24 urnem sproščanju v 10x PBS. Vzorec 38 predstavlja MD iz alginata 70G premrežene v 0,1 M CaCl_2 in vzorec 40 predstavlja MD iz alginata 70G premrežene v 0,5 M CaCl_2 . Pri obeh vzorcih se vidi meja med usedlino in supernatantom. To kaže na to, da se alginatni MD ne razpustijo v celoti v 10x PBS. Če primerjamo vzorca med sabo, se pri bolj premreženih MD fazi ostreje ločita, prav tako je usedline bistveno več, kot pri manj premreženih MD. Najverjetneje je to posledica večjega razpada MD, ki so bili manj premreženi. Pri vzorcu 38 alginat prehaja v supernatant, zato je ta bolj moten. Pri vzorcu 40 je razpad MD manjši. MD se posedejo na dno viale in so v glavnem ločeni od skoraj bistrega supernatanta.



Slika 26: Viali vzorcev 38 (0,1 M CaCl₂) in 40 (0,5 M CaCl₂) MD po 24 h sproščanja v 10x PBS pufru.



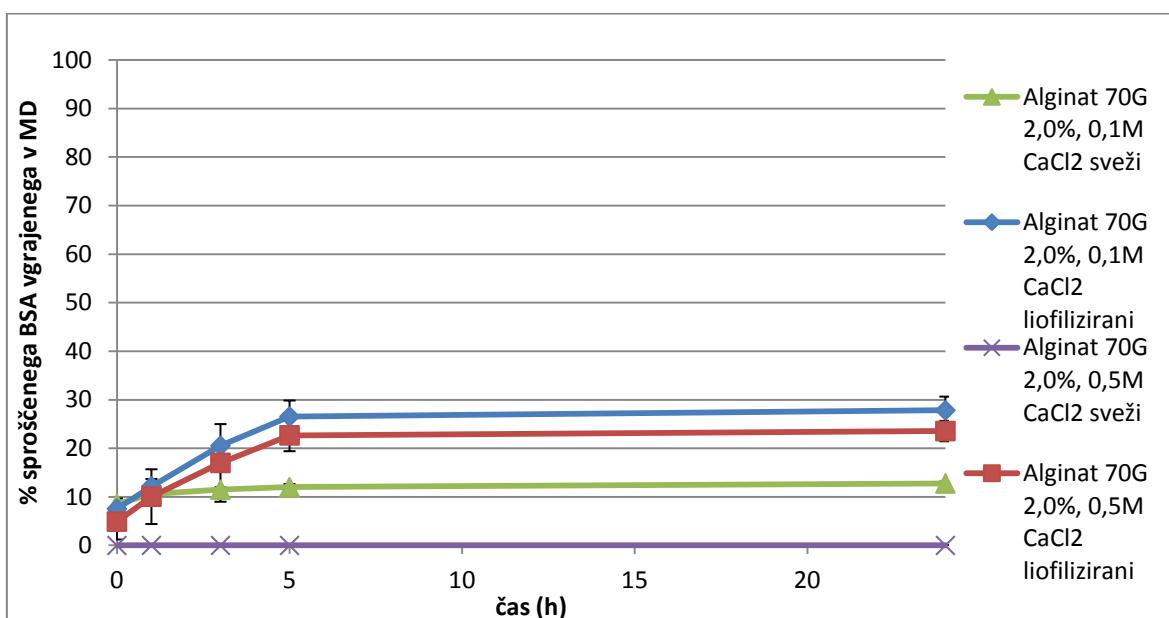
Graf 14: Količina sproščenega BSA po 24 h iz vseh vzorcev v 10x PBS pufru.

Na grafu 14 lahko povzamemo ugotovitve in primerjamo razlike v sproščanju BSA iz MD, moči pripravljenih iz obeh alginatov v pufru visoke ionske. Ugotovili smo, da sveži MD sprostijo več proteina kot liofilizirani pri obeh vrstah alginata. Podobno je pri premreženju alginata s Ca²⁺; pri nižjih koncentracijah oz. pri manjšem premreženju se sprosti več proteina kot pri višjih koncentracijah Ca²⁺ v premreževalni raztopini. Če primerjamo količino sproščenega BSA iz primerljivih MD iz alginata 40G in 70G (graf 14) ugotovimo, da se v vseh primerih sprosti iz alginata 40G več proteina kot iz alginata 70G. Najverjetneje je to posledica dejstva, da alginat 40G tvori manj interakcij s Ca²⁺ ioni, zato

je ogrodje bolj podvrženo eroziji in posledično se iz njega sprosti več proteina. Obratno, alginat 70G tvori čvrstejšo strukturo, ki bolj močno zadrži BSA v ogrodju, zato se iz MD sprosti manj proteina.

