

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VEDRANA VRHOVSKI REPKA

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



VEDRANA VRHOVSKI REPKA

**IZDELAVA HIDROGELOV ZA VLAŽNO CELJENJE RAN NA OSNOVI
ALGINATA**

ALGINATE HYDROGELS FOR MOIST WOUND HEALING

Ljubljana, 2012

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

Iskrena hvala

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

Tatjani Horvatič za praktične nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju;

diplomski komisiji za hiter in temeljit pregled diplomske naloge.

Iz vsega srca se zahvaljujem tudi možu Kristianu in svoji družini za razumevanje in podporo med celotnim študijem.

Izjava:

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

Vedrana Vrhovski Repka

Ljubljana, februar 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič

VSEBINA

VSEBINA.....	1
1. POVZETEK	3
2. SEZNAM OKRAJŠAV	5
3. UVOD.....	6
3.1. PROCES CELJENJA RANE.....	6
3.2. KRONIČNE RANE	7
3.3. OSKRBA RANE.....	8
3.4. ZGRADBA IN MATERIALI OBLOG ZA VLAŽNO CELJENJE RAN.....	9
3.4.1. Hidrogeli.....	10
3.4.2. Alginat	12
3.4.2.1. Fizikalne lastnosti alginata.....	13
3.4.2.2. Tvorba gela.....	15
3.4.2.3. Uporaba alginatov	16
3.5. ZDRAVLJENJE KRONIČNIH RAN Z IZLOČKOM LIČINK MUH.....	17
3.5.1. Potek zdravljenja	18
3.6. REOLOŠKO VREDNOTENJE HIDROGELOV.....	21
3.6.1. Naprave za proučevanje reološkega obnašanja sistemov	22
3.6.2. Senzorski sistemi pri rotacijskih reometrih	24
4. NAMEN DELA	26
5. EKSPERIMENTALNO DELO	27
5.1. MATERIALI.....	27
5.2. NAPRAVE	27
5.3. POSTOPKI IN METODE	28
5.3.1. Izdelava hidrogelov	28
5.3.1.1. Standardni postopek izdelave hidrogela	28
5.3.2. Sterilizacija z nasičeno vodno paro	28
5.3.3. Vgradnja izločka ličink muh v hidrogel	30
5.3.4. Reološko vrednotenje hidrogelov.....	30
5.3.4.1. Postopek merjenja viskoznosti.....	31
5.3.5. Liofilizacija hidrogelov	31
5.3.6. Rehidracija liofiliziranih vzorcev	33
5.3.7. Preskus sproščanja jajčnega albumina iz Na-alginatnega gela.....	33
5.3.7.1. Priprava fosfatnega pufra PBS.....	33
5.3.7.2. Izdelava hidrogelov z vgrajenim jajčnim albuminom.....	33
5.3.7.3. Izvedba sproščanja jajčnega albumina iz hidrogela.....	34
5.3.7.4. Priprava mobilne faze in analiza vzorcev s HPLC	34
5.3.7.5. Umeritvena premica za jajčni albumin.....	35
6. REZULTATI IN RAZPRAVA	35

6.1. OPTIMIZACIJA POSTOPKA IZDELAVE HIDROGELOV	35
6.1.1. Vgrajevanje izločka ličink muh v hidrogel in njegov vpliv na reološke lastnosti izdelka.....	37
6.1.2. Vpliv postopka sterilizacije na reološke lastnosti hidrogela	39
6.1.2.1. Sterilizacija z avtoklaviranjem.....	40
6.1.2.2. Suha sterilizacija	40
6.1.2.3. Sterilizacija z UV-sevanjem.....	41
6.1.2.4. Vpliv sterilizacije na reološke lastnosti hidrogela iz Na-alginata	42
6.1.3. Vpliv liofilizacije na reološke lastnosti hidrogela	44
6.2. SPROŠČANJE JAJČNEGA ALBUMINA IZ HIDROGELA	46
6.2.1. Določitev enačbe umeritvene premice	46
6.2.2. Sproščanje jajčnega albumina iz Na-alginatnega hidrogela.....	48
7. SKLEP	53
8. LITERATURA	54

1. POVZETEK

Kronične rane predstavljajo veliko breme za bolnike in zdravstveno osebje, saj je njihovo zdravljenje dolgotrajno, spremljajo ga tako bolečina kot tudi možnost dodatnih okužb.

Sodobni pristopi k zdravljenju ran temeljijo na vzdrževanju vlažnega mikrookolja na rani, kar med drugim omogočajo hidrogeli. Številne raziskave so pokazale, da se rane v vlažnem okolju hitreje celijo, draženje živčnih končičev je zmanjšano, kar posledično umirja bolečino. Prav tako se je v bolnišnice ponovno uvedla biokirurška metoda zdravljenja ran in sicer v obliki zdravljenja z ličinkami muh *Lucillia sericata*. Zaradi žgečkanja ali sklenja ter rahlo pekočega občutka, do katerega pride zaradi lezenja ličink po zdravi koži okoli rane, je njihova uporaba lahko neprijetna. K omejeni uporabi prispeva tudi zelo draga dobava sterilnih ličink iz tujine. Te težave so poskušali rešiti z uporabo izločka ličink muh, ki ga pridobivajo na Biotehnološki fakulteti Univerze v Ljubljani. Izloček ima dokazano encimsko, proliferativno, protibakterijsko in protivnetno delovanje. Ker je izloček tekoč, je sam neprimeren za nanos na rano.

Namen našega dela je bil izdelati hidrogel z vgrajeno čim večjo količino izločka ličink muh. Cilj je bil dobiti sterilni izdelek primernih reoloških lastnosti, ki smo jih proučevali z rotacijsko viskozimetrijo.

Na Katedri za farmacevtsko tehnologijo že nekaj časa, v sklopu eksperimentalnega projekta »Biokirurgija kronične rane – zdravljenje z ličinkami muh *Lucillia sericata*«, izdelujejo 6 %-Na-alginatni gel z vgrajenim 10 %-izločkom. Ta postopek smo v diplomskem delu želeli optimizirati in izboljšati.

Da bi dobili gel primernih reoloških lastnosti, smo najprej poskušali s spremembo koncentracije Na-alginata in z ionotropnim geliranjem s CaCl_2 . Ker se ta postopek ni izkazal za ustreznega smo se odločili za izdelavo gelov višjih koncentracij Na-alginata. Kot primerni sta se izkazali 10 % in 12 % koncentraciji, saj smo po vgratitvi določene količine izločka dobili gel ustreznih reoloških lastnosti. V 10 %-hidrogel smo uspeli vgraditi 40 % izločka, v 12 %-hidrogel pa 60 % izločka.

Sterilizacijo smo izvajali na več načinov z avtoklaviranjem, suho sterilizacijo in UV-sevanjem. Ker je izloček termolabilen, smo morali sterilizirati hidrogel posebej in nato aseptično vgraditi izloček ličink muh. Izdelke so na Biotehnološki fakulteti nacepili na

gojišče in dokazali njihovo sterilnost. Kot najustreznejša se je izkazala metoda avtoklaviranja, kljub temu, da z njo negativno vplivamo na reološke lastnosti izdelka.

Proučevali smo tudi vpliv postopka liofilizacije na reološke lastnosti hidrogelov in ugotovili, da po rehidraciji hidrogeli ohranijo svoje lastnosti.

S preliminarnimi poskusi sproščanja modelnega proteina jajčnega albumina v Na-alginatni hidrogel nismo dobili primerne odgovora, ali je Na-alginatno okolje primerno za dostavo proteinov. Metodo bi morali v nadaljnjih raziskavah optimirati.

Zaključimo lahko, da smo uspeli izdelati homogen 12 %-Na-alginatni gel, v katerega smo po avtoklaviranju v aseptičnih pogojih vgradili 60 % izločka ličink muh in dobili končni izdelek s 5 % Na-alginata, ki je bil dokazano steril. Hidrogel je imel primerne reološke lastnosti, ki po aplikaciji na rano na njej ostane in zagotovi tesen stik ter vzdržuje vlažno mikrookolje na rani, hkrati pa izloček s svojim encimskim, proliferativnim, protibakterijskim in protivnetnim delovanjem omogoča bolj uspešno zdravljenje kroničnih ran.

2. SEZNAM OKRAJŠAV

G	α -L-guluronska kislina
HPLC	angl. High Performance Liquid Chromatography - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
M	β -D-manuronska kislina
PBS	fosfatni pufer s pH 7

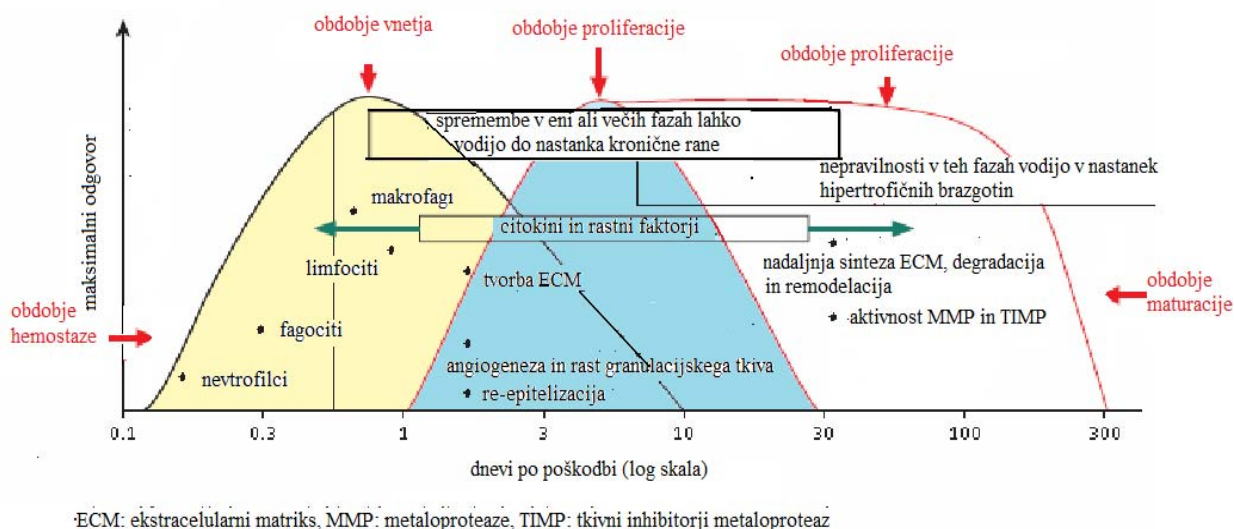
3. UVOD

Koža je največji organ v človeškem organizmu, ki opravlja številne funkcije. Služi za razmejitve telesa od okolice, uravnavanje telesne temperature, proizvodnjo vitamina D, je prva obrambna linija pred vdorom tujkov v organizem in človekovo največje čutilo.

Kadar je celovitost kože prekinjena, govorimo o rani. Rana je odprta poškodba kože in globljega tkiva ali sluznic zaradi fizikalnih dejavnikov, kar je lahko vzrok za oslabitev ali izpad njenih funkcij. Notranji procesi celjenja rane jo skušajo povrniti v prvotno stanje in ji povrniti funkcionalnost. Vsaka rana ima namreč lastno sposobnost, da se zaceli preko številnih in različnih celičnih aktivnosti.

3.1. PROCES CELJENJA RANE

Fiziološki proces celjenja se odvija v več fazah, kjer se posamezne celične aktivnosti odvijajo v določenem časovnem zaporedju, se navzujejo ena na drugo in prepletajo. Ločimo štiri faze celjenja: hemostaza, vnetna faza, proliferacija ter faza maturacije oziroma zorenja (slika 1). Včasih teh obdobj ni mogoče ločiti, saj se medseboj prekrivajo ali napredujejo skupaj (1,2).



Slika 1: Shema faz celjenja rane (2).

Poškodba kože ponavadi prizadene krvožilje, kar privede do krvavitve. V fazi hemostaze nastopi vazokonstrikcija in kaskada procesov koagulacije, v kateri agregirajo trombociti, nastane fibrinski čep in krvavitev se ustavi. Nastali fibrinski čep predstavlja zasnovo za nastajajoče ogrodje med procesom celjenja.

Ko je hemostaza zaključena, sledi faza vnetja, ki nastopi nekaj ur po poškodbi. Vnetno fazo spremljajo rdečina, oteklina, lokalno povišana temperatura in bolečina. Glavne celice vnetne faze so nevtrofilci, ki prvi pridejo v rano in fagocitirajo bakterije, tujke, mrtve celice in poškodovane sestavine ogrodja v rani. Sproščajo lizosomske encime in reaktivne kisikove spojine ter preko signalnih molekul aktivirajo makrofage. Vnetna faza je najbolj bogata z izločkom iz rane. V tej fazi se rana znebi mrtvega tkiva, bori se proti okužbam in se pripravlja za proliferativno fazo.

Proliferativna faza nastopi nekaj dni po poškodbi. V tej fazi se v rani aktivno podvajajo fibroblasti, diferencirajo se v miofibroblaste ter proizvajajo sestavine zunajceličnega ogrodja. Le-tega tvorijo vlakna iz kolagena in elastina ter adhezivnih glikoproteinov, ki so vključeni v gelsko ogrodje proteoglikanov in glikozaminoglikanov. Nastalo granulacijsko tkivo, ki ga sestavljajo fibroblasti, kapilarna mreža in sestavine zunajceličnega ogrodja, dobi rožnato barvo in postopno ga začne prekrivati epitelij.

Faza zorenja je končna faza celjenja rane. Začne se takrat, ko začne upadati število novonastalih fibroblastov. V tem času je prostornina granulacijskega tkiva največja. Število kapilar se zmanjšuje in namesto rdečega granulacijskega tkiva nastaja brazgotina, ki jo tvorijo kolagenska vlakna in epitelij. Njena čvrstost na raztezanje se povečuje, vendar v odvisnosti od vrste tkiva, starosti organizma in delovanja sistemskih in lokalnih dejavnikov, ki vplivajo na celjenje (3).

3.2. KRONIČNE RANE

Kronične rane nastanejo, kadar naravni mehanizmi celjenja odpovejo ali pa so inhibirani zaradi delovanja dolgotrajnih dejavnikov na okvarjeno tkivo. Lahko nastanejo kadarkoli iz akutne rane, ponavadi pa predstavljajo zadnji stadij napredujočega uničenja tkiva, ki ga povzročajo venozne, arterijske ali presnovne poškodbe ožilja, poškodbe zaradi pritiska,

sevanja ali tumorjev. V teh primerih gre za nezadostno funkcionalnost, ki ima za posledico metabolne motnje tkiva s hipoksijo. Posledično pride do odmrtnosti tkiva oziroma nekroze.

Vplivi na celjenje ran so lokalni in sistemski. Lokalni vplivi zajemajo tako arterijsko kot vensko slabo prekrvavitev posameznih predelov telesa in rast benignih in malignih tumorjev. Od sistemskih pa so najpomembnejši starost, podhranjenost, imunsko kompromitirano stanje organizma in na celjenje ran škodljiv učinek zdravil.

Kronične rane lahko nastanejo kjerkoli na telesu, vendar jih največkrat najdemo na spodnjih okončinah. Vseh dejavnikov, ki vplivajo na celjenje ran, pa še ne poznamo (5,6).

3.3. OSKRBA RANE

Pogoj za začetek celjenja je čista rana, ki je ustrezno vlažna, s primerno oskrbljenimi robovi, ki niso macerirani, preskrbljena s krvjo in hranivi, očiščena nekroz, fibrinskih oblog, prekomernega izločka in ki ni okužena z mikroorganizmi.

Rano torej najprej očistimo. Pristopi čiščenja rane so različni. Nečistoče na rani lahko odstranimo mehansko s spiranjem ali sesanjem, kirurškim posegom, z biološkim pristopom, s pripravki, ki spodbujajo avtolizo, encimski razkroj ali delujejo protimikrobno.

Ločimo dva pristopa oskrbe ran: klasično oskrbo in sodobnejše pristope.

Klasična oskrba rane temelji na predpostavki, da se suhe rane prevezujejo na suho, mokre rane pa z navlaženimi obvezilnimi materiali, pri čemer večinoma uporabljamo vatirance in gazo. Klasična oskrba ima kar nekaj slabosti.

Gaza, bodisi suha ali prepojena s fiziološko raztopino ali izcedkom, se začne na rani sušiti, nanjo se prilepijo nitke gaze, zato je prevezovanje boleče in poškoduje tkivo. V rani pogosto ostajajo nitke in droben material, ki kot tujki dodatno povzročajo vnetje. Velika prepustnost gaze za izločke, pline in bakterije povzroča okužbo. Zaradi hitrega sušenja in ohlajanja rane se celjenje upočasni, saj je delovanje celic in encimov v suhem okolju onemogočeno. Vpijanje izločkov gre v vse smeri, kar povzroča maceracijo zdravega okoliškega tkiva in zmehčanje robov rane. V zastareli praksi pri klasični oskrbi so pogosto uporabljali tudi zdravila z antibiotiki, katerih lokalno uporabo danes odsvetujejo, saj je njihova učinkovitost na rani vprašljiva. Prav tako lokalna uporaba antibiotikov prispeva k razvoju odpornih sevov bakterij. Zdravljenje je dolgotrajno in zelo obremenilno za bolnika,

saj ga spremljajo tako bolečina kot tudi možnost dodatnih okužb. Vse te pomanjkljivosti so pripeljale do razvoja sodobnejše oskrbe rane.

