UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SONJA BALAŽEK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SONJA BALAŽEK

IZDELAVA IN VREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV ZA PODKOŽNO APLIKACIJO HEPARINA

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF THERMOREVERSIBLE HYDROGELS FOR SUBCUTANEOUS APPLICATION OF HEPARIN

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Zahvala

Za vso pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar. Zahvala gre tudi tehnični sodelavki Tatjani Hrovatič za pomoč pri delu v laboratoriju.

Za pomoč pri praktičnem delu diplome se zahvaljujem tudi Maji Radivojša, mag. farm.

Največja zahvala pa gre staršem in sestri Jasni za vso njihovo podporo v času študija.

Izjava

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

Ljubljana, 2013

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA I
POVZETEK III
ABSTRACT IV
SEZNAM OKRAJŠAV V
1. UVOD 1
1.1 HIDROGELI 1
1.1.1 POLOKSAMERI 1
1.2 NANODELCI 3
1.3 ANTIKOAGULANTI 5
1.3.1 HEPARIN 5
1.4 HITOSAN 6
1.5 POLIELEKTROLITNI KOMPLEKSI 8
1.5.1 POLIELEKTROLITNI NANOKOMPLEKSI IZ HITOSANA IN HEPARINA . 9
1.6 HIDROKSIPROPILMETILCELULOZA (HPMC) 11
1.7 PARENTERALNA APLIKACIJA ZDRAVIL 12
1.7.1 PODKOŽNA APLIKACIJA 12
1.8 REOLOGIJA 13
1.9 VREDNOTENJE NANODELCEV 14
1.9.1 VELIKOST DELCEV 14
1.9.2 POLIDISPERZNI INDEKS (PDI) 15
1.9.3 ZETA POTENCIAL 15
2. NAMEN DELA 17
3. EKSPERIMENTALNI DEL 18
3.1 MATERIALI 18
3.2 NAPRAVE 19

3.3 POSTOPKI IN METODE 19
3.3.1 IZDELAVA TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV 19
3.3.2 VREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV 21
3.3.3 IZDELAVA NANODELCEV IZ HITOSANA IN HEPARINA 23
3.3.4 VREDNOTENJE NANODELCEV IZ HITOSANA IN HEPARINA 25
4. REZULTATI IN RAZPRAVA 27
4.1 VREDNOTENJE NANODELCEV IZ HITOSANA IN HEPARINA 27
4.2 VREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV 30
4.2.1 TEMPERATURA GELIRANJA 30
4.2.2 REOLOŠKO OVREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV 36
4.2.3 HITROST RAZTAPLJANJA TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV 47
5. SKLEP 52
6. LITERATURA 54

POVZETEK

Heparin je antikoagulantna zdravilna učinkovina, ki se uporablja za preprečevanje nastajanja krvnih strdkov in zdravljenje njihovih posledic. Potrebno ga je aplicirati intravensko ali podkožno, ker se zaradi svoje velikosti in številnih ioniziranih skupin ne absorbira iz prebavil. Termoreverzibilni hidrogeli se pri nizkih temperaturah nahajajo v tekočem agregatnem stanju, pri visokih pa tvorijo gel. Imajo pa sposobnost, da se po ohlajanju spet pretvorijo v tekoče stanje. Mednje uvrščamo poloksamere, ki se pogosto uporabljajo kot dostavni sistemi zdravilnih učinkovin.

Zaradi kratkega razpolovnega časa heparina smo v okviru diplomske naloge izdelali nanodelce iz hitosana in heparina, ki smo jih vgradili v termoreverzibilne hidrogele. Nanodelci imajo številne prednosti pred mikro- in makrosistemi, in sicer lahko zaščitijo učinkovino pred razgradnjo, zagotovijo podaljšano sproščanje, izboljšajo biološko uporabnost učinkovin ter zagotovijo ciljano dostavljanje učinkovin. Z metodo polielektrolitnega kompleksiranja smo izdelali hitosanske nanodelce s heparinom z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosan ter z različnimi koncentracijami polimerov. Določili smo jim fizikalne lastnosti (velikost delcev, polidisperzni indeks, zeta potencial) in na podlagi teh izbrali tiste, ki smo jih v nadaljevanje smo uporabili za tekočo komponento hidrogelov.

Hidrogeli so bili sestavljeni iz poloksamera 407, kateremu smo dodali poloksamer 188 in/ali HPMC. Tekoče komponente, ki smo jih uporabili za pripravo hidrogelov, so bile prečiščena voda, raztopina heparina in disperzija hitosanskih nanodelcev s heparinom. Hidrogelom smo nato določili temperaturo geliranja, hitrost raztapljanja ter reološko spremljali njihovo viskoznost. Ugotovili smo, da višje koncentracije poloksamera 407 znižajo temperaturo geliranja, povišajo viskoznost ter upočasnijo hitrost raztapljanja. Dodatek poloksamera 188 je povišal temperaturo geliranja ter vplival tudi na viskoznost in hitrost raztapljanja hidrogelov. Dodatek HPMC k poloksameru 407 je znižal temperaturo geliranja hidrogela, povišal njegovo viskoznost in zmanjšal hitrost raztapljanja. Z različnimi sestavinami lahko vplivamo na fizikalne lastnosti hidrogelov in tako zagotovimo kontrolirano sproščanje učinkovine.

ABSTRACT

Heparin is anticoagulant, and is used for the prevention and treatment of blood clots. It needs to be administered intravenously or subcutaneously, because it is not absorbed from the gastrointestinal tract due to its large size and the number of ionized groups. Thermoreversible hydrogels are liquid at low temperatures, but at high temperatures they form gel. After cooling they can transform into liquid again. Poloxamers are also included among them and are becoming widely used as delivery systems of the active substances.