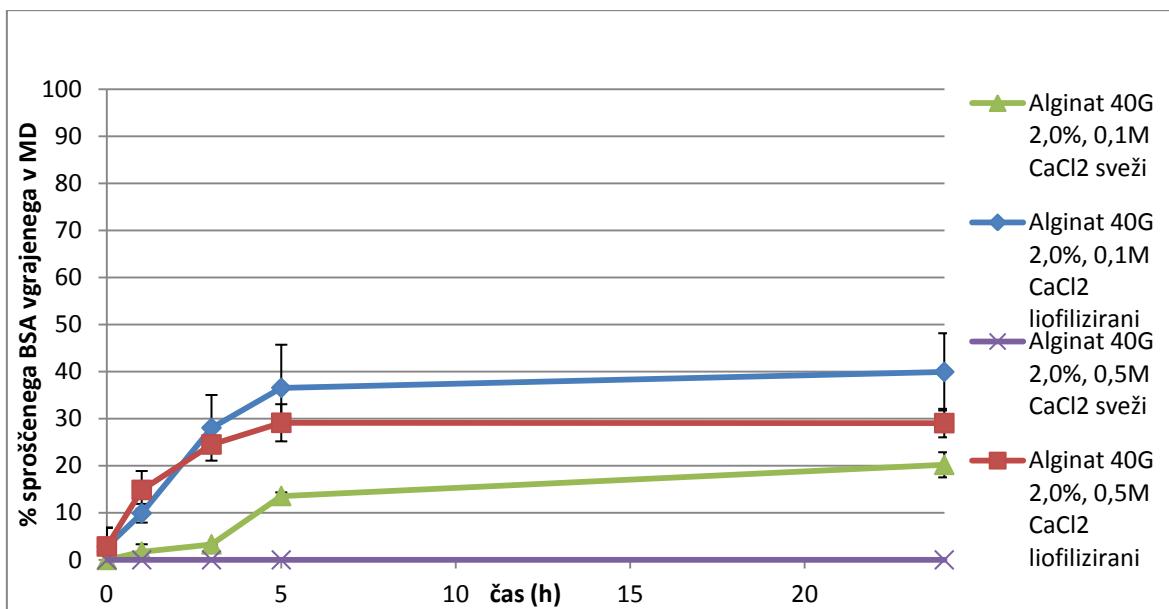
4.2.3 Sproščanje BSA iz alginatnih mikrodelcev v 1x PBS pufru

S sproščanjem BSA iz alginatnih MD v 1x PBS pufru s pH 7,4 smo simulirali fiziološke pogoje. Ponovno smo vrednotili vpliv premreženosti alginatnega ogrodja na sproščanje BSA in vpliv liofilizacije na sproščanje v primerjavi s sveže pripravljenimi mikrodelci.



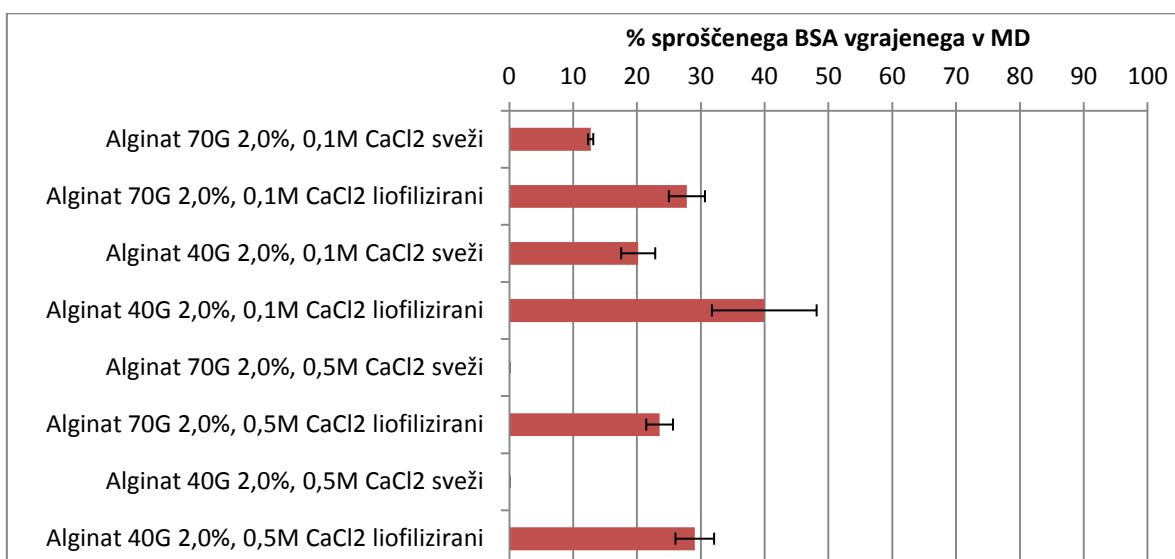
Graf 15: Sproščanje BSA iz alginatnih 70G MD v 1x PBS pufru.

Iz grafa 15 lahko razberemo, da je delež sproščenega BSA iz mikrodelcev precej manjši v primerjavi s sproščanjem v 10x PBS pufru. Mikrodelci, pripravljeni v 0,1 M CaCl₂ so sprostili okoli 13 % BSA oziroma 28 % BSA, če so bili liofilizirani. Sveži mikrodelci, ki smo jih utrjevali v 0,5 M CaCl₂, niso sprostili nič BSA, medtem ko je liofilizat sprostil 24 % BSA. V 1x PBS liofilizirani MD sprostijo več BSA kot sveži MD, medtem ko je v 10x PBS ravno obratno. Najverjetneje gre za drugačen mehanizem sproščanja oz. razpad MD. Rezultati tudi kažejo, da večja premreženost ogrodja povzroči, da se protein zadrži v mikrodelcu, razen če s sušenjem tvorimo dovolj porozno strukturo, ki omogoči proteinu, da se sprosti. Iz liofiliziranih mikrodelcev se sprosti več proteina zaradi večje poroznosti mikrodelcev. Sveži so precej manj porozni, zato se protein težje sprosti iz ogrodja.



Graf 16: Sproščanje BSA iz alginatnih 40G MD v 1x PBS pufru.

Podobne ugotovitve lahko razberemo na grafu 16, ki prikazuje sproščanje BSA iz MD, pripravljenih iz alginata 40G. BSA se ne sprosti iz svežih MD, ki smo jih gelirali v 0,5 M CaCl₂. V primeru istih vendar liofiliziranih MD pa se je sprostilo 29 % proteina. Za vzorca MD, ki smo jih utrjevali v 0,1 M CaCl₂, je spet značilno, da se je iz liofiliziranih MD sprostilo skoraj dvakrat več proteina kot iz svežih. Slednje je verjetno posledica večje poroznosti ogrodja liofiliziranih MD. Torej razlike v sproščanju med sveže pripravljenimi in liofiliziranimi MD so bolj opazne pri MD, ki smo jih gelirali pri višji koncentraciji CaCl₂.