Sodobni pristopi k celjenju ran temeljijo na vzdrževanju vlažnega mikrookolja na rani. Prednosti, ki jih prinaša vlažno okolje, so številne. Vлага ustrezno navlaži tkivo in omogoča večjo celično in encimsko aktivnost. Vlažno, toplo in kislo okolje ugodno vpliva na avtolitične procese čiščenja rane in razkrajanje nekroz. Blaga hipoksija stimulira angiogenezo in omogoča tvorbo novega kapilarnega mrežja in oskrbo rane s hranivom, kisikom in stimulativnimi mediatorji celjenja. Vzdrževanje živčnih končičev v vlažnem okolju zmanjša njihovo draženje in umirja bolečino. Sodobne obloge ustrezno pripravijo ležišče rane in predstavljajo nadomestek majkajočega tkiva, vpijajo izločke ter rano zaščitijo pred sekundarno okužbo. Potrebno je manj pogosto prevezovanje, ki je tudi manj boleče. S tem se poveša kakovost bolnikovega življenja, zmanjšajo se tudi celokupni stroški zdravljenja, čeprav so sodobne obloge dražje od klasične gaze. Sodobne obloge niso univerzalne, vsaka je namenjena določeni vrsti in fazi celjenja rane. Izbira temelji na velikosti rane, količini izcedka, prisotnosti okužb ter lastnosti okoliškega tkiva (4).

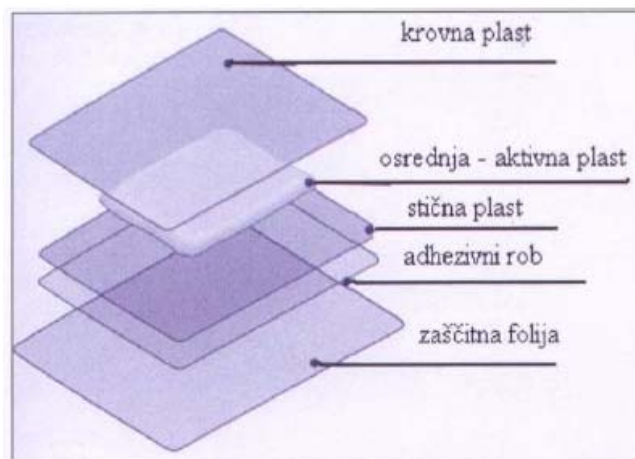
3.4. ZGRADBA IN MATERIALI OBLOG ZA VLAŽNO CELJENJE RAN

Za celjenje je pomembno, da je rana primerno vlažna.

Obloga mora:

- zagotoviti zadostno vpijanje tekočine, ki jo rana izloča,
- zadržati vlažnost na rani brez vpijanja izločka, kar bi lahko rano izsušilo,
- ali pa rano vlažiti oziroma jo hidratirati.

Uporabljamo enoplastne ali sestavljene obloge. Pri sestavljenih oblogah vsaka plast opravlja določeno funkcijo (slika 2).



Slika 2: Sestavljene obloge za rane (4).

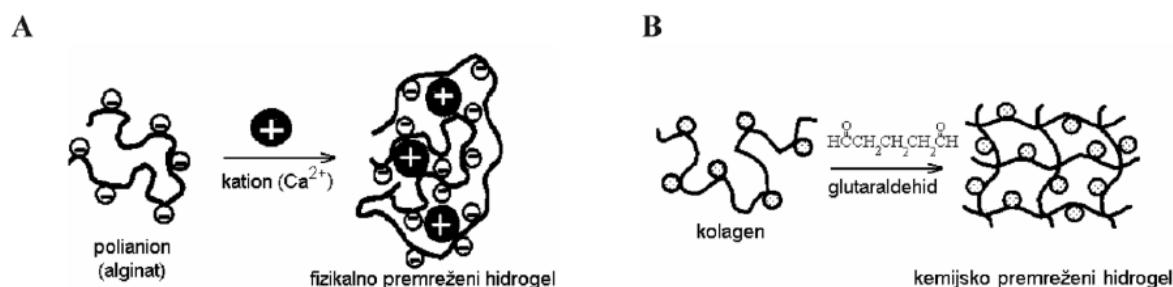
Zaščitna folija fizikalno varuje oblogo in zagotavlja njeno sterilnost do aplikacije. Pred aplikacijo jo odstranimo. Adhezivni rob omogoča, da se obloga prilepi na kožo in obdrži na mestu. Stična plast je v neposrednem stiku z rano in ščiti njeno ležišče, vendar se z njo ne zlepi. Osrednjo plast sestavljajo polimeri, ki so aktivno vključeni v proces celjenja rane. Krovná plast se stika s stično in adhezivno plastjo in skupaj prekriva in ščiti novonastali epitelij, prepustna je za pline in vlago ter neprepustna za vodo in mikroorganizme (4).

Materiali za izdelavo sodobnih oblog so najpogosteje polimeri, ki so lahko naravnega (celuloza, bombaž, viskoza, alginat, pektin, hitosan, kolagen, mikrobná celuloza idr.), sinteznega ali polysinteznega izvora (poliamidi, poliestri, poliuretani, polipropileni, celulozni acetati, polivinilkloridi, akrilati, silikoni idr.). Glede na kemijske in fizikalne lastnosti so sposobni različno vezati vodo oziroma izloček iz rane. Hidrofilni polimeri imajo veliko sposobnost vezanja vode, pri čemer nabrekajo in tvorijo gel (4).

3.4.1. Hidrogeli

Geli oziroma hidrogeli so sestavljeni iz premrežene tridimenzionalne polimerne strukture, v katero je vključena voda. Polimer v vodi nabreka, ne da bi se v njej raztapljal. Netopnost in fizikalna integriteta sta posledica prisotnih kemijskih (ireverzibilni hidrogeli) ali fizikalnih (reverzibilni hidrogeli) premreženj med polimernimi verigami. Povezava med polimernimi verigami je pri kemijskih premreženjih kovalentne narave, pri fizikalnih pa so

verige medseboj povezane s šibkimi van der Waalsovimi vezmi, vodikovimi vezmi ali hidrofobnimi interakcijami (slika 3) (7).



Slika 3: Primer tvorbe interakcij v fizikalno premreženem alginatnem gelu (A) in kovalentno premreženje kolagena z glutaraldehidom (B) (7).

Geli že sami po sebi vsebujejo veliko količino vode, zato je potrebna le majhna količina izcedka za zagotovitev vlažnega okolja. Zaradi visoke vsebnosti vode ter mehke konsistence so podobni tkivom. Mehka konsistenca in prožnost hidrogela zmanjšujeta možnost draženja okoliškega tkiva, zato je biokompatibilnost hidrogelov zelo velika (8).

Stopnja, do katere hidrogel v vodi nabreka, je odvisna od termodinamske kompatibilnosti polimera in vode ter elastične sile polimernih verig, ki nabrekanju nasprotujejo. Končna količina vode v hidrogelu je zato odvisna od hidrofilnosti polimera in stopnje premreženja. Bolj je hidrofilen, bolj nabreka, bolj je premrežen, manjše je nabrekanje (7).

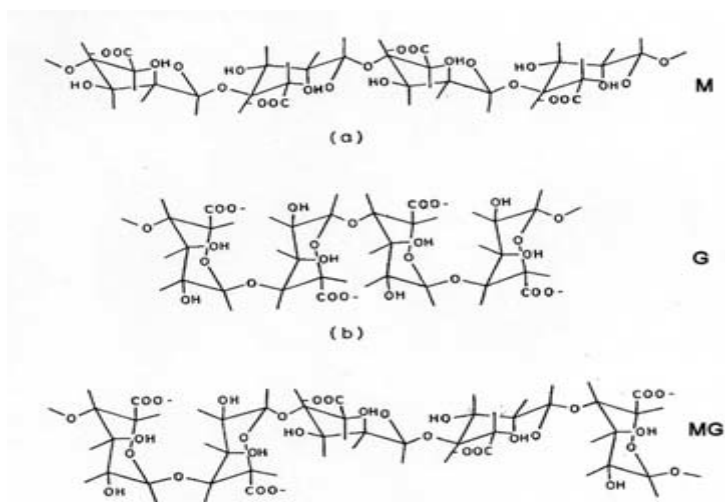
Pri kontaktu z rano je zelo pomembna ustrezna viskoznost hidrogelov. Hidrogeli z nizko viskoznostjo se hitro izsušijo in niso zmožni zagotoviti ustreznega kontakta s površino rane, saj je njihova zmožnost adheriranja na rano majhna. Po drugi strani visoka viskoznost gelov predstavlja problem, kako izdelati homogen gel in ga aplicirati (3). V splošnem viskoznost hidrogelov narašča z višanjem koncentracije polimera, njegove molekulske mase ter gostote premreženja. Na navidezno viskoznost vplivajo tudi dodatki elektrolitov, topil oziroma netopil ter temperatura, ki v odvisnosti od interakcij med molekulami polimera in topila viskoznost poveča ali zmanjša (9). Biorazgradljivost polimernega nosilca ni vedno nujna, zlasti pri oblogah za rane, saj hidrogel z rane odstranimo ali speremo pod čisto tekočo vodo ali s sterilno fiziološko raztopino (7).

V terapiji kroničnih ran in opeklin hidrogeli v obliki sodobnih oblog zagotavljajo vlažno mikrookolje kar pospeši celjenje ran. Raziskave so pokazale, da se rane v vlažnem okolju hitreje celijo, dermalno tkivo in epiteljski elementi se bolj ohranijo in zato je proces celjenja hitrejši. Obloge, ki ohrajujejo vlažnost na rani in celo aktivno sodelujejo v procesih celjenja v veliki meri izpodrivajo prekrivanje ran s klasično gazo (10,11).

3.4.2. Alginat

Alginat je naravni polisaharid, ki se v glavnem nahaja v različnih vrstah rjavih morskih alg (Pheophyta). Količina alginata lahko dosega tudi do 40 % mase alg in variira znotraj posameznih vrst in med različnimi deli rastlin. Večinoma se nahaja v celičnih stenah in znotrajceličnih prostorih in sicer v obliki kalcijevih, magnezijevih, stroncijevih, barijevih, natrijevih in kalijevih soli (12-15).

Alginat je linearen nerazvejan polisaharid, sestavljen iz dveh monomernih enot, β -D-manuronske (M) in α -L-guluronske (G) kisline, povezanih z 1,4-glikozidno vezjo. Kislini sestavljata homogene poli-M in poli-G odseke, ki so med seboj ločeni z območji, kjer se M in G monomerni enoti izmenjujeta (MG) (slika 4) (12,13).



Slika 4: Struktura polimanuronskega (M) in poliguluronskega (G) odseka alginata ter odseka, kjer se manuronska in guluronska kislina izmenjujeta (MG) (13).

3.4.2.1. Fizikalne lastnosti alginata

Fizikalne lastnosti alginata so odvisne od molekulske mase in sestave makromelekule, zlasti od razmerja med monomernimi enotami in dolžinami posameznih odsekov. Sestavo pogojuje vrsta organizma in del alge, iz katerega alginat pridobivamo, pa tudi od rastišča in letnega časa žetve. Kakšna je primerna sestava alginata in njegova molekulska masa, je odvisno od namena uporabe (12,13).

Viskoznost

Viskoznost alginatnih raztopin je odvisna predvsem od molekulske mase in koncentracije alginata. Prav tako vpliva tudi raznolikost intrinzične fleksibilnosti posameznih odsekov polimerne verige, pri čemer ima pomembno vlogo naboj funkcionalnih skupin. Če je alginatna veriga nabita pretežno negativno, se bo viskoznost raztopine povečala zaradi težnje molekule v naključno zvito obliko. Raziskave so pokazale, da je intrinzična viskoznost alginatnih raztopin linearno odvisna od števila in jakosti ionskih sil v raztopini. Prav tako pa se viskoznost raztopin povečuje z naraščanjem molekulske mase polimera, vendar raztopine s preveliko viskoznostjo, v primeru zahteve po sterilnem materialu, težko sterilno filtriramo (12).

Topnost

Natrijev alginat in večina soli alginske kisline z enovalentnimi kationi je dobro topnih v vodi in tvorijo viskozne koloidne raztopine s psevdoplastičnimi lastnostmi. V prisotnosti dvovalentnih kovinskih kationov pa nastane elastičen gel, ki je vodi netopen. Velik vpliv na topnost polimera v vodi ima pH, ki določa elektrostatski naboj monomernih enot. Alginska kislina ima polianionski značaj in je v protonirani obliki praktično netopna v vodi, tvori pa gele ali precipitate. Določeni sta pK_a vrednosti dveh monomernih enot in sicer 3,38 za M in 3,65 za G monomer v 0,1 M NaCl. V primeru večjega števila G monomerov se tudi pK_a polimera povečuje (12).

Premreževanje

Alginati z različnimi večvalentnimi kationi, kot so Ca^{2+} , Ba^{2+} in Sr^{2+} , tvorijo ionotropne gele. Vezava ionov na polimer in njihova afiniteta sta odvisni predvsem od sestave alginske kisline. Afiniteta alginata do zemljoalkalijskih kovin raste od

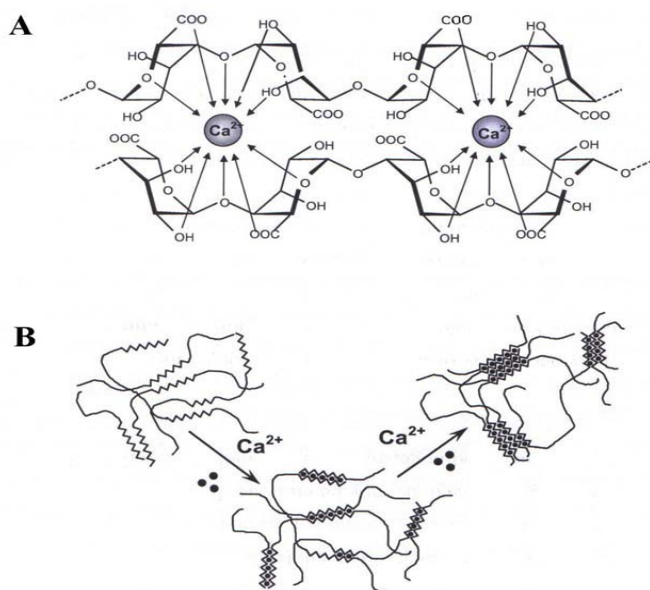
$Mg^{2+} \ll Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$, vendar pa je to odvisno od strukture polimera oziroma vsebnosti odsekov G in M. Raziskave so pokazale, da selektivnost narašča z večjo vsebnostjo G-monomernih enot.

GG-odsek $Mg^{2+} \ll Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$

MM-odsek $Mg^{2+} \sim Ca^{2+} \sim Sr^{2+} < Ba^{2+}$

GM-odsek $Mg^{2+} \sim Ca^{2+} \sim Sr^{2+} \sim Ba^{2+}$

Visoka selektivnost med podobnimi ioni kaže, da povezave med alginatom in omenjenimi ioni niso samo elektrostatske. Ta mehanizem je pojasnjen s tako imenovanim modelom »škatle za jajca« (slika 5), kjer biaksialno povezani G-odseki predstavljajo ogrodje, vmes pa so prostori, kamor se ujamejo dvovalentni kationi kot jajca v »škatli za jajca«. Ostali dvovalentni kationi, kot so Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} in Mn^{2+} , prav tako premrežijo alginatni gel, vendar jih zaradi njihove toksičnosti v biomedicinske namene ne uporabljamo (8,12).



Slika 5: Shematski prikaz nastanka ionotropnega gela z modelom »škatle za jajca«:
a) kelacija s dvovalentnim kationom, b) stransko povezane alginatne verige (12).

3.4.2.2. Tvorba gela

Alginska kislina je v neionizirani obliki v vodi netopna, medtem ko je topnost njenih soli odvisna od vrste prisotnih kationov ter vrednosti pH medija (13). Alginatni gel je, tako kot večina ostalih biokompatibilnih gelov, neprekinjena, v vodi nabrekla mreža polimera katere posamezni deli so med seboj povezani z nekovalentnimi vezmi. Lastnosti alginatnega gela so odvisne od parametrov, kot so kemična sestava, zaporedje in molekulska masa (12).

Alginat tvori dve vrsti gela in sicer kislinski in ionotropni gel.

Kislinski gel

Nastane pri pogojih zniževanja pH raztopine pod pK_a guluronske ($pK_a=3.65$) in manuronske ($pK_a=3.38$) kisline, ko preide raztopina alginata iz sol v gel stanje. Zniževanje pH mora potekati počasi, saj se ob hitri spremembi pH alginska kislina izobori. Kemična sestava in monomerno zaporedje sta pomembna za fizikalne lastnosti kislinskega gela. Domnevno je stabiliziran z intramolekularnimi vodikovimi vezmi. Glavni gradniki so poliguluronski odseki, vendar pa k tvorbi gela nekoliko prispevajo tudi polimanuronski odseki. Višji kot je delež guluronskih odsekov, močnejši gel nastane. Z izjemo uporabe v farmacevtske namene, je uporaba kislinskega alginatnega gela do zdaj omejena (12,13).

Ionotropni gel

Nastane z interakcijo večvalentnih kationov (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Al^{3+} itd.) in polimernih verig alginata. Izjema so alginatne soli magnezijevih ionov, ki tako kot soli monovalentnih ionov v vodi tvorijo viskozne koloidne raztopine, zato ti ioni niso primerni za tvorbo gela. Pri ionotropnem geliranju gre za izmenjavo natrijevih ionov iz soli guluronskih kislin z večvalentnimi ioni (najpogostejše Ca^{2+}), ki povežejo posamezne odseke guluronskih kislin ter s tem povzročijo njihovo preureditev v urejeno tridimenzialno strukturo, ki je dodatno stabilizirana z vodikovimi vezmi (model »škatle za jajca«) (slika 5). Za razliko od kislinskega gela, so za tvorbo gela pomembni le poliguluronski odseki, ki imajo zaradi prostorske razporeditve kisikovih atomov v karboksilnih in hidroksilnih skupinah večjo afiniteto do večvalentnih kationov. Poleg elektrostatskih interakcij so v strukturi ionotropnega gela prisotne tudi koordinacijske interakcije z večvalentnim kationom kot kelatnim centrom.