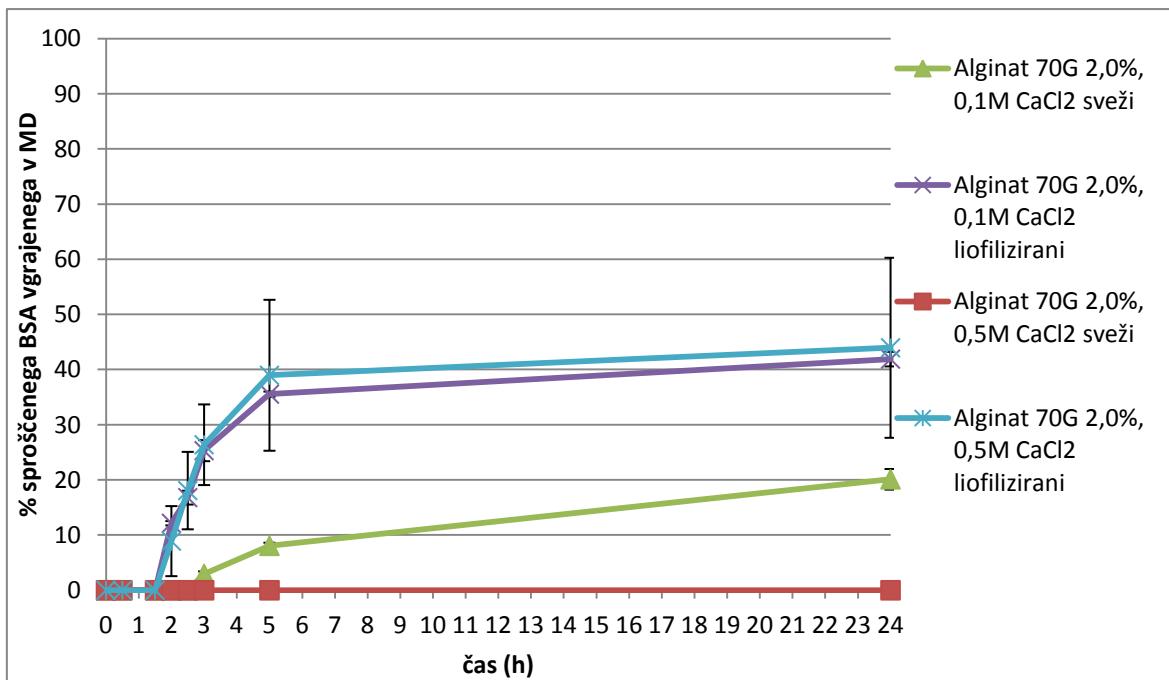


Graf 17: Količina sproščenega BSA po 24h iz vseh vzorcev v 1x PBS pufru.

Količine sproščenega BSA v 1x PBS (graf 17) so bistveno manjše od tistih v 10x PBS (graf 14). Torej višja ionska moč pripomore k sproščanju BSA iz ogrodja mikrodelcev (15). Ker alginatni gel nastane preko elektrostatskih interakcij, pride pri višji ionski moči do senčenja nabojev na nabitih skupinah polimera, ki so potrebni za interakcije med alginatom in Ca^{2+} . Brez teh interakcij pa pride do razpada oz. erozije ogrodja MD in protein se lažje sprosti. V 1x PBS je ta efekt manj izrazit, pride do manjše erozije ogrodja, zato so tudi koncentracije sproščenega BSA iz MD manjše. Razlika med alginatoma 40G in 70G je prav tako razvidna, saj se pri vseh primerljivih formulacijah MD sprosti več proteina iz alginata 40G. Izjema so sveži mikrodelci utrjeni v 0,5 M CaCl_2 , kjer se pri obeh alginatih ni sprostilo skoraj nič proteina.

4.2.4 Sproščanje BSA iz alginatnih mikrodelcev v mediju s spremembo pH (pH 3,0 → pH 7,0)

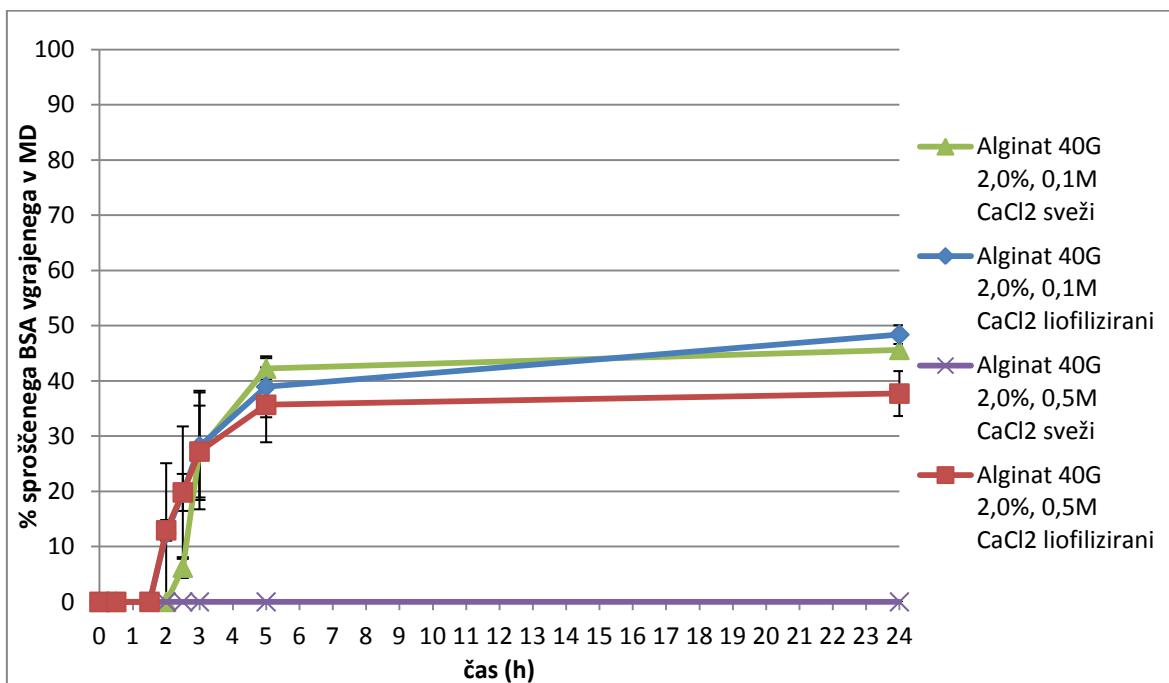
Da bi preverili sproščanje proteina pri simuliranih pH pogojih prebavnega trakta, smo MD 2 h inkubirali v mediju s pH 3 in nato pH zvišali na 7 in nadaljevali s sproščanjem.



Graf 18: Sproščanje BSA iz MD iz alginata 70G v mediju s pH 3,0 do pH 7,0.

Graf 18 prikazuje, da liofilizirani MD v primerjavi s svežimi MD iz alginata 70G hitreje in v večjem obsegu sprostijo BSA. V mediju s pH 3,0 se ni sprostilo nič proteina iz ogrodja MD, kar pomeni, da ogrodje iz alginata 70G dobro zadrži sproščanje proteina v kislih pogojih (pH 3,0). Po dvigu pH na 7,0 se je iz obeh serij liofiliziranih mikrodelcev hitro

začel sproščati protein. Ker je pKa β -d manuronske in α -l-guluronske kisline 3.38 in 3.65, je alginat pri pH 3,0 v neprotonirani in netopni obliki (alгинска kislina), zato se protein iz MD ne sprosti. Po dodatku 1x PBS in uravnanju pH na 7,0 se alginat pretvori v ionizirano in bolj topno obliko, ki lažje sprosti protein. Podobno od pH odvisno sproščanje so dobili tudi v literaturi (23). Sproščanje iz svežih MD je bilo slabo, še posebej iz bolj premreženih MD.



Graf 19: Sproščanje BSA iz MD iz alginata 40G v mediju s pH 3,0 do pH 7,0.

Sproščanje iz manj premreženega alginata 40G (graf 19) je potekalo podobno, kot pri MD iz alginata 70G (graf 18), torej brez sproščanja v mediju s pH 3,0 in z nadaljnjam hitrim sproščanjem po dvigu pH. Nekolika je razlika v času začetka sproščanja BSA. Iz liofiliziranih MD se je protein začel sproščati takoj po dvigu pH, medtem ko se je sproščanje iz svežih MD začelo z zamikom pol ure. Končna količina sproščenega proteina je približno ista. V kislih pogojih so mikrodelci uspešno zadržali protein v ogrodju. Iz svežih mikrodelcev utrjenih v 0,5 M CaCl₂ se ni sprostilo nič proteina, najverjetneje zaradi prevelike premreženosti ogrodja. Iz enakih, le liofiliziranih mikrodelcev, pa se je sprostilo okoli 40 % vgrajenega proteina, najverjetneje zaradi večje poroznosti liofiliziranih mikrodelcev.

4.2.5 Izdelava in analiza izbrane formulacije alginatnih mikrodelcev (velikost MD, sproščanje BSA, gelska elektroforeza, dodatek pospeševalcev sproščanja)

Iz vseh zbranih podatkov smo izbrali sestavo MD iz 2,0 % alginata 40G in 0,1 M CaCl₂. Ti MD so bili ustrezeno majhnih velikosti in so sprostili največ BSA. MD smo pripravili še enkrat jih izmerili, slikali in nato sproščali (sveže, liofilizirane ter na zraku sušene MD) v mediju s spremembo pH. Integriteto proteina smo preverili z elektroforezo. Na koncu smo v formulacijo vključili še pospeševalca sproščanja in ugotavliali njun prispevek k sproščanju proteina.

4.2.5.1 Velikost mikrodelcev

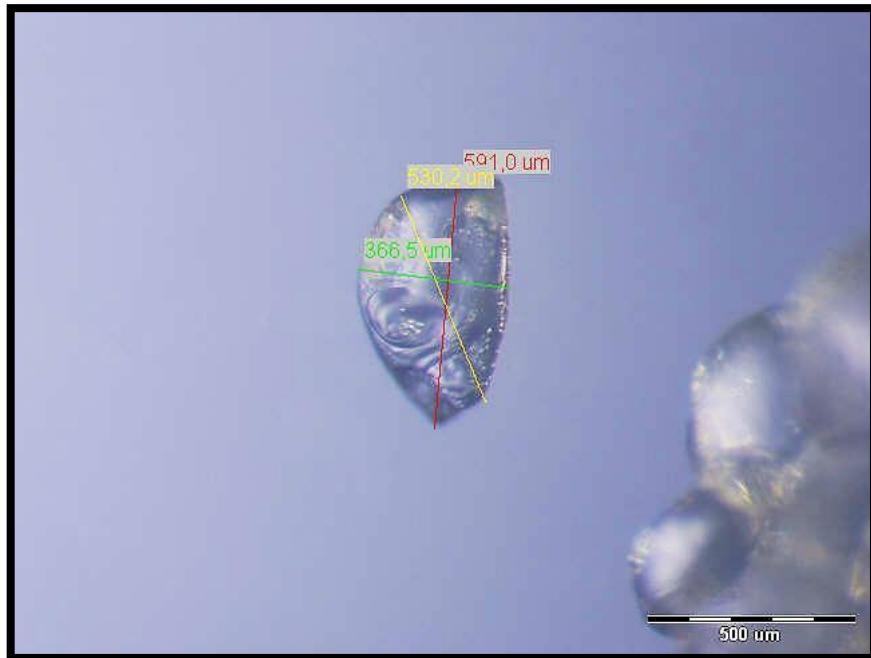
Vzorce MD smo slikali in izmerili velikost pod mikroskopom s pomočjo programskega paketa.