Na lastnosti ionotropnega gela vplivajo tako lastnosti alginata kot tudi lastnosti premreževalnega kationa. Kemijska sestava alginata vpliva na stabilnost, poroznost in odpornost na erozijo alginatnega gela. Višji kot je delež G-enot, bolj stabilen, bolj odporen na erozijo in porozen gel in obratno, višji kot je delež M-enot, bolj elastičen, manj odporen na erozijo in manj porozen je gel. Poleg kemijske sestave je zelo pomembna tudi molekulska masa alginata in zaporedje monomernih enot. Pod določeno molekulsko maso je sposobnost geliranja omejena, medtem ko je nad molekulsko maso $2,4 \times 10^5$ Da ta mogoča. Alginat z daljšimi in številnejšimi G-odseki ima večjo afiniteto do premreževanja ($MM < MG < GG$). Zaporedje monomernih enot vpliva tudi na jakost gela in sicer narašča v naslednjem zaporedju: $MG < MM < GG$. To lahko razložimo s povezavami med monomernimi G- in M-enotami. Odseki GG so med seboj povezani z α -(1,4) glikozidno vezjo in tvorijo zaprto in manj fleksibilno strukturo. Odseki MM pa so povezani z β -(1,4) glikozidno vezjo, kar verigi da strukturo podobno ravnemu traku in ji omogoči večjo fleksibilnost. Pri GM-povezavi polimerna veriga izgubi običajno linearno strukturo in spremeni svojo smer v GM-stiku, kar zmanjša togost odseka (13).

Poleg lastnosti alginata na lastnosti gela vplivajo tudi lastnosti premreževalnega kationa. Pri monovalentnih kationih geliranje ne poteče, medtem ko afiniteta dvovalentnih kationov narašča v naslednjem vrstnem redu: $Mn^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Ca^{2+} < Cu^{2+} < Ba^{2+} < Cd^{2+}$. Ioni z večjo afiniteto tvorijo bolj čvrst gel z grobo in nagubano površino. Pri trivalentnih kationih pa premreževanje poteče v treh plasteh. Poleg valence je pomembna tudi velikost oziroma premer iona. Ioni z večjim premerom zapolnijo večji prostor med alginatnimi verigami pri čemer nastane stabilnejši gel, ki manj nabreka. Velikost premreževalnih kationov narašča v naslednjem vrstnem redu: $Al^{3+} < Zn^{2+} < Cu^{2+} < Ca^{2+}$ (13).

3.4.2.3. Uporaba alginatov

Zaradi velike sposobnosti zadrževanja vode, alginat že dolga leta uporabljamo v industriji kot gelirno sredstvo ter sredstvo za povečanje viskoznosti in stabilnosti različnih disperzij. V farmaciji alginsko kislino ter natrijev in magnezijev alginat uporabljamo skupaj z antacidi in H₂-receptorskimi antagonisti v zdravilih za zdravljenje gastroezofagealnega refluksa. Zaradi sposobnosti nabrekanja in tvorbe gela je ta lastnost zelo cenjena v

alginatnih oblogah, ki jih uporabljamo za zaustavljanje krvavitev in pospeševanje celjenja ran (4,8,12).

3.5. ZDRAVLJENJE KRONIČNIH RAN Z IZLOČKOM LIČINK MUH

Uporaba ličink muh iz družine Calliphoridae, zlasti vrste *Lucilia sericata* za zdravljenje akutnih in kroničnih ran sega daleč v preteklost. Uporabljali so jih že avstralski aboridžini, Maji v Srednji Ameriki ter druga ljudstva po svetu. Prve zapise o tej metodi zdravljenja najdemo že v zgodnjih evropskih medicinskih besedilih (Hortus sanitatus iz leta 1491). Prvi, ki je podrobneje opisal pozitivne učinke ličink muh na ranah je bil vojaški kirurg Ambroise Paré leta 1557. O zdravljenju z ličinkami muh so pisali tudi Hieronimuis Fabricius leta 1634, Zachmann leta 1704, Napoleonov vojaški kirurg, baron D.J. Larrey, J.G. Millingen leta 1809. J.F. Zacharias pa je prvi namerno vnašal ličinke v strelne rane vojakovo, da bi pospešil zdravljenje že na bojnem polju. Znanstveno proučevanje ličink se je začelo leta 1917, ko je ameriški kirurg W.S. Baer pri pregledu dveh vojakov, ki sta sedem dni pozabljena ležala v jarku z globokimi vbodnimi ranami opazil, da sta oba brez znakov okužbe in da so rane, na katerih so bile ličinke muh, prekrite z neokuženim, rožnatim granulacijskim tkivom. Izkušnje z bojišča je prenesel v zdravniško prakso kot klinični profesor ortopedske kirurgije na John Hopkins Medical School, ZDA. Sprva je uporabljal nesterilne ličinke muhe *Lucilia sericata*, zato je kljub spodbudnim uspehom prišlo tudi do težav in sicer predvsem do okužb s kliničnim tetanusom. Kasneje je zato uporabljal sterilne ličinke. S svojimi izkušnjami, ki jih je opisal v znanstveni literaturi, je prispeval k širjenju uporabe ličink. Zaradi povečanih potreb po ličinkah se je leta 1930 ameriško farmacevtsko podjetje Lederle lotilo gojenja ličink.

Po odkritju sulfonamidov in betalaktamskih antibiotikov ter izboljšanju aseptičnih tehnik in oskrbe ran je terapija z ličinkami skoraj popolnoma zamrla. Temu je prispevala tudi sorazmerno visoka cena zdravljenja, saj so bile ličinke izjemno drage (6,16).

Zaradi resnih kliničnih problemov, ki so nastopili ob pojavu bakterij odpornih proti antibiotikom, npr. proti meticilinu odporni sevi bakterije *Staphylococcus aureus* (MRSA), ki so najpogostejši vzrok kroničnih okužb ran, so v osemdesetih letih prejšnjega stoletja ponovno uvedli biokirurško zdravljenje.

Leta 2003 so v obliki eksperimentalnega projekta »Biokirurgija kronične rane – zdravljenje z ličinkami muh *Lucilia sericata*«, zdravljenje z ličinkami muhe uvedli tudi v Sloveniji. Med projektom je bilo v obdobju od 1. 1. 2003 do 31. 12. 2005 s pomočjo biokirurške obdelave z ličinkami zdravljenih 30 bolnikov. Muhe *Lucilia sericata*, iz katerih pridobivajo ličinke gojijo na Katedri za biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehnoške Univerze v Ljubljani v kontinuirani monokulturi. Zdravljenje je potekalo na Kliničnem oddelku za kirurške okužbe v Kliničnem centru Ljubljana. Bolnike, ki so jih vključili v projekt, so izbrali glede na velikost in tip ran, ki so najprimernejše za biokirurško zdravljenje in sicer vensko razjedo na nogi, kombinirano arterijsko–vensko razjedo, diabetično razjedo, preležanine ter pooperativne kronične rane. Poleg poteka zdravljenja so spremljali tudi bolnikovo počutje, morebitno depresijo in nelagodne občutke (16,17).

3.5.1. Potek zdravljenja

Zdravljenje z ličinkami so izvajali na »klasičen način«. V rane so dajali ličinke, ki so v rani gomazile, jo mehansko »čistile« in vanjo izločale svoj izloček.

Ugodne učinke delovanja ličink na zdravljenje ran so razdelili v naslednje sklope:

Mehansko delovanje

Z lezenjem, s pomočjo ustnih kavljev in površinskih struktur so ličinke mehansko stimulirale živo tkivo rane. Povečala se je količina izločka in drenaža rane, kar je prispevalo k odstranjevanju mrtvega tkiva in izpiranju bakterij.

Encimsko delovanje

Ličinke so encimsko razgrajevale in utekočinjale nekrotično tkivo s svojimi izločki, ki vsebujejo proteolitične encime. V izločkih ličink *Lucilia sericata* so našli kolagenazo, triptazo, lipazo in peptidaze (karbopeptidazi A in B, levcin aminopeptidazo, tripsin aminopeptidazo).

Proliferativno delovanje

Na ranah, zdravljenih z ličinkami, se je pojavilo zdravo granulacijsko tkivo. Za to je odgovoren alantoin, ki tudi pospešuje vaskularizacijo. V novejših raziskavah so preizkušali

proliferativni učinek izločkov mušjih ličink na celični tkivni kulturi fibroblastov in ugotovili pozitivno sinergistično delovanje izločka ličink in človeških citokinov.

Protibakterijsko delovanje

Ličinke v ranah pa tudi sam izloček *in vitro* so delovali zaviralno na rast bakterij vrst *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus hemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlostridium welchii*, *Proteus vulgaris* in MRSA. Protibakterijsko delovanje je najverjetneje rezultat več različnih, a sinergistično delujočih snovi. Izloček vsebuje fenilocetno kislino in fenilacetaldehid, ki imata v kislem okolju močno baktericidno delovanje tako na po Gramu pozitivne kot tudi na po Gramu negativne bakterije. Poleg tega vsebuje še temperaturno in proteolitično odporne protimikrobne oligopeptide, ki so drugače znani kot del prirojene imunosti insektov za obrambo proti bakterijam, glivam in protozomem.

Protivnetno delovanje

Izločki so zavirali stimuliranje nevtrofilnih levkocitov, ki pospešujejo vnetje v kroničnih ranah.

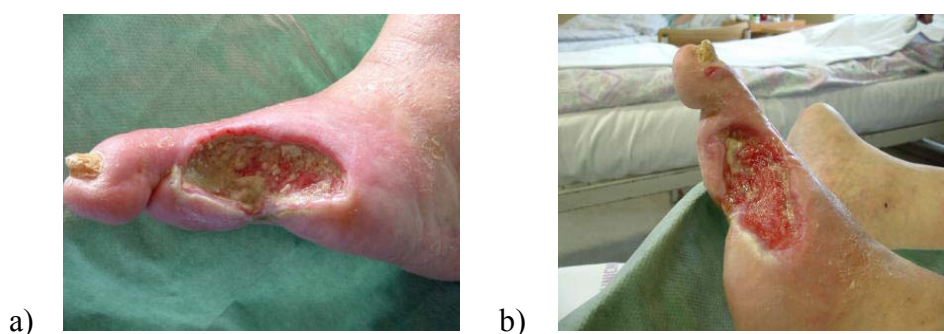
Ličinke muh *Lucilia sericata* ne napadajo zdravega tkiva, hranijo se izključno z nekrotičnim tkivom in bakterijami v rani. Po namestitvi na rano delujejo do tri dni. Ličinke, ki so zrasle do velikosti 7-9 mm, so iz rane odstranili s spiranjem s fiziološko raztopino. Ob pravilni namestitvi ličink ni mogoče, da bi ličinke ostale v rani in se po zabubljanju razvile po normalni razvojni poti do odrasle muhe, saj za to potrebujejo vsaj 5-7 dni, odstranili pa so jih najkasneje po treh dneh (16,17).

Zdravljenje z ličinkami so uporabljali predvsem za kronične in okužene rane, razjede na nogi, razjede zaradi pritiska, statične venske razjede, nevrovaskularne razjede, rane na diabetičnem stopalu, travmatske in pooperacijske rane, abscese, opekline, rane z gangreno, temporalne mastoiditise, nekrotizantne fascitise, piogeni in tuberkulozni osteomielitis, mastoiditis, pyoderma gangrenosum, maligne rane ter kožnega raka (16).

Kontraindikacije in stranski učinki, ki so se pri terapiji zdravljenja z ličinkami pojavili, so bolečina in vročina, za katero so bile najverjetneje odgovorne pirogene snovi, ki nastajajo ob razgradnji sten po Gramu negativnih bakterij. Za zdravljenje z ličinkami so manj

primerne rane, ki so blizu večjih žil, centralnemu živčnemu sistemu in vitalnim organom zaradi večje možnosti krvavitev. Lahko se občasno pojavijo tudi neželeni učinki. Pojavi se lahko žgečkanje ali sklenjenje ter rahlo pekoč občutek zaradi lezenja ličink po zdravi koži okoli rane (16).

Kot so kazali rezultati raziskave, je bilo zdravljenje v večini primerov uspešno že po osmih dneh delovanja ličink na ranah. Rane so se v tem obdobju povsem ali delno zacelile. Površina rane se je zmanjšala, neprijeten vonj je izginil, dno rane se prekrilo z granulacijskim tkivom, rob rane postal rožnat in rana se začela zapirati (slika 6).



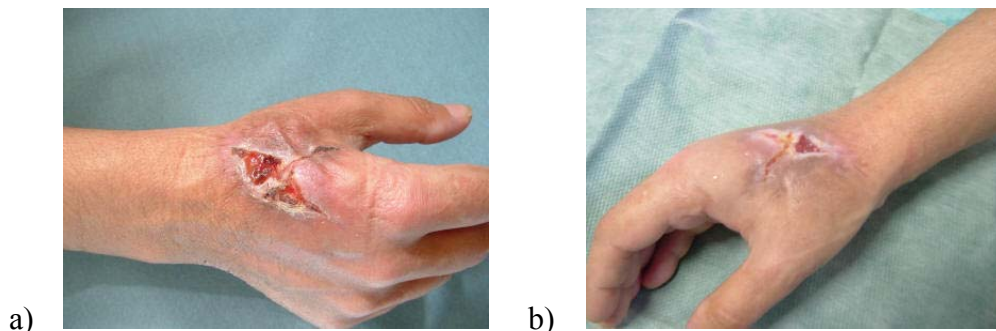
Slika 6: Diabetično stopalo: a) pred in b) po terapiji z ličinkami (6).

Veliko oviro zdravljenju je predstavljala dobava sterilnih ličink iz tujine, ki mora biti hitra, ker ličinke ob namestitvi ne smejo biti starejše od dveh dni. Dodatno pa je uporaba ličink lahko neprijetna zaradi negativnega odnosa ljudi do tovrstnega zdravljenja.

Te težave so poskušali rešiti z uvedbo samega izločka ličink muh *Lucilia sericata* v terapijo zdravljenja kroničnih ran. Način delovanja izločkov je sinergističen in vključuje tudi aktivacijo lastnega imunskega sistema bolnika. V izločkih prisotne snovi so že dobro proučene, novejša raziskava pa razkrivajo kompleksnost delovanja (16).

Samega izločka na rano ne moremo aplicirati, zato so začeli z njegovo vgradnjo v hidrogel. Le-ti so namreč primerni dostavni sistemi, saj omogočajo ohranitev stabilnosti in aktivnosti sestavin izločka. Vodno okolje hidrogelov je podobno fiziološkemu okolju proteinov v organizmu, zato proteini ohranijo svojo nativno strukturo, ne pride do njihove encimske razgradnje in s tem ohranijo tudi svojo biološko aktivnost. Adsorpcija proteinov na hidrogel in adhezija na celice sta majhni zaradi majhne površinske napetosti med

hidrogeli in vodo. Prav tako lahko hidrogeli sprejmejo učinkovine z različno molekulsko maso in hidrofilnostjo, neproblematična je tudi največja količina vgrajene učinkovine (18). Rezultati zdravljenja z izločkom ličink muh so zelo obetavni (slika 7).



Slika 7: Kronična rana: a) pred in b) po terapiji z izločkom (6).

3.6. REOLOŠKO VREDNOTENJE HIDROGELOV

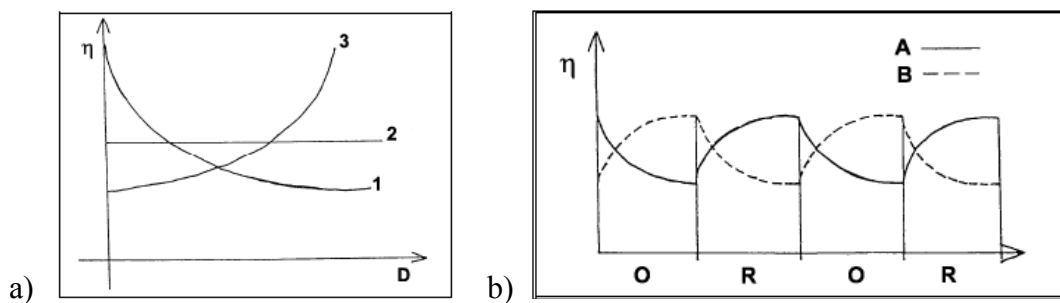
Reologija je interdisciplinarna veda o tokovnem obnašanju in deformaciji materiala. Omogoča vrednotenje mehanskih lastnosti tekočin in poltrdnih snovi ter viskoelastičnih trdnih snovi. Izraz reologija izhaja iz grškega jezika in je sestavljen iz dveh besed: *rheos*, kar pomeni tok, in *logos*, kar pomeni veda.

Najlažje prikažemo pestrost tokovnega obnašanja sistemov z reogrami, kjer predstavimo odvisnost strižne napetosti (τ) od strižne hitrosti (D) ali pa s t.i. viskoznostni diagrami, kjer prikažemo odvisnost viskoznosti (η) od strižne hitrosti (D). Viskoznost predstavlja notranjo upornost tekočin pri pretakanju. Če viskoznost med obremenitvijo ni konstantna, jo imenujemo navidezna viskoznost.

Sisteme, ki jih reološko proučujemo, v grobem delimo na:

- newtonske, pri katerih je viskoznost konstantna in je lastnost sistema. Odvisna je od temperature in atmosferskega tlaka, ne pa tudi od tokovnih pogojev (smeri, jakosti in časa mehanske obremenitve). Z naraščajočo temperaturo viskoznost pada zaradi povečanega Brownovega gibanja osnovnih molekul. Čim bolj je tekočina viskozna, tem bolj je temperaturno občutljiva. Med newtonske sisteme sodijo idealne tekočine (voda, mineralna olja, organska topila itd.).

- nenevtonske, katerih viskoznost ni konstantna, lahko se spreminja glede na jakost in smer delovanja strižne sile, lahko je odvisna tudi od časa delovanja striga. Spreminjanje viskoznosti je posledica preurejanja notranje strukture sistema pod vplivom delovanja strižne sile. Nenevtonski sistemi lahko izkazujejo strižno odvisno upadanje viskoznosti ali pa, pod določenimi pogoji, strižno odvisno naraščanje viskoznosti - dilatanco. Nekateri stečejo šele potem, ko je presežena neka mejna strižna napetost. Sisteme lahko razdelimo na časovno neodvisne in časovno odvisne. Viskoznost časovno neodvisnih nenevtonskih sistemov je odvisna le od jakosti delovanja strižne sile. Med te sodijo psevdoplastični, plastični in dilatantni sistemi (slika 8a). Če pa se viskoznost sistema pri konstantnih strižnih pogojih spreminja tudi s časom in smerjo delovanja striga, take sisteme imenujemo časovno odvisni nenevtonski sistemi. Med te pa sodijo tiksotropni in reopeksni sistemi (slika 8b) (19,20). Med nenevtonske sisteme, največkrat psevdoplastične ali plastične, sodijo tudi geli.