Preglednica 18: Povprečne velikosti MD; vzorci 58-63.

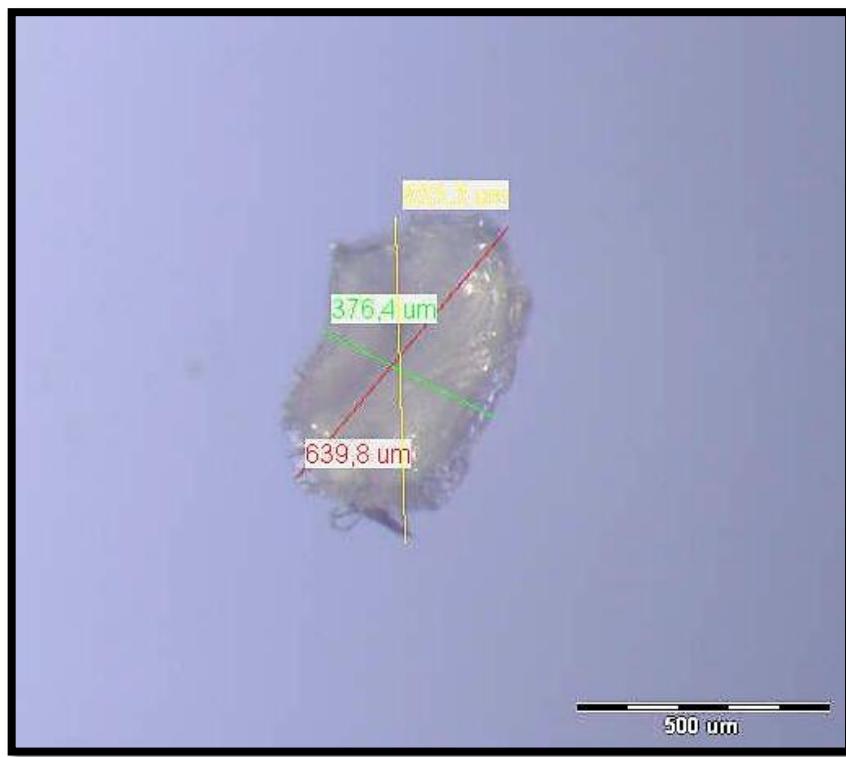
Št. vzorca	Mokri MD	Na zraku sušeni MD	Liofilizirani MD
58	445 µm		
59	577 µm		
60	571 µm		720 µm
61	644 µm		600 µm
62	646 µm	465 µm	
63	632 µm	347 µm	

Iz preglednice 18 je razvidno, da so vsi vzorci po velikosti manjši od 1000 µm.

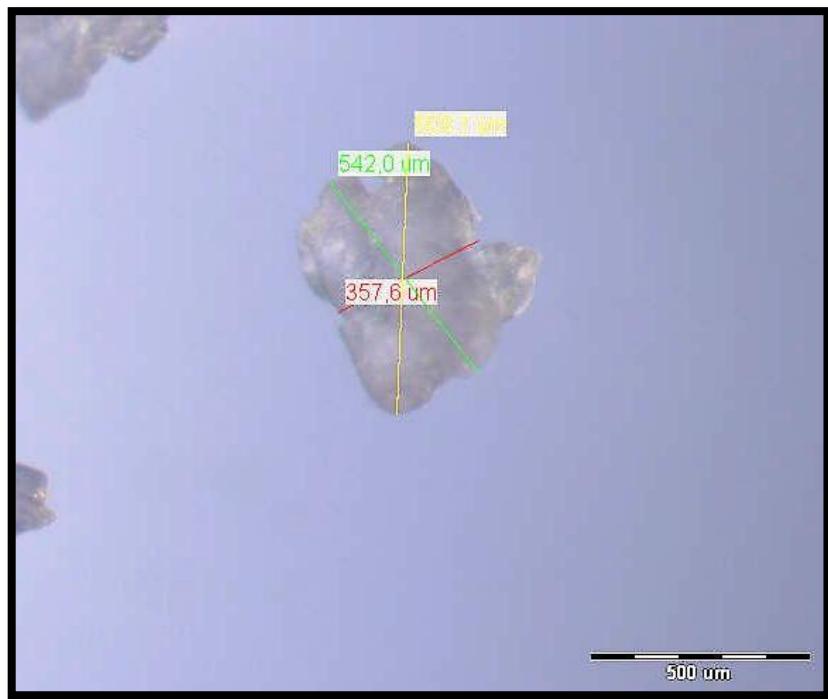
Slike 27-29 prikazujejo sveže MD, liofilizirane MD in MD sušene na zraku. Sveži MD (slika 27) imajo precej bolj gladko površino v primerjavi z liofiliziranimi (slika 28) in MD sušenimi na zraku (slika 29). Če primerjamo MD sušene na zraku in liofilizirane MD, je opazna razlika v morfologiji. MD sušeni na zraku imajo bolj zalito in gladko površino ter robove, liofilizirani MD pa imajo bolj opazne porozne strukture na površini in nedefinirane robove.



Slika 27: Sveži mikrodelci; vzorec 63.

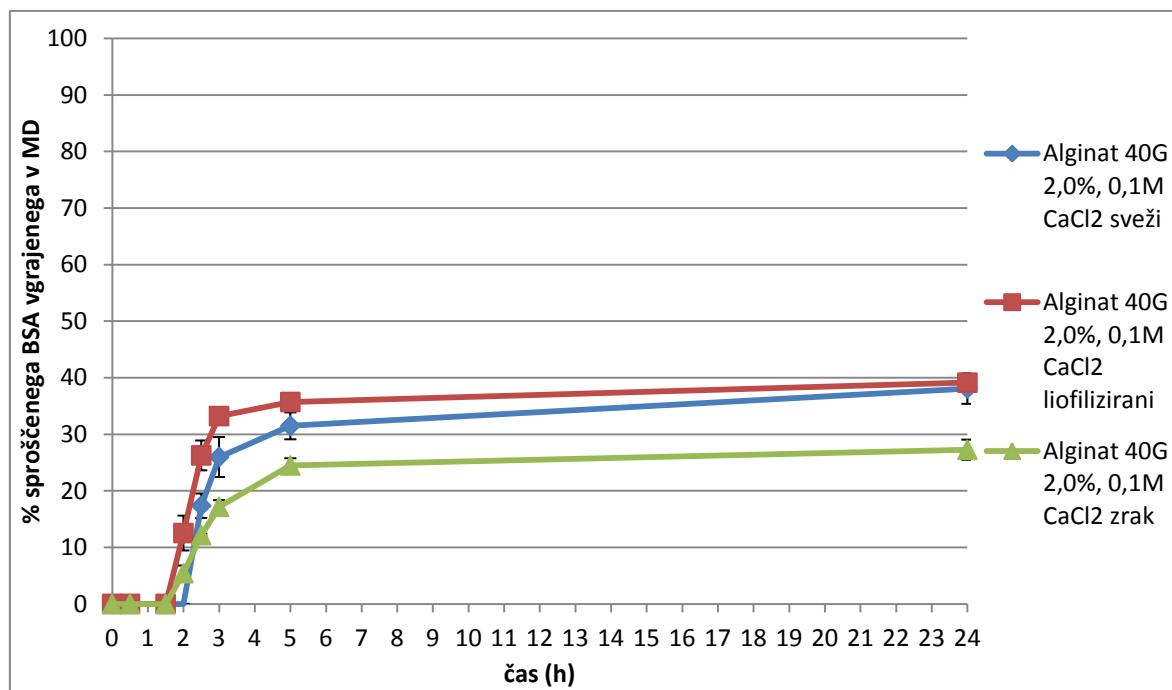


Slika 28: Liofilizirani mikrodelci; vzorec 60.



Slika 29: Mikrodelci sušeni na zraku; vzorec 62.

4.2.5.2 Sproščanje BSA iz alginatnih mikrodelcev v mediju s spremembo pH (pH 3,0 → pH 7,0)



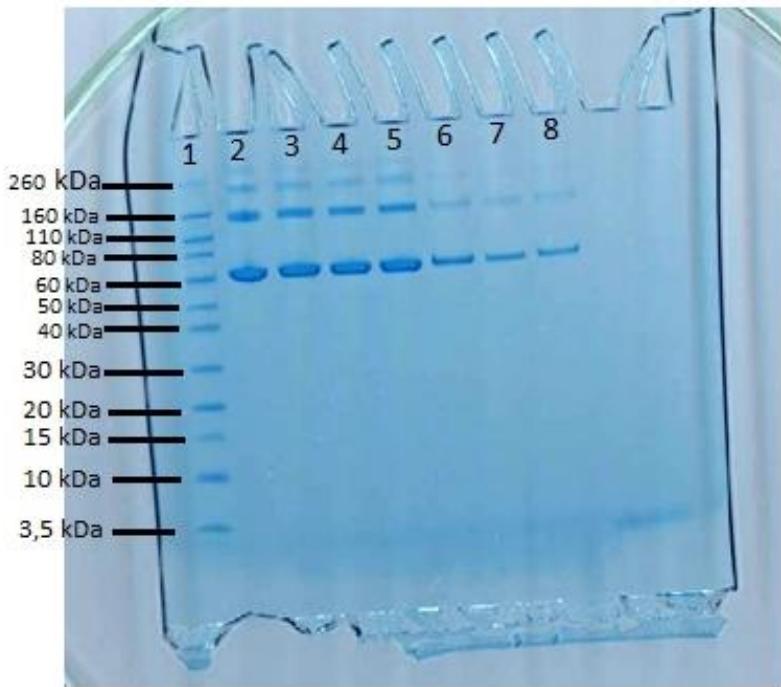
Graf 20: Sproščanje BSA iz MD v mediju s pH 3,0 do pH 7,0.

Na grafu 20 vidimo, da se je največ proteina sprostilo iz svežih in liofiliziranih mikrodelcev s primerljivo količino sproščenega proteina okoli 40 %. Nekoliko zakasnjeno sproščanje je opaziti pri svežih MD. Iz MD sušenih na zraku se je po 24 h sprostilo 30 % proteina. Po pričakovanjih so vsi trije vzorci MD zadržali sproščanje BSA v mediju s pH 3,0, saj je topnost alginata pri pH<4 omejena. Alginatno ogrodje se zato ne razpusti. Rezultati kažejo, da bi ti MD lahko uspešno zadržali protein pred sproščanjem v kislem mediju (želodcu).

4.2.5.3 NaDS-PAGE elektroforeza

Ker je znano, da lahko struktura proteinov denaturira v pogojih kot je nizek pH in visoka ionska moč, smo z namenom, da preverimo ali je prišlo med procesom izdelave in sproščanjem do fragmentacije proteina, izvedli NaDS poliakrilamidno elektroforezo na naslednjih vzorcih:

- V prva dva žepka smo nanesli standard velikosti proteinov in standardno raztopino BSA (250 µg BSA).
- V žepke 3-5 smo nanesli vzorce raztopin CaCl₂ (~5 µg BSA).
- V žepke 6-8 smo nanesli vzorce raztopin po končanem 24 h sproščanju (~1,5 µg BSA).