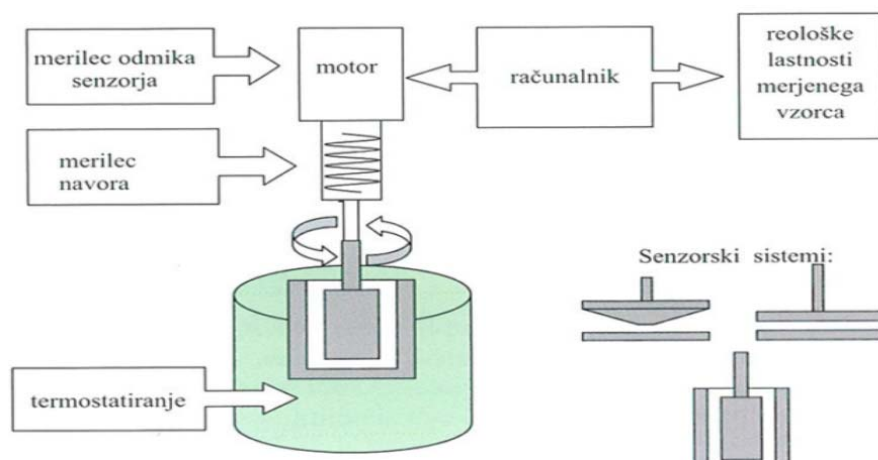
Slika 8: Viskoznostne krivulje za: a) newtonske (2), psevdoplastične (1) in dilatantne (3) sisteme in b) tiksotropne (A) in reopeksne sisteme (B) (20).

3.6.1. Naprave za proučevanje reološkega obnašanja sistemov

Proučevanje reološkega obnašanja sistemov omogočajo različne naprave, kot so viskozimetri in reometri. Za merjenje nenevtonskih sistemov morajo biti merilni deli geometrijsko opisljivi, ker enačbe za računanje viskoznosti temeljijo na njihovih dimenzijah. Uporabljamo t.i. absolutne naprave (rotacijski ter kapilarni reometri in viskozimetri) za katere lahko vrednosti strižnih hitrosti oziroma strižnih napetosti izračunamo s pomočjo merljivih in nastavljivih količin (navor, kotna hitrost) ter s pomočjo geometrijskih karakteristik senzorskega sistema.

Merilni sistem rotacijskega viskozimetra je sestavljen iz dveh delov, od katerih lahko eden miruje in drugi rotira, lahko pa oba dela rotirata. Njegova prednost je v tem, da lahko merimo v širokem območju strižnih sil. Omogoča merjenje viskoznosti v odvisnosti od časa ali od velikosti strižnih sil. Glede na način merjenja ločimo dva tipa naprav:

- rotacijske reometre z nastavljivo strižno hitrostjo, kjer je neodvisna spremenljivka strižna hitrost, merimo pa strižno napetost. Delujejo tako, da vzorec podvržemo strigu pri določeni strižni hitrosti ali strižni deformaciji in izmerimo odgovarajočo strižno napetost. Strižna hitrost je sorazmerna nastavljeni obodni hitrosti, strižna napetost pa je sorazmerna izmerjenemu navoru, ki je posledica upora snovi proti strigu.
- rotacijske reometre z nastavljivo strižno napetostjo, kjer je neodvisna spremenljivka strižna napetost, merimo pa strižno hitrost ali strižno deformacijo. Predstavljajo novejšo generacijo rotacijskih reometrov, ki v splošnem omogočajo natančnejše meritve v širšem območju delovanja striga (slika 9).



Slika 9: Shema rotacijskega reometra z nastavljivo strižno napetostjo in senzorski sistemi (19).

Rotacijski reometer z nastavljivo strižno napetostjo omogoča: merjenje lezenja in obnove, stacionarni strig z nastavljivo strižno napetostjo ali z nastavljivo strižno hitrostjo, oscilacijsko merjenje z nastavljivo strižno napetostjo ali z nastavljivo strižno deformacijo.

Prednosti reometra z nastavljljivo strižno napetostjo pred reometrom z nastavljljivo strižno hitrostjo so:

- izvajanje meritev pri zelo nizkih strižnih deformacijah pri stacionarnih in oscilatornih tokovnih pogojih,
- uporaba večjega števila merilnih tehnik,
- vrednotenje vzorcev v kontinuiranem procesu v zelo širokem območju strižne napetosti (19).

3.6.2. Senzorski sistemi pri rotacijskih reometrih

Primeren senzorski sistem rotacijskega reometra, ki omogoča uspešno merjenje reoloških lastnosti sistema, izberemo glede na vrsto sistema (viskoznost, sestavo, stopnjo strukturiranosti, hlapnost idr.), pogoje merjenja (destruktivni ali nedestruktivni strižni pogoji), temperaturno območje ter posamezne dodatne zahteve.

Glede na geometrijo ločimo:

❖ *Senzorski sistem koaksialnih valjev*

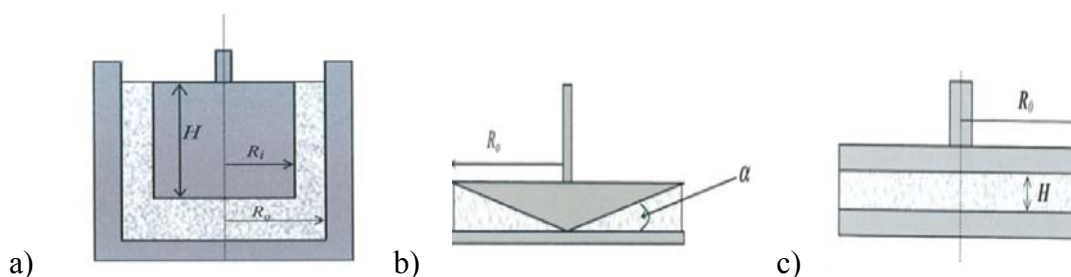
Proučevani vzorec se nahaja v reži med dvema valjema določene debeline in višine, pri čemer eden izmed njiju (notranji ali zunanji) rotira z določeno kotno hitrostjo, drugi pa miruje (slika 10a). Iz navora na notranji valj zaradi notranjega trenja vzorca pri pogojih strižnega toka ali strižne deformacije pri določeni strižni hitrosti lahko izračunamo strižno napetost.

❖ *Senzorski sistem stožca in plošče*

Vzorec se nahaja v reži med stožcem in ploščo (slika 10b). Prednosti sistema so enostavnost dostave vzorca in čiščenje ter potreba po majhni količini vzorca. Ena izmed velikih prednosti tega sistema je tudi, da je za majhne kote stožca strižna hitrost po celotni reži enaka, prav tako strižna napetost. Strižno napetost izračunamo s pomočjo merjenega in nastavljenega navora ob upoštevanju geometrijskih parametrov.

❖ *Senzorski sistem dveh vzporednih plošč*

Preiskovani vzorec se nahaja v reži med dvema ploščama z določenim polmerom ter razdaljo med njima (slika 10c). Od senzorskega sistema stožca in plošče se razlikuje po tem, da se strižna hitrost spreminja po polmeru plošče ter s tem po celotnem vzorcu. Iz merjenega oziroma nastavljenega navora na ploščo, ki je posledica upora vzorca pri rotaciji ene od plošč, izračunamo strižno napetost na obodu plošče ob znanih dimenzijah. Velikost reže med ploščama je nastavljiva kar omogoča določanje različnih območij strižnih hitrosti oziroma strižnih deformacij (visoko viskozne tekočine, koncentrirane suspenzije) (19).



Slika 10: Geometrija senzorskih sistemov: a) koaksialnih valjev, b) stožca in plošče, c) dveh vzporednih plošč (19).

4. NAMEN DELA

V obliki sodobnih oblog za celjenje ran, hidrogeli zagotavljajo vlažno mikrookolje kar pospeši celjenje kroničnih ran. Prav tako so eden izmed najprimernejših sistemov za ohranjanje stabilnosti in aktivnosti proteinov in so zato primerni kot dostavni sistemi le-teh.

Namen diplomske naloge bo izdelati hidrogel na osnovi Na-alginata, v katerega bomo vgradili čim večjo količino izločka ličink muh *Lucillia sericata*. Na Katedri za farmacevtsko tehnologijo že izdelujejo 6 %-Na-alginatni gel z 10 % vgrajenega izločka, kar pa še ne daje optimalnih rezultatov tako v smislu celjenja kot konsistence izdelka. Težave so imeli tudi z zagotavljanjem sterilnosti izdelka. Zato bo namen naloge razviti aseptični postopek izdelave gela, ki bo imel dovolj čvrsto konsistenco, da bo primerna za nanos na rano. Reološke lastnosti gela in vplive na njih bomo proučili z rotacijsko viskozimetrijo. Da bi v gel vgradili čim večjo količino izločka, bomo poskusili tudi z ionotropnim geliranjem Na-alginata. Primernost Na-alginatnega okolja za proteinske molekule, ki so pomembna sestavina tudi v izločku ličink muh (encimi, oligopeptidi) in zagotavljajo njegovo aktivnost, bomo preverili z vgradnjo modelnega proteina jajčnega albumina in preverili sproščanje le-tega iz Na-alginatnega hidrogela.

5. EKSPERIMENTALNO DELO

5.1. MATERIALI

❖ Materiali za izdelavo hidrogelov

- natrijev alginat (Protanal LF 10/60) FMC BioPolymer UK Ltd, UK
- glicerol Ph.Eur. 4th; Pharmachem Sušnik, Slovenija
- metilparaben; Merck, Nemčija
- dinatrijev tetraborat dekahidrat; Merck, Nemčija
- jajčni albumin (Albumin from chicken egg white, Grade II); Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- bidestilirana voda
- izloček ličink muh *Lucilia sericata*, UL-Biotehnoška fakulteta

❖ Reagenti za pripravo fosfatnega pufra in mobilne faze za HPLC-analizo

- natrijev klorid ($\geq 99,5$ %); Merck KGaA, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat brezvodni ($\geq 99,0$ %); Merck KGaA, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat ($\geq 99,5$ %); Merck KGaA, Nemčija
- kalijev klorid ($\geq 99,5$ %); Merck KGaA, Nemčija
- ortofosforjeva kislina 85 % (min. 85,0 %); Merck KGaA, Nemčija
- bidestilirana voda

5.2. NAPRAVE

- analitska tehtnica XS 205; Mettler Toledo, Švica
- parni sterilizator z vgrajeno vakumsko črpalko tip A – 21 CAVAK; Kambič Laboratorijska oprema d.o.o., Slovenija
- rotacijski viskozimeter Rheolab MC 100 UM, Physica, Avstrija
- liofilizator CHRIST® BETA 1 – 8K; Donaulab, Švica
- komora z laminarnim pretokom zraka (Laminar flow); Mobilien W 90; Waldner Laboreinrichtungen GmbH + Co, Nemčija

- avtomatske pipete BIOHIT (100 – 5000 µl), Finska
- pH meter Seven Multi mV/ORP; Mettler Toledo, Švica
- magnetno mešalo; IKA, Nemčija
- ultrazvočna kad Sonis 4; Iskra, Slovenija
- filtri Minisart hidrofilni (0,45 µm); Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija
- sistem za visokotlačno tekočinsko kromatografijo HPLC, Agilent Series 1100, Agilent Technologies; Nemčija; kolona Zorbax GF – 250 z velikostjo delcev 4 µm, notranjim premerom 9,4 mm in dolžino 250 mm

5.3. POSTOPKI IN METODE

5.3.1. Izdelava hidrogelov

Izdelali smo različne koncentracije (3, 6, 10, 12, 15, 20 in 25 %) Na-alginatnega gela po standardnem postopku izdelave hidrogela.

5.3.1.1. Standardni postopek izdelave hidrogela

V čašo smo natehtali predpisano količino prečiščene vode in ji med mešanjem s stekleno palčko dodali konzervans (0,12 g metilparabena / 100 g vzorca), da se raztopi. V pateno smo natehtali Na-alginat, dodali enako količino glicerola in homogeno zmešali oziroma raztrli s pestilom. Nato smo v pateno med stalnim mešanjem dodali vodo s konzervansom. Ko se je začel tvoriti gel, smo ga pokritega s parafilmom pustili nabrekati pri sobni temperaturi še 24 ur, vmes večkrat premešali.

Po 24 urah smo nastali homogeni hidrogel prenesli v 250-mililitrske laboratorijske plastenke in hidrogel sterilizirali v avtoklavu: 121 °C, 15 min, 1 bar nadtlaka.

5.3.2. Sterilizacija z nasičeno vodno paro

Sterilizacija je postopek, s katerim dosežemo sterilnost oziroma odsotnost vseh živih mikroorganizmov v ali na nekem materialu. To dosežemo z izpostavitvijo materiala

latentnim fizikalnim, kemijskim ali mehanskim učinkom. Poznamo številne sterilizacijske metode. Izbor ustrezne metode je pogojen z naravo materiala, ki ga je potrebno sterilizirati ter od priročnosti samega postopka.

Sterilizacija z nasičeno vodno paro pod tlakom ali avtoklaviranje je metoda izbire končne sterilizacije predvsem za vodo in vodne raztopine termostabilnih učinkovin v zaprtih posodah (ampule, stekleničke), kovinske, steklene in porcelanske instrumente, obvezilni material, obleke, perilo in gumijaste zamaške. Nasičena vodna para kot izvor toplote povzroči uničenje celic mikroorganizmov zaradi denaturacije kritičnih proteinov in nukleinskih kislin. Tako močan sterilizacijski učinek nastane zaradi masovnega prenosa toplote ob kondenzaciji pare na celico mikroorganizma. Prednosti vodne pare so:

- prodiranje oziroma hiter dostop pare do materiala, tudi znotraj por,
- hitro segrevanje materiala zaradi velike toplotne kapacitete pare,
- vlažna toplota oziroma kondenzat, ki nastane ob ohlajanju, dodatno prispeva k latentnosti zaradi koagulacije proteinov mikroorganizmov,
- ni rezidualne toksičnosti (21).

Sterilizacijo smo izvajali v avtoklavu, ki je sestavljen iz štirih poglavitnih enot: sterilizacijske komore, sistema za črpanje zraka iz komore, grelnega sistema za segrevanje med procesom sušenja in mikroprocesorskega nadzora. Sterilizacijska komora, rezervoar vode, vrata in pladnji so narejeni iz visokokvalitetnega nerjavečega jekla (slika 11) (22).



Slika 11: Avtoklav (22).

5.3.3. Vgradnja izločka ličink muh v hidrogel

Izdelali smo Na-alginatni gel po standardnem postopku izdelave hidrogela in ga avtoklavirali. Steklovino (steklene čaše in palčke) smo ovite v aluminijasti foliji sterilizirali in depirogenirali v sterilizatorju s suhim vročim zrakom 2 uri pri 230 °C. Izloček ličink muh smo v gel vgradili aseptično v komori z laminarnim pretokom zraka. Komoro smo aktivirali in izpostavili UV-svetlobi za 24 ur pred delom v njej. Pred delom v komori smo si roke umili z losionom za roke, sprali s prečiščeno vodo, obrisali in nadeli sterilne rokave in sterilne rokavice, pri tem pazili, da se z rokavicami nismo dotikali nobene površine. Nato smo v komoro prenesli v plastenkah avtoklaviran Na-alginatni gel, steklovino in izloček ličink muh. Pred vstavitvijo v komoro smo avtoklaviran gel v plastenkah, steklovino in izloček ličink muh v čaši, pokriti z aluminijasto folijo, poškropili z dezinfekcijsko raztopino za površine in materiale. Pri tem in med samim delom je bila UV-svetilka v komori ugasnjena.

Nato smo v sterilne steklene čaše natehtali hidrogel, v katerega smo postopoma med mešanjem s stekleno palčko dodajali izloček ličink muh.

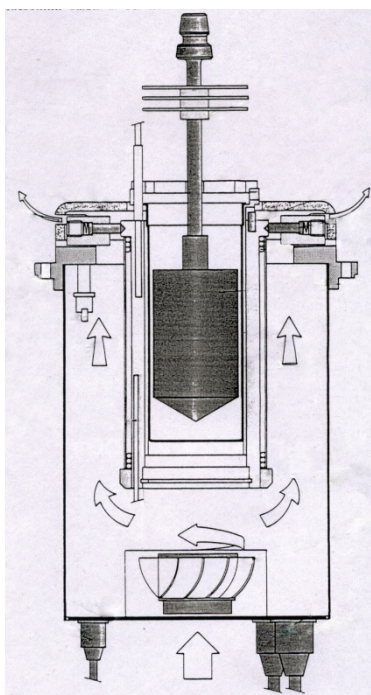
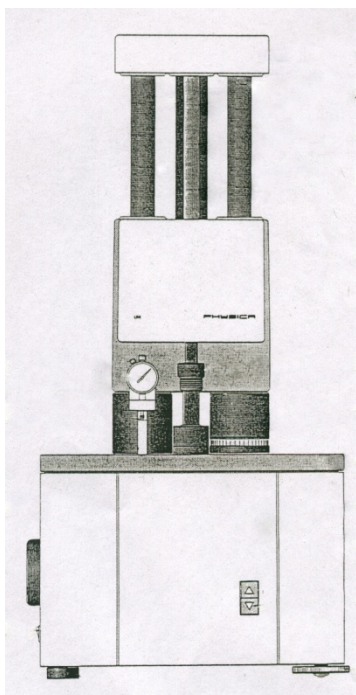
5.3.4. Reološko vrednotenje hidrogelov

Geli sodijo med newtonske sisteme, največkrat psevdoplastične ali plastične. Njihova viskoznost je odvisna od obremenitve, kar pomeni od delovanja mehanske sile na sistem, za nekatere sisteme pa tudi od časa delovanja le-te.