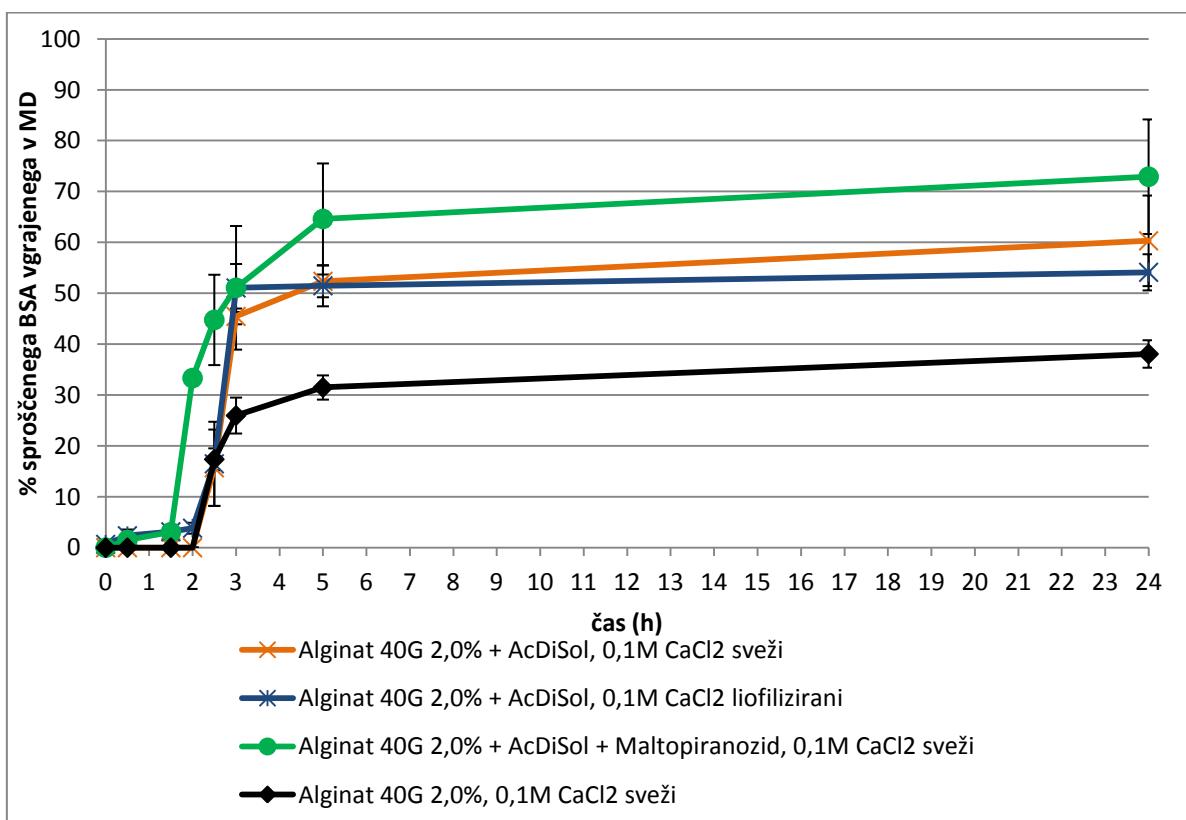


Slika 30: NaDS - PAGE gel po nanosu vzorcev z BSA.

Iz slike 30 je razvidno, da so vsi vzorci glede na lego in število lis primerljivi s standardom in sicer so lise pri MM okrog 60 kDa, 160 kDa in pri 260 kDa. Razlike so v stopnji obarvanosti lis. Vzorci, kjer je bilo količinsko več proteina, so bolj obarvani. Pri vseh vzorcih na podlagi lege in števila lis lahko sklepamo, da protein ni bil podvržen razgradnji v procesu izdelave mikrodelcev in procesu sproščanja v mediju s spremembbo pH (pH 3,0 → pH 7,0). Ugotovitve nakazujejo, da je BSA dobro ujet v alginatnem ogrodju, ki prepreči stik z zunanjim okoljem nizkega pH. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi v literarnih virih (24).

4.2.5.4 Sproščanje BSA iz alginatnih mikrodelcev z dodatkom pospeševalcev sproščanja v mediju s spremembbo pH (pH 3,0 → pH 7,0)

V MD z alginatom 40G z BSA smo dodali super-razgrajevalo Ac-Di-Sol, ki je po strukturi notranje premrežena karboksimetyl celuloza, v koncentraciji 4 % glede na alginat. Te MD smo tudi liofilizirali. V drugo formulacijo smo poleg Ac-Di-Sol dodali še PAS decil maltopiranozid v dvakratni količini glede na BSA. Te MD smo sproščali le v sveži obliki.



Graf 21: Sproščanje BSA iz MD v mediju s pH 3,0 do pH 7,0.

Iz grafa 21 je razvidno, da razgrajevalo Ac-Di-Sol pomembno pripomore k večjemu sproščanju, saj se je iz svežih in liofiliziranih MD sprostilo okoli 60 % proteina v primerjavi s 40 % iz MD, ki razgrajevala niso vsebovali (graf 20). Nabrekanje Ac-Di-Sola pripomore k hitrejšemu razpadu MD. Iz svežih MD, ki so dodatno vsebovali še PAS decil maltopiranozid, pa se sprostilo dodatnih 10 % proteina, tako da je končna količina sproščenega BSA dosegla 70 %. Zaradi dodanih pospeševalcev sproščanja se je nekaj proteina v kislem sprostilo, vendar pod 5 %.