Rotacijski viskozimetri delujejo na principu, da na trdno rotirajoče telo (vreteno), potopljeno v tekoči ali poltrdni vzorec, deluje zaviralna sila, ki je premosorazmerna z viskoznostjo vzorca. Prednost rotacijskih viskozimetrov je v tem, da lahko merimo v širokem območju strižnih sil. Slabost metode je v njeni grobosti, saj pride med merjenjem do porušanja notranje strukture vzorca. Del energije, ki se porablja za premagovanje upora zaradi viskoznosti snovi se pretvarja v toploto. Ker je viskoznost odvisna od temperature, je nadzor le-te zelo pomemben (20).

5.3.4.1. Postopek merjenja viskoznosti

V kovinski valj z oznako Z3 smo nalili gel do oznake in ga postavili v spodnji del viskozimetra. Na zgornji del smo namestili vreteno in ga spustili oziroma potopili v gel (slika 12). Vsakokrat smo potrebovali približno 15 ml vzorca. Nato smo nastavili pogoje merjenja: strižna hitrost od 0 do 50 s^{-1} , čas meritve 100 s in temperaturo $23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorec smo temperirali 5 min in nato začeli z meritvijo. Merili smo odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti.



Slika 12: Shema rotacijskega viskozimetra (23).

5.3.5. Liofilizacija hidrogelov

Liofilizacija je postopek sušenja, pri katerem gre za odstranjevanje topila, običajno vode, iz zamrznjenega vzorca s sublimacijo. Vzorec pred sušenjem pretvorimo v trdno agregatno stanje (imobilizacija vzorca). Parametri, ki jih nastavimo, so temperatura police in tlak. Liofilizacijo moramo izvajati pod temperaturo tališča vzorca oziroma pri raztopinah pod temperaturo evtektične točke, da se vzorec ne tali. Debelina vzorca naj ne bi presegala 10 mm, saj se spodnje plasti sušijo zelo dolgo.

Proces liofilizacije traja vsaj 24 ur in poteka v treh fazah:

I. faza zamrzovanja

V tej fazi vzorce zamrzujemo, ponavadi pri atmosferskem tlaku, voda v vzorcih se spremeni v led. Na ta način vzorec imobiliziramo, da ohrani svojo strukturo, velikost in obliko.

II. primarno sušenje

To je najdaljša faza v procesu liofilizacije. Pri zelo znižanem tlaku in naraščajoči temperaturi police poteka sublimacija, pri čemer trdna snov (led) preide neposredno v plinasto stanje (paro). V tej stopnji odstranimo 95 % vsebnosti vode, in sicer nevezano vodo. Vzorec je postavljen na toplo podlago vendar se zaradi hladilnega efekta sublimacije ne tali. Struktura, ki smo jo dosegli z zamrzovanjem se ohrani.

III. sekundarno sušenje

Vzorec lahko po odstranitvi ledu še vedno vsebuje nekaj odstotkov vode, ki je nismo mogli odstraniti. Gre za kapilarno vodo, fizikalno vezano vodo, vodo za nabrekanje idr. Desorpcijo vezane vode dosežemo tako, da tlak še dodatno znižamo, temperaturo pa dvignemo na 15-40 °C. Sekundarno sušenje omogoča, da imamo na koncu v vzorcu prisotne le še 0,5 % vode, vendar pa še vedno ne moremo odstraniti kristalizacijske in kemijsko vezane vode (24).

Eksperimentalni pogoji:

Vzorce hidrogela smo v ustrezni steklovini pred liofilizacijo stehali, nato liofilizirali in ponovno stehali po liofilizaciji, pri čemer je prišlo do izgube mase zaradi odstranitve vode. Z vzorci smo postopali sledeče:

- vzorce smo zamrzili v zamrzovalniku pri -22 °C preko noči,
- temperaturo police smo nastavili na -25 °C,
- tlak med primarnim sušenjem je znašal 0,57 milibarov,
- proces liofilizacije smo izvajali na vzorcih približno enake mase in debeline (5-7 mm),
- liofilizacija je potekala 24 ur.

5.3.6. Rehidracija liofiliziranih vzorcev

Po končani liofilizaciji smo vzorce rehidrirali in jih na ta način ponovno rekonstruirali. Rehidracijo smo izvedli tako, da smo suhim liofiliziranim vzorcem s kapalko dodali toliko bidstilirane vode, da smo nadomestili odsublimirano vodo in jim povrnili prvotno maso. Vzorce smo potem pustili na sobni temperaturi in spremljali njihovo vračanje v prvotno stanje. Rehidracija je potekala spontano približno 2,5 ure (3 %-Na-alginatni gel) oziroma 5 ur (6 %-Na-alginatni gel) brez dodatnih posegov v sistem.

Rehidrirane vzorce smo reološko ovrednotili z rotacijsko viskozimetrijo.

5.3.7. Preskus sproščanja jajčnega albumina iz Na-alginatnega gela

Za ugotavljanje primernosti Na-alginatnega gela za vgradnjo proteinov smo vanj vgradili modelni protein – jajčni albumin.

5.3.7.1. Priprava fosfatnega pufra PBS

Fosfatni pufer predstavlja fiziološko okolje za jajčni albumin, v katerem je zagotovljena njegova stabilnost. Zato smo se odločili, da za preskus sproščanja jajčnega albumina iz Na-alginatnega gela uporabimo PBS kot vodno fazo pri izdelavi hidrogelov. Na tehtnici smo zatehtali 0,2 g KCl, 0,24 g KH_2PO_4 , 1,44 g Na_2HPO_4 ter 8,0 g NaCl. Soli smo kvantitativno prenesli v 1000 ml bučko in dodali toliko bidestilirane vode, da je gladina segala malo pod oznako na bučki. Ko so se soli raztopile, smo s 85 %-ortofosforjevo kislino umerili pH raztopine na vrednost $7,0 \pm 0,05$, nato pa bučko dopolnili z bidestilirano vodo do oznake.

5.3.7.2. Izdelava hidrogelov z vgrajenim jajčnim albuminom

Izdelali smo 6 %- in 12 %-Na- alginatni gel po standardnem postopku izdelave hidrogela, le da smo kot vodno fazo uporabili PBS. Prav tako smo kot konzervans uporabili dinatrijev tetraborat dekahidrat namesto metilparabena. Razlog zamenjave konzervansa bo podrobneje opisan v poglavju 6.2.2. V pateni smo ustrezno količino Na-alginata raztrli z

enako količino glicerola ter dodali ustrezno količino PBS, v katerem smo predhodno raztopili dinatrijev tetraborat dekahidrat (0,1 g Na-tetraborata / 100 g vzorca) in toliko jajčnega albumina, da smo dobili 1,0 % koncentracijo jajčnega albumina v gelu. Pateno smo pokrili s parafilmom in pustili nabrekati pri sobni temperaturi 24 ur, vmes večkrat premešali. Na enak način smo izdelali tudi slepe vzorce, hidrogela brez jajčnega albumina.

5.3.7.3. Izvedba sproščanja jajčnega albumina iz hidrogela

Model sproščanja smo povzeli po diplomskem delu (26). V 50-mililitrske steklene čaše smo natančno zatehtali približno 5 g hidrogela ter naj odmerili 10 ml PBS. Čaše, ki so stale pri sobni temperaturi in zaščitene pred svetlobo, smo pokrili s parafilmom. Sproščanje smo izvajali 90 ur, pri čemer smo vzorce (2,5 ml) odvezemali s sredine medija ob časih 0, 0,5, 1, 2, 4, 16, 24 in 90 ur po začetku sproščanja ter jih nadomeščali z enakim volumenom svežega pufra. Odvzete vzorce smo filtrirali skozi 0,45 µm-filter in jih do analize zamrznili. Zaostankom po sproščanju smo dodali še 30 ml PBS in tako hidrogela z mešanjem 2 uri na magnetnem mešalu raztopili v vsega skupaj 40 ml PBS. Na ta način smo hoteli določiti dejansko maso vgrajenega jajčnega albumina v hidrogelih in hkrati ovrednotiti homogenost porazdelitve jajčnega albumina med paralelkami. Preskus sproščanja smo izvedli tudi na hidrogelih brez vgrajenega jajčnega albumina. Vsako sproščanje je potekalo v treh paralelkah.

5.3.7.4. Priprava mobilne faze in analiza vzorcev s HPLC

Postopek za določanje količine jajčnega albumina je bil povzet po diplomskem delu (26). Uporabili smo HPLC-analitiko. Mobilno fazo smo pripravili tako, da smo 15,2 g NaCl in 5,68 g Na₂HPO₄ raztopili v približno 1900 ml bidestilirane vode in po umerjanju pH s 85 %-ortofosforjevo kislino na vrednost $7,00 \pm 0,05$ dopolnili z bidestilirano vodo do 2000 ml.

Pogoji HPLC:

- kromatografska kolona

Uporabili smo kolono ZORBAX GF – 250 z dolžino 250 nm, notranjim premerom 9,4 mm in velikostjo delcev 4 μ m. Primerna je za vodotopne makromolekule z molekulsko maso 4 – 400 kDa. Ločevanje poteka na osnovi gelske izključitvene filtracije (glede na velikost molekul).

- volumen avtomatsko injiciranega vzorca: 10 μ l
- pretok mobilne faze: 1 ml/min
- termostat 23 °C; temperatura vzorcev 20 °C
- UV detekcija pri valovni dolžini 210 nm
- čas analize 15 min

5.3.7.5. Umeritvena premica za jajčni albumin

Umeritveno premico smo določili na osnovi pet različnih koncentracij jajčnega albumina v mobilni fazi (0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 2,00 mg/ml). V 100 ml-bučko smo natančno natehtali približno 200 mg jajčnega albumina, dodali mobilno fazo do oznake in pustili mešati na magnetnem mešalu. Po 24 urah smo osnovno raztopino jajčnega albumina filtrirali skozi 0,45 μ m-filter in z mobilno fazo redčili na ustrezne koncentracije. Tako pripravljenim raztopinam smo s HPLC-analitiko določili koncentracijo jajčnega albumina.

6. REZULTATI IN RAZPRAVA

6.1. OPTIMIZACIJA POSTOPKA IZDELAVE HIDROGELOV

Namen diplomske naloge je bil izdelati čim nižjo koncentracijo Na-alginatnega gela, v katero bi lahko vgradili čim večjo količino izločka ličink muh ter pri tem zagotovili primerne reološke lastnosti, kar pomeni, da po aplikaciji na rano gel na njej ostane in zagotovi dober in tesen stik. Nanos samega izločka na rano ni primeren, saj je tekoč in iz rane prehitro steče. Prav tako pa smo morali zagotoviti sterilnost končnega izdelka.

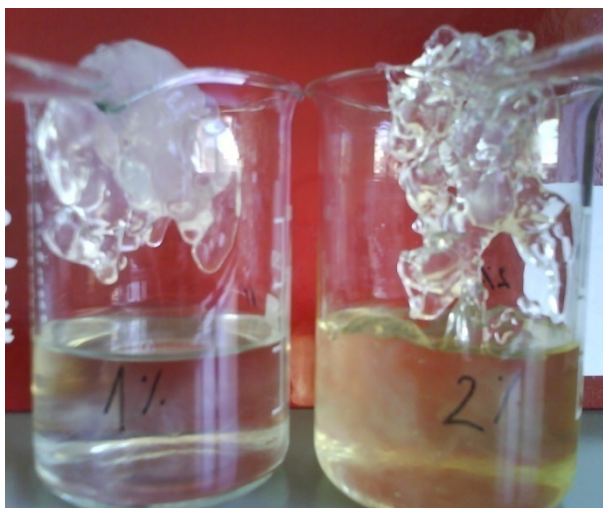
Na Katedri za farmacevtsko tehnologijo so pred tem izdelovali 6 %-Na-alginatni gel z vgrajenimi 10 % izločka po postopku, kot je opisano v poglavju 5.3.3.

Če bi v 6 %-Na-alginatni gel poskusili vgraditi večjo količino izločka, bi se njegova tekstura zelo spremenila (postal bi tekoč). Zato smo poskusili izdelati gel s čim višjo koncentracijo Na-alginata, v katerega bi nato vgradili čim večjo količino izločka muh, nastali izdelek pa bi imel približno enake reološke lastnosti kot 6 %-gel z 10 % izločka.

Izdelali smo različne koncentracije Na-alginatnega gela (10, 12, 15, 20 in 25 %) po standardnem postopku izdelave hidrogela kot je opisno v poglavju 5.3.1 in ugotovili, da je 12 % Na-alginata največja koncentracija, kjer se še tvori homogen gel. Le-ta po 24 urah sicer še ni bil popolnoma homogen, vendar pa smo ga lahko avtoklavirali in zagotovili njegovo sterilnost in homogenost. Koncentracije, višje od 12 %, so takoj (20 % in 25 %) ali po nekaj urah (15 %) tvorile pregoste zmesi, v katere je bilo nemogoče enakomerno porazdeliti oziroma vmešati vodo. Koncentracija Na-alginata je bila previsoka oziroma vode prenizka, da bi Na-alginat postopoma nabrekal in da bi tako nastal homogen gel. Prav tako smo ugotovili, da zaradi premalo vode sterilizacija z avtoklaviranjem ni bila uspešna, saj je bilo na bolj koncentriranih Na-alginatih kmalu opaziti razrast mikrobioloških kolonij.

Nato smo poskusili izdelati primerno hidriran gel s čim nižjo koncentracijo Na-alginata in pri tem izkoristiti ionotropno geliranje s pomočjo 0,1 M raztopine CaCl_2 .

Izdelali smo 1 %- in 2 %-Na-alginatni gel po standardnem postopku izdelave hidrogela. Ločeno smo pripravili 0,1 M raztopino CaCl_2 . Gel in raztopino smo ohladili na 4 °C. V 250-millitrski steklene čaše smo natančno zatehtali približno 120 g gela. V 1 %-Na-alginatni gel smo med mešanjem na magnetnem mešalu postopoma (po približno 5 ml) dodajali približno 20 ml 0,1 M raztopine CaCl_2 . V 2 %-Na-alginatni gel pa 15 ml 0,1 M raztopine CaCl_2 . Takoj po dodatku prvih 5 ml pa so se v gelu začele tvoriti nitke, ki so se po dodatku naslednjih volumnov raztopine CaCl_2 med neprestanim mešanjem na magnetnem mešalu povezale v gelasto, kepi podobno strukturo. Na-alginat premrežen s CaCl_2 se izloči iz gela in dobili smo kompaktno gelasto strukturo v vodi (slika 13). Očitno je bilo premreženje pregosto, kar pomeni, da so verige med posameznimi točkami premreženja kratke in bolj rigidne, zato tudi hidrogel izkazuje trdnejšo strukturo, ki iztisne ujeto vodo.



Slika 13: 1 %- in 2 %-Na-alginatni gel, premrežen z CaCl_2 .

Postopek dodajanja CaCl_2 smo spreminjali na različne načine, prav tako količine dodanega CaCl_2 , vendar naknadno premreženje gela ni dalo zadovoljivih rezultatov, zato smo postopek ionotropnega geliranja opustili. Uporabljen Na-alginat je imel očitno zelo veliko vsebnost G-monomernih enot, kar je onemogočilo pripravo homogeno geliranega Na-alginata. V nadaljevanju smo se zato odločili za izdelavo čim višje koncentracije Na-alginatnega gela, ki bi po standardnem postopku izdelave hidrogela dala sterilen izdelek primernih reoloških lastnosti, v katerega bi lahko vgradili čim večjo količino izločka ličink muh.

6.1.1. Vgrajevanje izločka ličink muh v hidrogel in njegov vpliv na reološke lastnosti izdelka

Po standardnem postopku smo izdelali 10 %- in 12 %-Na-alginatni hidrogel, v katerega smo aseptično postopoma med mešanjem s stekleno palčko dodali določeno količino izločka ličink muh, kot je opisano v poglavju 5.3.3.

V 150-mililitrsko stekleno čašo smo natančno zatehtali približno 30 g 10 %-Na-alginatnega gela in postopoma (po 5 g) dodali natančno približno 20 g izločka. Tako smo dobili izdelek, ki je vseboval 6 % Na-alginata in 40 % izločka.

Po drugi strani pa smo v natančno približno 20 g 12 %-Na-alginatnega gela postopoma dodali natančno približno 30 g izločka tako, da smo v končni fazi dobili izdelek s 5 % Na-alginata v katerem je bilo 60 % izločka.

Na Katedri za farmacevtsko tehnologijo so kot rečeno pred tem izdelovali 6 %-Na-alginatni hidrogel z 10 % izločka. Na opisan način smo količino vgrajenega izločka povečali na 40 % oziroma 60 %, pri tem da je količina Na-alginata ostala skoraj nespremenjena.

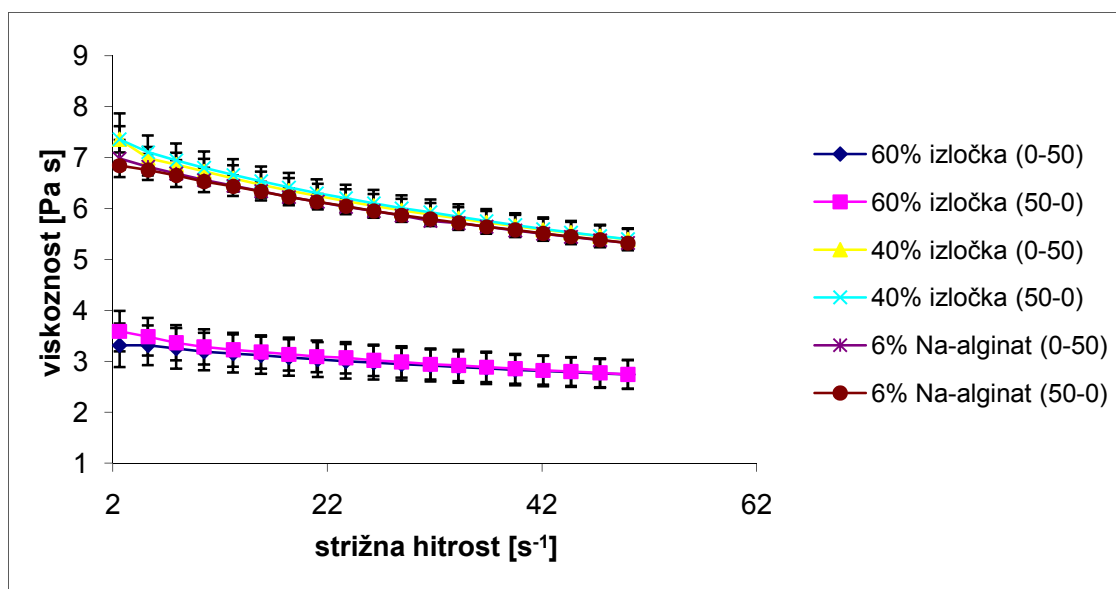
V gel pa nismo želeli vključiti le čim več izločka, pač pa smo pri tem želeli ohraniti njegove reološke lastnosti. Zato smo najprej pomerili viskoznost 6 %-Na-alginatnega gela izdelanega po standardnem postopku izdelave hidrogela in ugotovili, da viskoznost z naraščanjem strižne hitrosti enakomerno pada, kar je lastnost psevdoplastičnih sistemov (slika 14).

Viskoznost psevdoplastičnih sistemov je v območju zelo nizkih strižnih hitrosti konstantna. V območju »srednjih« strižnih hitrosti viskoznost enakomerno upada z naraščanjem strižnih hitrosti in doseže neko konstantno vrednost pri zelo visokih strižnih hitrostih. Razlog za takšno obnašanje je ureditev strukturnih elementov v smeri toka kot posledica striga oziroma prehoda v bolj urejeno stanje (npr. polimerni klobčič se raztegne), ali zmanjševanje efektivnega hidrodinamskega volumna delcev zaradi odstranjevanja solvatnih plasti ob delcu (19,20).

Viskoznost hidrogela s 40 % izločka in 6% Na-alginata se ohrani, kar je vidno iz viskoznostnega diagrama (slika 14), saj se krivulje povsem pokrivajo. To pomeni, da smo iz 10 %-Na-alginatnega gela po vgraditvi 40 % izločka v končni fazi dobili 6 %-Na-alginatni gel in da izloček ne vpliva na strukturo samega Na-alginata. Če bi izloček vplival na strukturo Na-alginata, bi to najverjetneje opazili kot povečanje ali zmanjšanje viskoznosti vzorca.

Nato smo proučevali reološke lastnosti gela z vgrajenimi 60 % izločka v 12 %-Na-alginatni gel. Nastali izdelek je v končni fazi vseboval 5 % Na-alginata. Krivulja odvisnosti viskoznosti od strižne hitrosti je dvakrat nižja od krivulje odvisnosti viskoznosti od strižne hitrosti za 6 %-Na-alginatni gel z ali brez izločka (slika 14). Opazimo, da je viskoznostna krivulja izdelka s 5 % Na-alginata in 60 % izločka bolj podobna krivulji za newtonske sisteme kot pa za psevdoplastične, čeprav je razlika v koncentraciji Na-alginata med merjenimi izdelki le 1 %. Prav tako, se je tekstura gela spremenila (postal je bolj tekoč), vendar je bil izdelek še vedno primeren za mazanje, oziroma je po nanosu na kožo na njej ostal.

Ugotovili smo, da 40 % izločka na viskoznost 6 %-Na-alginatnega gela nima vpliva, manjši delež Na-alginata pa zelo zniža viskoznost hidrogela. Na ta način smo dokazali, da lahko izdelamo hidrogel z zelo visokim odstotkom vgrajenega izločka in pri tem ohranimo primerne reološke lastnosti za nanos izdelka na kožo in tako zagotovimo dober in tesen stik s kožo.



Slika 14: Viskoznostni diagram: odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti za 6 %-Na-alginatni gel s 40 % izločka in 5 %-Na-alginatni gel s 60 % izločka.

6.1.2. Vpliv postopka sterilizacije na reološke lastnosti hidrogela

12 %-Na-alginatni gel, pripravljen po standardnem postopku izdelave hidrogela, smo sterilizirali z avtoklaviranjem in v aseptičnih pogojih vgradili 60 % izločka ličink muh. Postopek je bil relativno dolgotrajen, zato smo poskusili pripraviti sterilni izdelek še na kakšen drug način in uporabiti še druge metode sterilizacije. Najenostavnejše bi bilo seveda avtoklavirati gel z vgrajenim izločkom, vendar ker je izloček termolabilen to ni bilo mogoče. Zato smo morali razviti postopek sterilizacije hidrogela posebej in nato aseptično vgraditi izloček ličink muh. Izdelke so na Biotehnoški fakulteti nacepili na gojišče in preverili njihovo sterilnost. Zanimalo nas je tudi, kako postopki sterilizacije vplivajo na reološke lastnosti izdelka. Ker je bil izloček ličink muh predrag, smo ga v naslednjih poskusih nadomestili z vodo.

6.1.2.1. Sterilizacija z avtoklaviranjem

Najprej smo poskušali optimizirati postopek avtoklaviranja in aseptičnega prenosa avtoklaviranih plastenkov v komoro s laminarnim pretokom zraka. Pri tem smo strmeli za tem, da bi bilo potrebnih čim manj vmesnih korakov prenašanja materiala iz posode v posodo. Na-alginatni gel smo zato poskusili pripraviti brez predhodnega nabrekanja direktno v plastenkah, v katerih smo hidrogel sicer avtoklavirali.

V 250-mililitrsko laboratorijsko plastenko smo tako natehtali toliko Na-alginata da smo v končnem izdelku dobili 5 % gel. Na-alginatu smo dodali enako količino glicerola in s stekleno palčko premešali, da se Na-alginat omoči. Nato smo dodali 10 % predpisane količine bidestilirane vode, v kateri smo predhodno raztopili konzervans, premešali in avtoklavirali. Posebej v laboratorijski plastenki pa smo avtoklavirali preostalo količino bidestilirane vode, potrebne za vgradnjo v izdelek (namesto izločka iz ličink muh). Po avtoklaviranju, ko so se bidestilirana voda in zmes Na-alginata z glicerolom, konzervansom in vodo ohladili po približno 3 urah, smo laboratorijske plastenke prenesli v komoro s laminarnim pretokom zraka po postopku, opisanem v poglavju 5.3.3. Sterilizirano vodo in Na-alginat smo aseptično združili v komori s laminarnim pretokom zraka tako, da smo vodo dodajali postopoma po 10 g med mešanjem s stekleno palčko. Platenko smo zaprli in pustili nabrekati v komori pod prižgano UV-svetilko.

Po 14 urah je bila na dnu plastenke vidna gmota gela, ki se je po mešanju gela s stekleno palčko razbila v drobne, kroglaste nepravilne oblike delcev še nehidratiranega gela. Gel je bil kljub nehomogenosti poslan na preverjanje sterilnosti na Biotehnološko fakulteto. Iskazalo se je, da je ustrezno sterilen, vendar žal tudi po daljšem nabrekanju nehomogen. Zato smo takšen postopek izdelave hidrogela opustili, saj kljub manjši izpostavitvi nesterilnem okolju ni omogočal izdelave homogenega izdelka.

Postopek izdelave smo zato pustili tak, kot je opisan v poglavju 5.3.3. in vzorce še naprej pošiljali na preverjanje sterilnosti na Biotehnološko fakulteto.

6.1.2.2. Suha sterilizacija

Poskusili smo tudi tako, da smo Na-alginat predhodno sterilizirali s suhim zrakom 2 uri pri 160 °C. Nato smo izdelali 6 %-Na-alginatni gel po standardnem postopku izdelave hidrogela, le da gela po 24 urnem nabrekanju nismo avtoklavirali. Na-alginat je po

sterilizaciji s suhim zrakom spremenil svoje fizikalne lastnosti (barvo iz svetlo rumene v rahlo rjavo, vonj je spominjal na zažgan sladkor), večji del prahu je bil zbit v kepo, ki se je z močnim stresanjem razbila. Zaradi opaznih spremenjenih fizikalnih lastnosti izhodnega materiala, se je ta postopek izkazal za neprimerne.

6.1.2.3. Sterilizacija z UV-sevanjem

Postopek priprave smo znova spremenili in sicer z namenom njegove poenostavitve ob sočasnem zagotavljanju kakovosti končnega izdelka.

Ustrezno količino Na-alginata in konzervansa smo natehtali v petrijevke v tanki plasti in prenesli v komoro s laminarnim pretokom zraka ter pustili 18 ur obsevati pod UV-svetlobo. Ta način je primeren za sterilizacijo površin. Ustrezno količino bidestilirane vode in glicerola smo natehtali v laboratorijske platenke in jih avtoklavirali. Steklovino (stekleno čašo in palčko) in žličko smo ovite v aluminijasti foliji sterilizirali v sterilizatorju suhim vročim zrakom 2 uri pri 230 °C in nato prenesli v komoro s laminarnim pretokom zraka po postopku, opisanem v poglavju 5.3.3. Enako smo postopili pri prenašanju stekleničk z glicerolom in bidestilirano vodo. Pri tem je bila UV-svetilka ugasnjena. Potem smo UV-svetilko spet prižgali in vse pustili še 10 minut obsevati.

Nato smo začeli s pripravo hidrogela.

V 250-mililitrsko stekleno čašo smo natehtali predpisano količino bidestilirane vode in v njej raztopili konzervans ter dodali glicerol. V to raztopino smo postopoma med mešanjem s stekleno palčko dodali toliko Na-alginata, da smo v končni fazi dobili 5 %-Na-alginatni gel. Čašo smo pokrili z aluminijasto folijo in gel pustili 9 ur nabrekati ob prižgani UV-svetilki. Nastali gel je bil homogen in svetlo rumene barve in se je po barvi razlikoval od gela izdelanega po standardnem postopku z avtoklaviranjem Na-alginata. Slednji je bil temno rumene do rjave barve. Gel pripravljen s sterilizacijo pod UV-svetlobo smo prenesli v laboratorijsko platenko, ki smo jo predhodno sterilizirali v avtoklavu in poslali na preverjanje sterilnosti. Izkazalo se je, da je tudi tako izdelan gel sterilen.

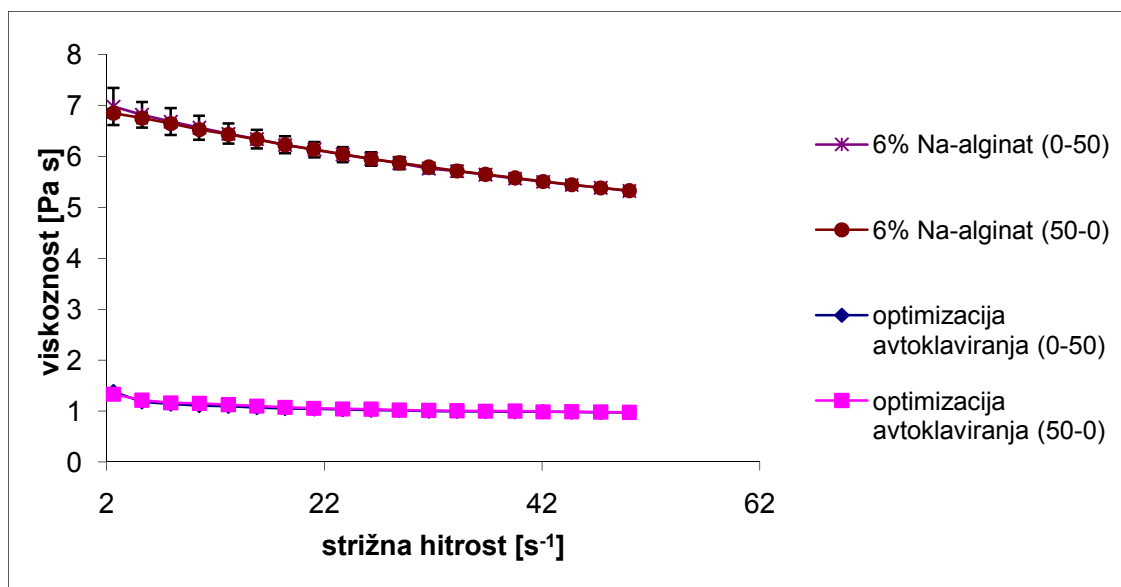
Vse tri hidrokele smo tudi reološko ovrednotili.

6.1.2.4. Vpliv sterilizacije na reološke lastnosti hidrogela iz Na-alginata

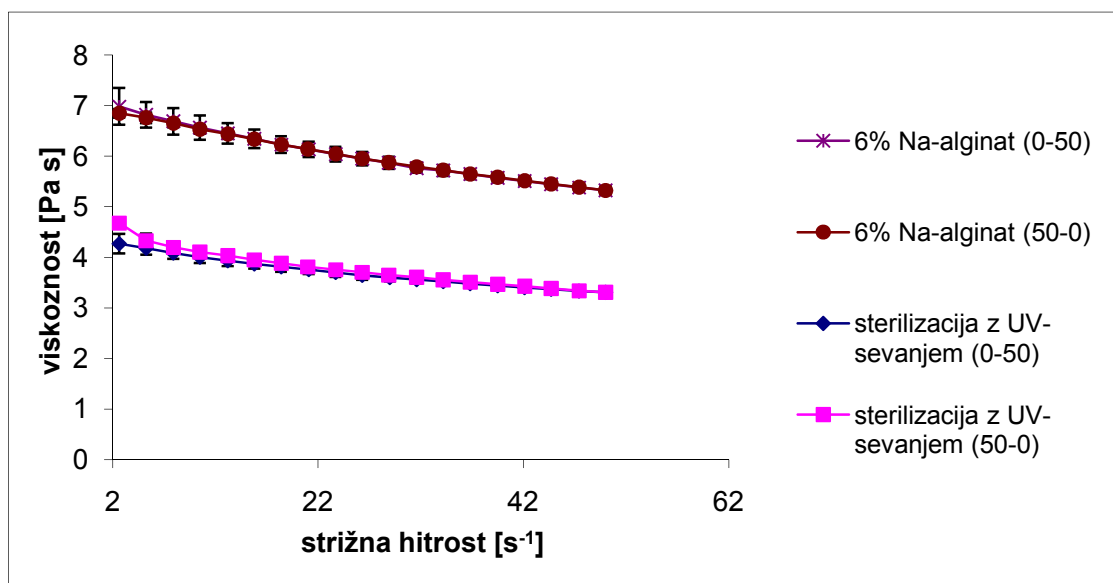
Z optimizacijo avtoklaviranja smo zelo vplivali na reološke lastnosti hidrogela. 6 %-Na-alginatni gel, sicer izdelan po standardnem postopku, vendar brez avtoklaviranja ima viskoznost približno petkrat višjo kot je viskoznost avtoklaviranega Na-alginatnega gela, kar je vidno iz viskoznostnega diagrama (slika 15). Poudariti je sicer treba, da se razlikujeta gela tudi po koncentraciji Na-alginata in sicer je v steriliziranem hidrogelu 5 % Na-alginata. Že prej pa smo ugotovili, da 1 % razlika v količini Na-alginata za 50 % spremeni viskoznost, preostalo razliko pa lahko pripišemo postopku avtoklaviranja. Kot kaže, postopek avtoklaviranja prekine določene interakcije polimerov med seboj ali z medijem, kar vodi v manjši notranji upor ob obremenitvi in posledično je viskoznost nižja. Krivulja odvisnosti viskoznosti od strižne hitrosti je bolj podobna viskoznostni krivulji za newtonske sisteme kot pa za psevdoplastične sisteme (slika 8a).

Pri postopku suhe sterilizacije je Na-alginat izgubil sposobnost nabrekanja, saj je viskoznost nižja kot v primeru avtoklaviranega izdelka (slika 17). Krivulja odvisnosti viskoznosti od strižne hitrosti je znova bolj podobna viskoznostni krivulji za newtonske sisteme (slika 17). Torej postopek suhe sterilizacije ni primeren za tvorbo gela primernih reoloških lastnosti.

V primerjavi s postopkom optimizacije avtoklaviranja in suhe sterilizacije, pa smo pri postopku sterilizacije z UV-sevanjem dobili gel ustreznih reoloških lastnosti, saj je bila viskoznost tako izdelanega gela precej višja od obeh prej opisanih sistemov (slika 17). Krivulja odvisnosti viskoznosti od strižne hitrosti je podobna obliki za psevdoplastične sisteme (slika 8a). V primerjavi s 6 %-Na-alginatnim gelom izdelanem po standardnem postopku izdelave hidrogela vidimo zmanjšanje viskoznosti gela, kar je tudi pričakovano, saj smo v končni fazi dobili 5 %-Na-alginatni gel (slika 16). S tem postopkom sterilizacije bi uspeli vgraditi celo 90 % izločka, kar smo dokazali v poskusu z uporabljenno bidestilirano vodo.