5. SKLEPI

Namen diplomske naloge je bil optimizirati izdelavo alginatnih MD, da dobimo delce velikosti $<1000 \mu\text{m}$ in v take MD vgraditi modelno proteinsko učinkovino. V nadaljevanju naloge smo proučili vpliv različnih faktorjev na sproščanje proteina iz MD. Ugotovili smo:

- Pri izdelavi MD je imela največji vpliv na velikost in morfologijo MD velikost šobe. Večja ko je bila šoba, večji in lepši MD so nastali. Naslednji faktor, ki je imel vpliv na velikost in morfologijo delcev, je bila koncentracija alginata. Pri višji koncentraciji alginata so v povprečju nastali lepši in tudi večji MD. Pri sušenju MD smo opazili, da je velikost MD sušenih na zraku manjša od velikosti primerljivih MD sušenih z liofilizacijo. Prav tako pa način sušenja vpliva na poroznost MD, saj smo na SEM slikah videli, da so liofilizirani MD bolj porozni kot MD sušeni na zraku.
- Učinkovitost vgradnje proteina v MD je bila odvisna od koncentracije premreževalca CaCl_2 . Pri koncentraciji premreževalca 0,5 M je bila učinkovitost vgradnje 15-30 % višja kot pri primerljivih formulacijah, premreženih v 0,1 M CaCl_2 . Če primerjamo alginata 40G in 70G, ugotovimo, da je 70G v 0,5 M CaCl_2 zadržal med premreženjem 15 % več proteina kot alginat 40G. Pri premreževanju v 0,1 M CaCl_2 razlike med alginatoma 40G in 70G niso bile opazne.
- Ugotovili smo, da višja ionska moč pufra pripomore k večjemu deležu sproščenega BSA. V 10x PBS se je iz primerljivih MD sprostilo od 10 do 40 % več proteina kot v 1x PBS pufru. V 1x PBS se iz svežih MD sprosti 15 do 30 % manj BSA, kot iz liofiliziranih MD. Ravno obratno pa se v 10x PBS sprosti iz svežih MD 10 do 20 % več BSA kot iz liofiliziranih MD.
- V mediju s spremembo pH so MD uspešno zadržali protein v kislem okolju in ga uspešno sprostili ob zvišanju pH na 7,0. Prav tako smo opazili, da se je iz bolj premreženih (v 0,5 M CaCl_2) svežih MD sprostilo 20-40 % manj BSA kot iz manj premreženih MD v 0,1 M CaCl_2 . Pri liofiliziranih MD pa so te razlike le 5-10 % v prid manj premreženim MD (v 0,1 M CaCl_2). Iz liofiliziranih MD se je protein začel sproščati približno pol ure prej kot iz svežih MD.
- Dodatek pospeševalcev sproščanja Ac-Di-Sol in decil-maltopiranozida je povečal delež sproščenega BSA iz MD za 10 do 30 %.
- NaDS – PAGE elektroforeza je pokazala, da se protein med procesom izdelave in sproščanjem ne razgradi.

6. LITERATURA

1. Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007; 229-230.
2. Campbell N, Reece J: Biology, 7th edition. Pearson Education Inc. San Francisco, 2005; 77-86.
3. Boyer R: Temelji biokemije. Študentska založba, Ljubljana, 2005; 69-94.
4. Zvonar A, Gašperlin M: Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabo. Farmacevtski vestnik. 2011; 62: 131-138.
5. <http://www.connectorate.ch/Products/encapsulationresearch.htm> (01.08.2012)
6. Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A: Alginat v dostavnih sistemih s prirejenim sproščanjem. Farmacevtski vestnik. 2008; 59: 293-301.
7. Coviello T, Matricardi P, Marianelli C, Alhaique, F: Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. Journal of Controlled Release. 2007; 119: 5-24.
8. Lee KY, Yuk SH: Polymeric protein delivery systems. Progress in Polymer Science. 2007; 32: 669-697.
9. Gombotz, Wayne R, Wee SF: Protein release from alginate matrices. Advanced Drug Delivery Reviews. 1998; 31: 267-285.
10. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Biochemistry 5th edition. New York: W. H. Freeman; 2002; Poglavlje 4.1.
11. Kasper JC, Friess W: The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2011; 78: 248-263.
12. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Drying.svg> (06.08.2012)
13. Uplaznik M: Vrstična mikroskopija v eksperimentalni fiziki. Seminar, UL-FMF, Ljubljana 2005.
14. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Schema_MEB_\(en\).svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Schema_MEB_(en).svg) (06.08.2012)
15. Wells LA, Sheardown H: Extended release of high pI proteins from alginate microspheres via a novel encapsulation technique. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2007; 65: 329-335.

16. Spremni list BSA -
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a4919pis.Par.0001.File.tmp/a4919pis.pdf (12.08.2012)
17. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bovine_serum_albumin_3v03_crystal_structure.jpg (12.08.2012)
18. Rezende RA, Bártolo PJ, Mendes A, Maciel FR: Experimental characterisation of the alginate gelation process for rapid prototyping. *Chemical engineering transactions*. 2007; 11: 509-514.
19. Das MK, Senapati PC: Furosemide-loaded alginate microspheres prepared by ionic cross-linking technique: Morphology and release characteristics. 2008; 70: 77-84.
20. Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A: The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation. *Scientia Pharmaceutica*. 2008; 76: 77-89.
21. Vandenberg GW, Drolet C, Scott SL, de la Noüe J: Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. *Journal of Controlled Release*. 2001; 77: 297-307.
22. Soni ML, Kumar M, Namdeo KP: Sodium alginate microspheres for extending drug release: formulation and in vitro evaluation. *International Journal of Drug Delivery*. 2010; 2: 64-68.
23. Zhang J, Li X, Zhang D, Xiu, Z: Theoretical and experimental investigations on the size of alginate microspheres prepared by dropping and spraying. *Journal of Microencapsulation*. 2007; 24: 303-322.
24. Zhang J, Li X, Zhang D, Xiu Z: Encapsulation efficiency and release behaviors of bovine serum albumin loaded in alginate microspheres prepared by spraying. *Journal of Applied Polymer Science*. 2008; 110: 2488-2497.