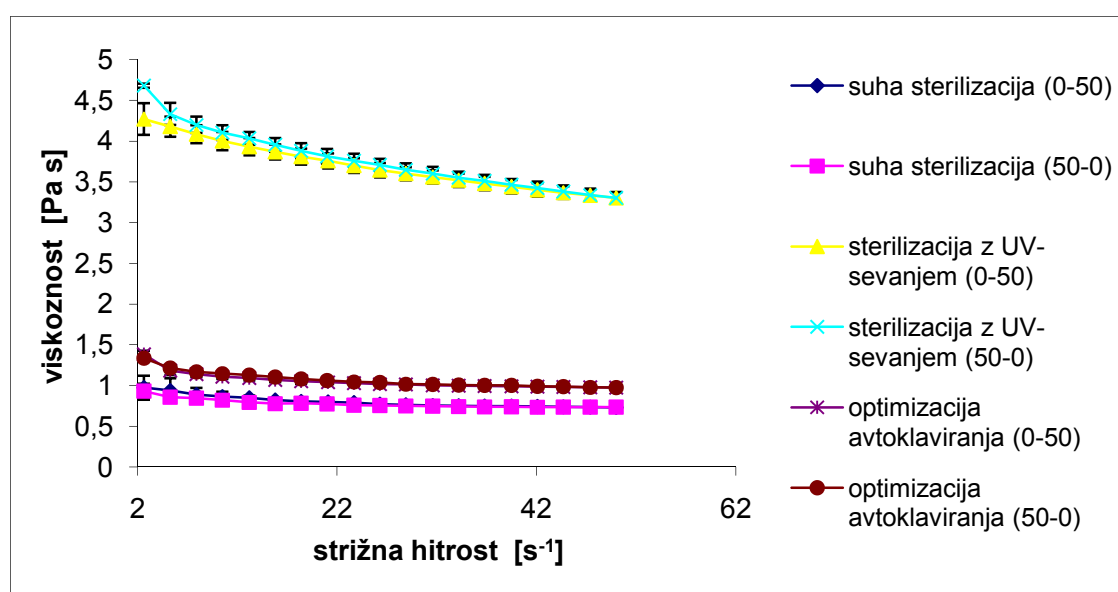
Slika 15: Viskoznostni diagram: odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti za 6 %-Na-alginatni gel izdelan po standardnem postopku brez avtoklaviranja in 5 %-Na-alginatni gel izdelan po postopku optimizacije avtoklaviranja.



Slika 16: Viskoznostni diagram: odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti za 6 %-Na-alginatni gel izdelan po standardnem postopku in 5 %-Na-alginatni gel izdelan po postopku sterilizacije z UV-sevanjem.

Sprememba postopka sterilizacije bistveno vpliva na reološke lastnosti hidrogela. Postopek avtoklaviranja in suhe sterilizacije sta zelo porušila strukturo gela, medtem ko smo s postopkom sterilizacije z UV-sevanjem dobili gel primernih reoloških lastnosti (slika 17),

ki je izkazoval tudi ustrezno sterilnost. To pomeni, da bi za izdelavo sterilnega izdelka lahko uporabili tudi alternativno metodo UV-sterilizacije, vendar pa menimo, da le-ta ni dovolj zanesljiva, saj deluje res le na površini. Tako bi bilo vedno izrednega pomena, da bi pred izdelavo Na-alginat razprostli po zelo tanki in veliki površini, da bi bila metoda učinkovita. Še vedno pa bi v avtoklavu morali sterilizirati vodo, kar vpliva na dolžino in kompleksnost postopka izdelave. Z avtoklaviranjem sicer res porušimo strukturo gela, vendar pa je to ena izmed farmakopejskih metod končne sterilizacije in je zato metoda izbora za sterilizacijo hidrogelov, kar je ključnega pomena pri izdelavi oblog za vlažno celjenje ran.



Slika 17: Viskoznostni diagram: odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti za gel steriliziran s postopkom suhe sterilizacije, sterilizacije z UV-sevanjem in z optimizacijo avtoklaviranja.

6.1.3. Vpliv liofilizacije na reološke lastnosti hidrogela

Hidrogeli vsebujejo veliko količino vode in zato predstavljajo ugoden medij za razvoj mikroorganizmov, s tem se tudi zmanjša stabilnost izdelka, kar omeji njihov rok uporabnosti.

Da bi povečali mikrobiološko stabilnost hidrogelov, jih lahko pretvorimo v suho obliko z liofilizacijo. Z liofilizacijo odstranimo vodo in s tem osnovni pogoj za rast mikroorganizmov. Posledično podaljšamo rok uporabnosti izdelkov.

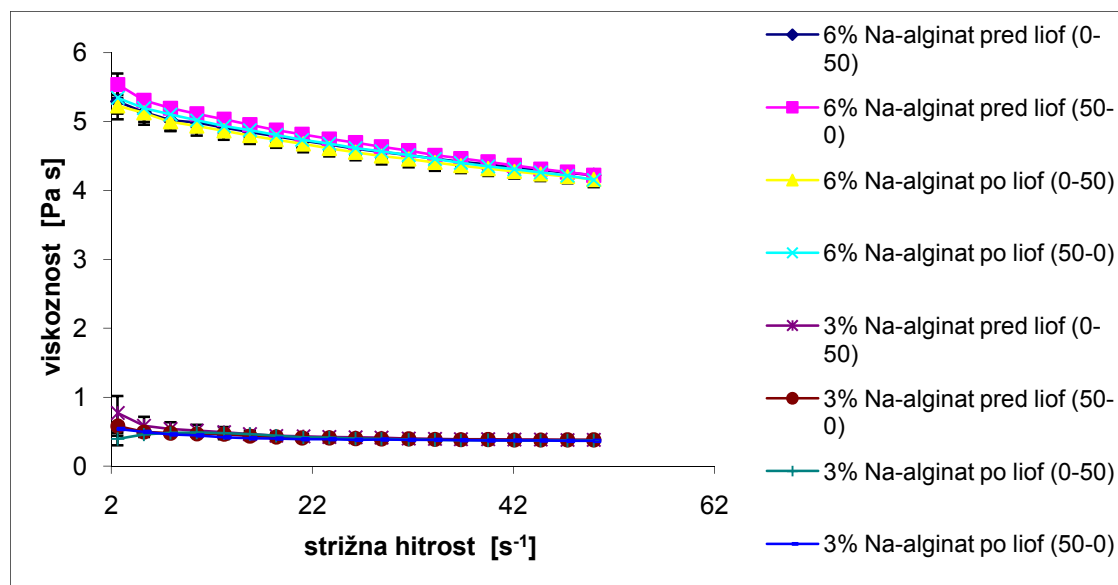
Preverili smo, kako postopek liofilizacije vpliva na reološke lastnosti hidrogela in sicer na 3 %- in 6 %-Na-alginatnem gelu, izdelanem po standardnem postopku izdelave hidrogela brez avtoklaviranja. Po nabrekanju alginata smo v 400 ml-steklene čaše prenesli enakomerno količino gela tako, da smo dobili plast debelo 5-7 mm in čaše pokrite s parafilmom dali v zamrzovalnik. Po 24-ih urah smo vzorce liofilizirali po postopku, opisanem v poglavju 5.3.5.



Slika 18: Liofiliziran 3 %- (levo) in 6 %- (desno) Na-alginatni gel

Liofiliziran gel (slika 18) smo rehidrirali tako, da smo s kapalko postopoma dodali toliko vode, kot smo jo v postopku liofilizacije odstranili. Čaše smo pokrili s parafilmom in pustili nabrekati pri sobni temperaturi. Po spontani rehidraciji se je struktura hidrogela povrnila.

3 % Na-alginatni gel se je rehidriral v 2,5 urah, 6 % pa v 5 urah. Dvakrat večja koncentracija torej potrebuje dvakrat daljši čas za rehidracijo. Sama liofilizacija pa ne vpliva na reološke lastnosti hidrogela, kar je vidno tudi iz viskoznostnega diagrama (slika 19). Krivulji odvisnosti viskoznosti od strižne hitrosti pred in po liofilizaciji se tako za 3 %- kot 6 %-vzorec skoraj popolnoma prekrivata. To pomeni, da bi lahko podaljšali stabilnost izdelka z liofilizacijo, pri tem pa bi ohranili njegove reološke lastnosti.



Slika 19: Viskoznostni diagram: odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti za 3 %- in 6 %- Na-alginatni gel pred in po liofilizaciji.

6.2. SPROŠČANJE JAJČNEGA ALBUMINA IZ HIDROGELA

Izloček, ki smo ga vgradili v hidrogel vsebuje različne encime, proteine. Le-ti morajo priti iz hidrogela v rano. Ker je izloček relativno drag in analitike določanja sproščenih snovi še ni, smo sproščanje proteinov izločka simulirali z vgrajenim jajčnim albuminom. Hidrogele smo izdelali po postopku opisanem v poglavju 5.3.7.1 in v njih vgradili jajčni albumin kot modelni protein. Najprej smo kot konzervans uporabili metilparaben, vendar pa smo ugotovili, da pri pripravi raztopine jajčnega albumina koncentracije 1 mg/ml v raztopini konzervansa in PBS pride do tvorbe oborine, kar kaže na inkompatibilnost metilparabena in jajčnega albumina. Zato smo se odločili za zamenjavo konzervansa. Uporabili smo dinatrijev tetraborat dekahidrat, ki je uporabljen tudi pri diplomskem delu po katerem smo povzeli model za sproščanje.

6.2.1. Določitev enačbe umeritvene premice

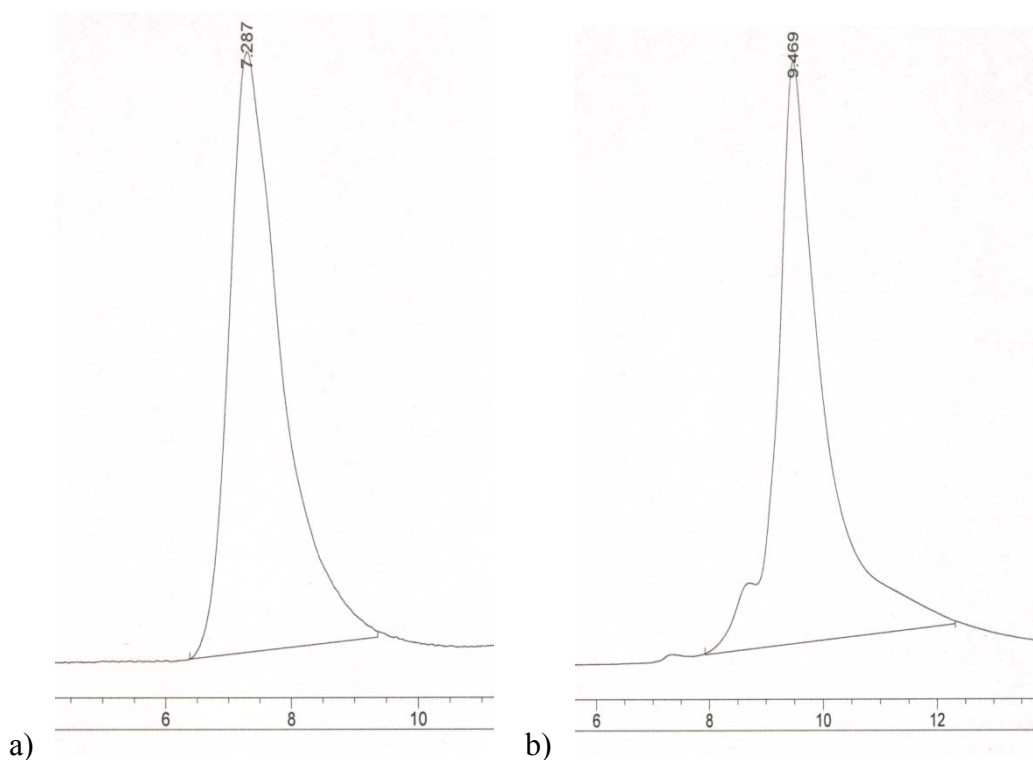
S HPLC-analitiko smo določali koncentracijo sproščenega jajčnega albumina po postopku, kot je opisano v poglavju 5.3.7. Najprej smo posneli kromatograma za sam Na-alginat in

sam jajčni albumin v pufru (slika 20), nato pa postavili umeritveno premico za različne koncentracije jajčnega albumina (slika 21) in dobili enačbo umeritvene premice:

$$A=13141 \cdot c - 185,77$$

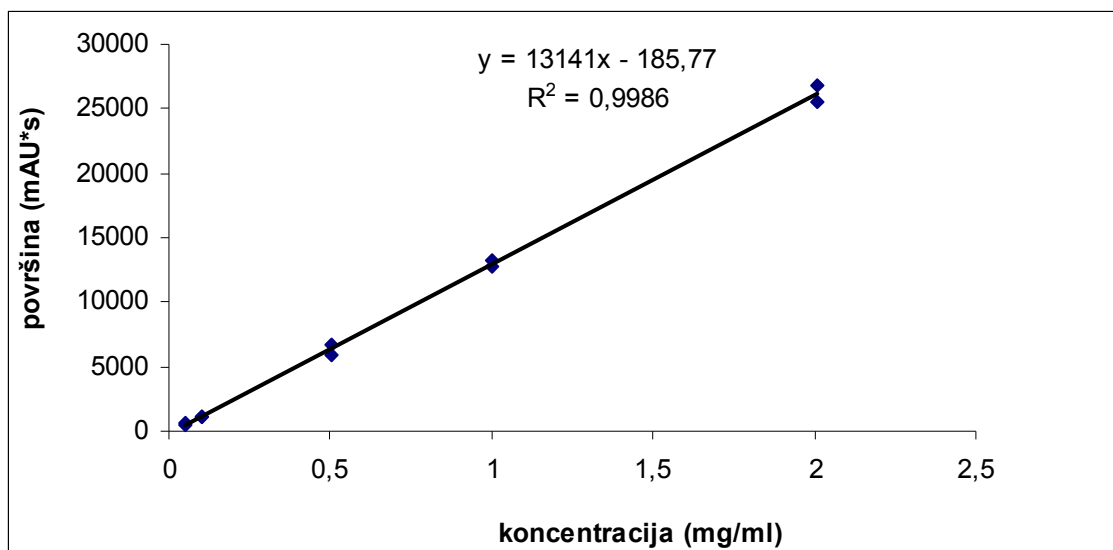
/enačba 1/,

kjer A predstavlja vsoto površin kromatografskih vrhov jajčnega albumina ($t_R=9,5$), c pa koncentracijo jajčnega albumina.



Slika 20: Oblike kromatografskih vrhov za: a) Na-alginat in b) jajčni albumin v pufru.

Na kromatogramu (slika 20) je jasno viden kromatografski vrh z retencijskim časom okrog 7,3 min, ki predstavlja Na-alginat in kromatografski vrh z retencijskim časom okrog 9,5 min, ki predstavlja jajčni albumin.



Slika 21: Umeritvena premica: odvisnost površine pod vrhovi jajčnega albumina od njegove koncentracije v mobilni fazi.

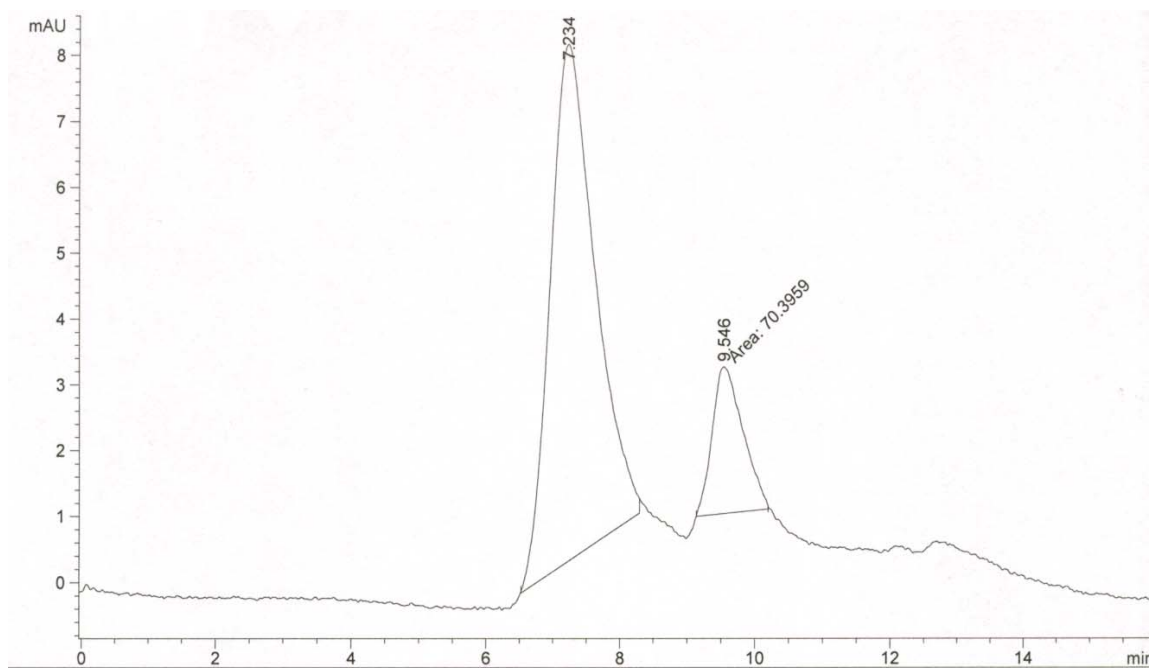
Ker nismo imeli standarda jajčnega albumina, smo pri izdelavi umeritvene premice uporabili osnovno raztopino jajčnega albumina, ki smo jo redčili na ustrezne koncentracije.

6.2.2. Sproščanje jajčnega albumina iz Na-alginatnega hidrogela

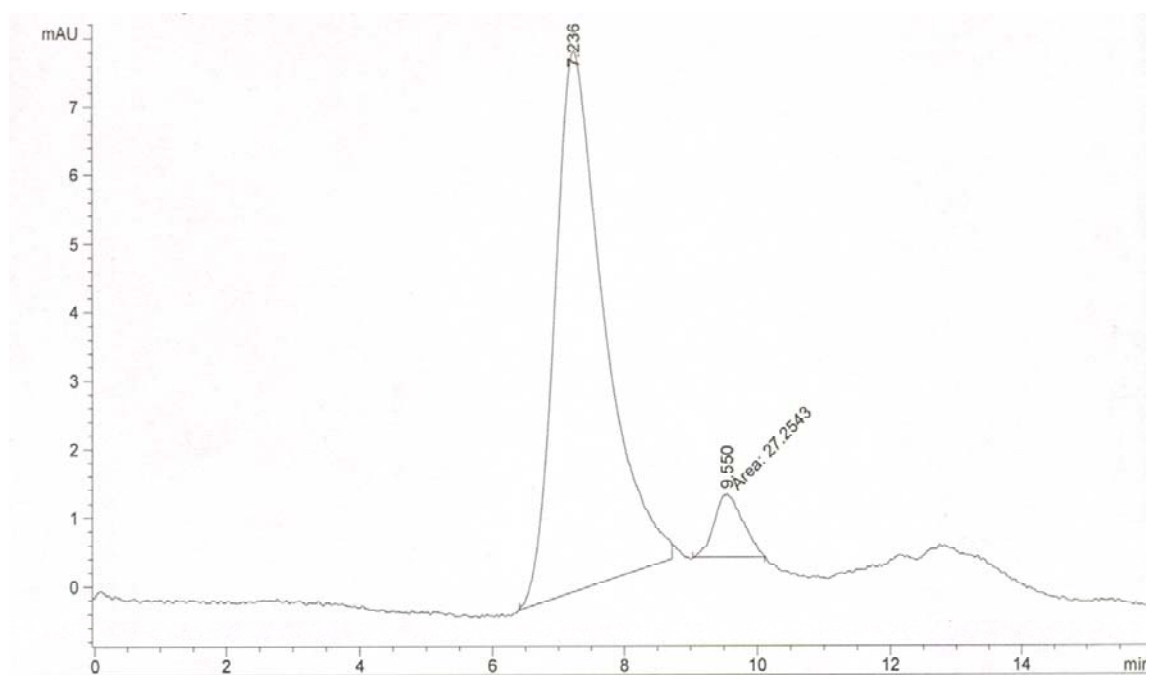
Sproščanje smo izvedli iz 6 %- in 12 %-Na-alginatnega hidrogela (poglavje 5.3.7.3).

2,5 ml-vzorke, ki smo jih v rednih časovnih intervalih s pipeto odvzemali iz sredine PBS-medija, smo skozi 0,45 μ m-filter filtrirali v vialo, ki so namenjene testiranju vzorcev na sistemu HPLC. Tako pripravljene vzorce smo takoj zamrznili in jih zamrznjene shranjevali do začetka kromatografije.

Na kromatogramih, ki smo jih posneli s HPLC na vzorcih odvzetih po enournem sproščanju, jasno vidimo dva vrhova in sicer za Na-alginat ($t_r=7,23$ min) in jajčni albumin ($t_r=9,55$) (sliki 22 in 23).



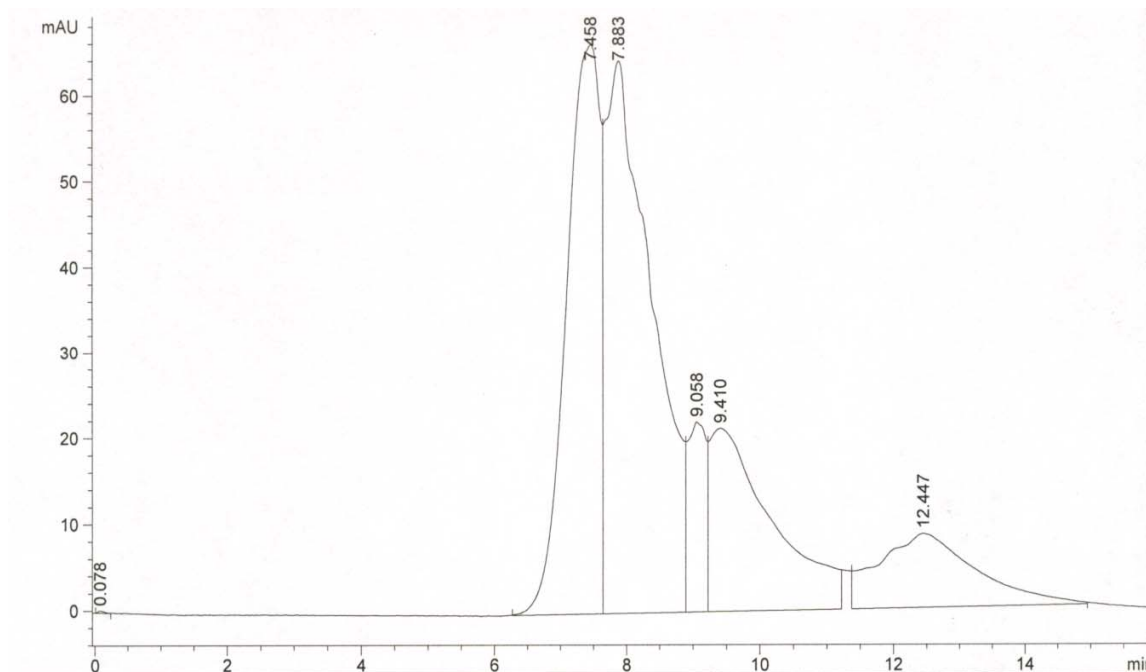
Slika 22: Kromatogram vzorca sproščanja jajčnega albumina po 1 uri iz 6 %-Na-alginatnega gela.



Slika 23: Kromatogram vzorca sproščanja jajčnega albumina po 1 uri iz 12 %-Na-alginatnega gela.

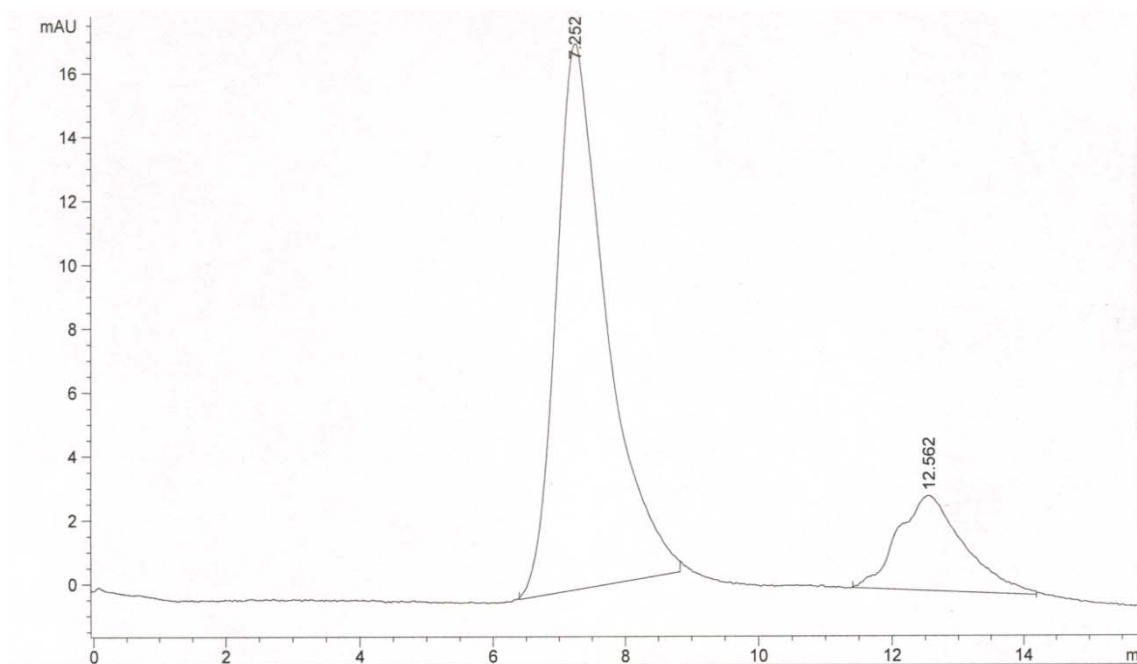
Zaradi neugodnega časovnega odvzema (nemožnosti odvzema vzorcev ponoči) je med 4. in 16. uro prišlo do zmanjšanja ločbe med fazama (pufrom in gelom) oziroma je prišlo do dodatnega raztapljanja gela v pufru – do njunega mešanja. Nastale so tri faze: gel, gel raztopljen v pufru in pufer. Ker smo delali z majhnimi količinami vzorca (5 g gela in 10 ml pufra), smo pri vseh naslednjih odvzemih vzorcev imeli težave.

Po 90 urah spremljanja sproščanja iz 12 %-Na-alginatnega gela ni bilo več mogoče ločiti med posameznimi vrhovi. Pojavili so se dodatni vrhovi z retencijskim časom 7,5 min in 9 min (Na-alginat in jajčni albumin) ter dodaten širok vrh z retencijskim časom 12,5 min (slika 24).



Slika 24: Kromatogram vzorca sproščanja jajčnega albumina po 90 urah iz 12 %-Na-alginatnega gela.

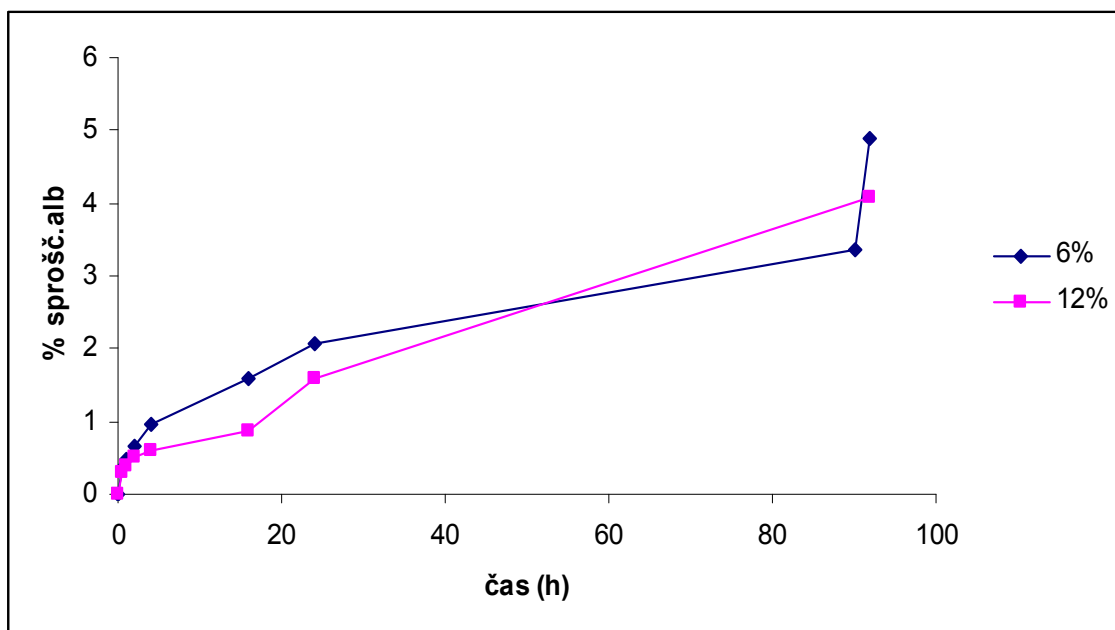
Pri 6 %-Na-alginatnem gelu, ki smo ga po 92 urah popolnoma raztopili v 40 ml pufra, s HPLC nismo več zaznali jajčnega albumina, dobili pa smo dodaten širok vrh z retencijskim časom 12,5 min (slika 25), tako kot pri 12 % Na-alginatnem gelu. Kaj predstavlja ta dodatni vrh, pa nismo ugotavljali, saj smo imeli s samo analitiko zelo veliko težav in bi se že tako obsežno eksperimentalno delo preveč podaljšalo.



Slika 25: Kromatogram vzorca sproščanja jajčnega albumina po 92 urah iz 6 %-Na-alginatnega gela.

Iz rezultatov je razvidno, da se je po 92 urah iz 6 %- in 12 %-Na-alginatnega gela sprostilo manj kot 5 % jajčnega albumina (slika 26). Kot rečeno, smo imeli z analitiko veliko težev, zato rezultati, ki smo jih dobili s HPLC, niso najbolj merodajni. Analitiko bi lahko izboljšali tako, da bi že v začetku preverili, koliko jajčnega albumina lahko detektiramo v prisotnosti Na-alginata. Možno je, da med njimi prihaja do interakcij in se iz sistema dejansko ne sprostijo. Še bolj verjetno je, da bi morali spremeniti kromatografske pogoje tako, da bi tako Na-alginat kot tudi jajčni albumin lahko detektirali kot dva ločena vrha. Kritični smo lahko tudi do modela sproščanja, saj med Na-alginatnim gelom in pufrom PBS ni nobene bariere, ki bi preprečila njuno mešanje. Na ta način je sicer dobro ponazorjen sistem nanosa hidrogela na rano, kjer prav tako ni dodatnih ovir, vendar pa bi bilo z vidika analitike skoraj nujno uporabiti vmesno membrano (Franzove celice) in tako ločiti sistem za dostavo medija, kamor se sprošča jajčni albumin.

Na podlagi meritev sproščanja tako ne moremo podati končnega zaključka o primernosti Na-alginata kot dostavnega sistema za jajčni albumin ter posredno za dostavo izločka iz ličink muh. Ker pa so naše vzorce na osnovi Na-alginata in z vgrajenim izločkom ličink muh že poskusili na pacientih in dobili relativno dobre rezultate celjenja, pa menimo, da Na-alginat predstavlja ugodno okolje za dostavo izločka ličink muh.



Slika 26: Profil sproščanja jajčnega albumina po 92 urah iz 6 %- in 12 %-Na-alginatnega hidrogela.

7. SKLEP

Namen diplomske naloge je bil izdelati hidrogel na osnovi Na-alginata z vgrajeno čim večjo količino izločka ličink muh *Lucilia sericata*. Dobili naj bi sterilni izdelek primernih reoloških lastnosti. V našem eksperimentalnem delu smo z optimizacijo standardnega postopka izdelave hidrogela uspeli izdelati sterilni izdelek, v katerega smo v aseptičnih pogojih vgradili 60 % izločka in je vseboval 5 % Na-alginata. Čeprav se je koncentracija Na-alginata v končni fazi v primerjavi z že izdelovanim gelom (6 %-gel z vgrajenimi 10 % izločka) zmanjšala za 1 %, smo ohranili takšne reološke lastnosti, ki po nanosu na rano zagotavljajo tesen stik z njo. Razviti postopek izdelave hidrogela s 60 % izločka se je izkazal za zelo učinkovitega, saj so bili izdelki z izločkom testirani klinično, vendar ti rezultati niso več tema te diplomske naloge.

Izdelke bi lahko skozi daljši čas shranjevali tudi kot liofizirane suhe gele in jim na ta način povečali mikrobiološko stabilnost, saj se po spontani rehidraciji povrnejo v prvotno strukturo z ohranjenimi reološkimi lastnostmi. Seveda bi morali to dokazati tudi za hidrokele z vgrajenim izločkom ličink muh, a tega zaradi visoke cene izločka nismo preskusili.

S preliminarnim poskusom vgraditve jajčnega albumina v Na-alginatni gel se je iz tega izločilo manj kot 5 % jajčnega albumina, vendar rezultati niso zanesljivi zaradi neoptimiziranih postopkov sproščanja in kasnejše HPLC-analitike.

S postopkom sterilizacije z UV-sevanjem bi v izdelke sicer lahko vgradili celo 90 % izločka in izdelali izdelek primernih reoloških lastnosti, ki bi bil sterilni. Vendar pa se zavedamo, da je UV-sterilizacija bistveno manj zanesljiva metoda, zato bi morali postopek, v kolikor bi bil izdelek z 90 % izločka klinično zanimiv, še optimirati oziroma validirati.

8. LITERATURA

1. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery*, 2005; 23(2): 37-42
2. Slovenski medicinski slovar, 2002
3. Schmidt R. Topical delivery of α - Antichymotripsin for wound healing. Doktorsko delo, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, München, 2005
4. Cegnar M, Baumgartner S, Kristl J. Vlažna oskrba rane s sodobnimi oblogami. *Medicinski razgledi*, 2007; 46 (3): 235-247
5. Smrkolj V. Biologija celjenja prekinjenega tkiva. *Sledi*, 1995: 36-49
6. web.bf.uni-lj.si/bi/biologija-mikroorganizmov/Biokirurgija.htm, dostopno 10. 2011
7. Bouwstra JA, Junginger HE. Hydrogels. In: Swarbrick J, Boylan JC. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York: Marcel Dekker, 1993: 441-465
8. Kovač V, Krbavčič A. Alginatna vlakna in alginatne obloge kot sanitetni in obvezilni material. *Farm. Vest.* 1999; 50: 41-52
9. Blanci MD, Olmo RM, Teijon JM. Hydrogels In: Swarbrick J, Boylan JC. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York: Marcel Dekker, 2007; 2021-2036
10. Ovington LG. Advances in wound dressings. *Clin Dermatol* 2007; 25: 33-8
11. Yudanov TN, Reshetov IV. Modern wound dressings: manufacturing and properties. *Pharm Chem J* 2006; 40: 24-31
12. Mørch YA. Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy. A study of the structure-function relationship in native and structurally engineered alginates. Thesis for the degree of doktor ingeniør. Trondheim, February 2008
13. Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A. Alginat v dostavnih sistemih. *Farm. Vest.* 2008; 59: 293-301
14. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 31: 267-285
15. Sriamornsak P, Thirawong N, Korkerd K. Swelling, Erosion and Release Behaviour of Alginate-based Matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 66: 435-450

16. Jaklič D, Zupančič K, Lapanje A, Smrke D, Cimerman M, Parač Z, Arnež Z, Gunde-Cimerman N. Uvedba zdravljenja kroničnih ran z ličinkami muh *Lucilia sericata* v Slovenijo. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 199-206
17. Jaklič D, Lapanje A, Zupančič K, Smrke D, Gunde-Cimerman N. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *Jurnal of Medical Microbiology* (2008), 57, 617-625
18. Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov Today*, 2002; 7: 569-78
19. Zupančič Valant A. Uvod v reologijo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. 2007, 7-29, 35-43, 81-89
20. Vaje iz fizikalne farmacije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2003, 39-52
21. Aulton ME. *Pharmaceutics: The science of dosage form design*, 2nd Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002
22. www.kambič.com/produkti_sterilizatorji.php, dostopno 10. 2011
23. Manual US200, Paar Physica, 1996, Stuttgart, Nemčija
24. Rupprecht H. Basic physico-chemical principles of freeze-drying-lyophilization. *Farmacevtski vestnik*, 1993; 44 (4): 193-213
25. Ahlin GP. Navodila za deli in čiščenje instrumenta Liofilizator BETA 1-8K. Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko tehnologijo, šifra dokumenta: 1/2000, 8.7.2000
26. Rošic R. Proučevanje hidrogelov za vlažno celjenje ran z vgrajenim modelnim proteinom. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009