Due to the short elimination half-life of heparin, in the context of this thesis, nanoparticles from chitosan and heparin were prepared and built in thermoreversible hydrogels. Nanoparticles have many advantages over micro and makrosystems. They protect the active ingredient from degradation, provide prolonged release, improve bioavailability of active substances and provide targeted delivery of active substances. With polyelectrolite complexation chitosan nanoparticles with heparin were prepared with different mass ratios of heparin/chitosan and with different concentrations of polymers. Physical characteristics of nanoparticles were determined (particle size, polydispersity index, zeta potential) and on that basis it was decided which nanoparticles were used as liquid component of hydrogels.

Hydrogels were made from poloxamer 407, to which a poloxamer 188 and/or HPMC were added. Liquid components used for preparation of hydrogels were purified water, heparin solution and chitosan dispersion of nanoparticles with heparin. Gelation temperature was set as well as dissolution rate to hydrogels and their viscosity was rheologicaly monitored. It was established that higher concentrations of poloxamer 407 lower the gelation temperature, increase the viscosity and slow down dissolution of the hydrogel. Addition of poloxamer 188 increased gelation temperature and it also acted on the viscosity and dissolution rate of hydrogels. When HPMC was added to poloxamer 407, it lowered gelation temperature, increased viscosity and reduced dissolution speed of the hydrogel. It was realized that with different components influence on physical characteristics of hydrogels can be influenced on and with it provide the controlled release of active substances.

SEZNAM OKRAJŠAV

CMC – kritična micelna koncentracija

DLS – dinamično sipanje laserske svetlobe

DNK – deoksiribonukleinska kislina

HPMC – hidroksipropilmetilceluloza

LD_{50} – srednji smrtni odmerek

LDV – lasersko Dopplerjevo merjenje hitrosti

ND – nanodelci

P188 – poloksamer 188

P407 – poloksamer 407

PBS – fosfatni pufer

PCS – fotonska korelacijska spektroskopija

PEK – polielektrolitni kompleksi

PEO – polioksietilen

PDI – polidisperzni indeks

PPO – polioksipropilen

ZP – zeta potencial

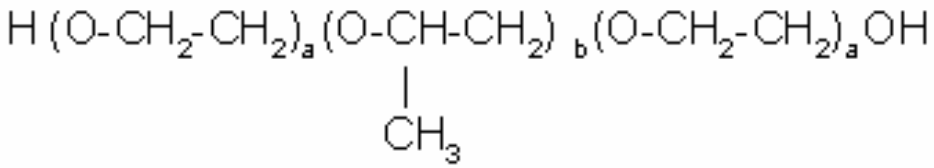
1. UVOD

1.1 HIDROGELI

Hidrogele tvori tridimenzionalna polimerna mreža, katera lahko absorbira večje količine vode ali biološke tekočine. Zmožnost absorbcije je odvisna od prisotnosti hidrofilnih skupin v polimeru. Za sintezo hidrogela se uporabljajo polimeri naravnega kot tudi sinteznega izvora. Nastanek hidrogela je posledica medsebojnih fizikalnih in/ali kemijskih povezav med polimernimi verigami in polimernimi verigami in vodo (1).

1.1.1 POLOKSAMERI

Poloksameri spadajo med termoreverzibilne hidrogele, saj vodne raztopine v dovolj visokih koncentracijah izkazujejo lastnosti termoreverzibilnega geliranja. Pri nizki temperaturi so v tekočem agregatnem stanju, pri višjih temperaturah pa tvorijo gel. Po ohlajanju pa gel spet preide v tekoče stanje. Temperatura geliranja je odvisna od koncentracije posameznega poloksamera (2). Strukturno so poloksameri polioksietilen-polioksipropilenski kopolimeri (slika 1). Polioksietilen (PEO) ima hidrofilne lastnosti, polioksipropilen (PPO) pa hidrofobne, kar poloksamerom daje površinsko aktivnost. Vsi poloksameri so si kemijsko podobni, razlikujejo pa se v razmerju med etilenom in propilenoksidnimi skupinami ter po molekulski masi. Proizvajajo jih z reakcijo propilenoksida s propilenglikolom, da nastane polioksipropilen glikol. Nato dodajo etilenoksid, da dobijo blok kopolimer (3).



Slika 1 : Kemijska struktura poloksamerov; a – etilenoksidni del, b – propilenoksidni del (4). Poloksamer 407: x = 101, y = 56; poloksamer 188: x = 80, y = 27 (5).

Zaradi nizke toksičnosti, biokompatibilnosti in visoke viskoznosti, ki zagotovi nadzorovano sproščanje, se v farmaciji pogosto uporabljajo kot dostavni sistemi zdravilnih učinkovin. Poloksameri se uporabijo pri številnih načinih aplikacije, in sicer podkožno, rektalno, vaginalno, okularno, nazalno, transdermalno. V telesu se poloksameri ne metabolizirajo (6).

Večina poloksamerov se nahaja v obliki belih voskastih granul, ki so brez okusa in vonja. Dobro topni so v vodi, polarnih in nepolarnih organskih topilih. V prisotnosti baz, kislin in kovinskih ionov so vodne raztopine poloksamerov stabilne. Pri visokih koncentracijah izkazujejo lastnosti nenewtonskih sistemov, pri razredčenih vodnih raztopinah pa newtonskih (3,5).

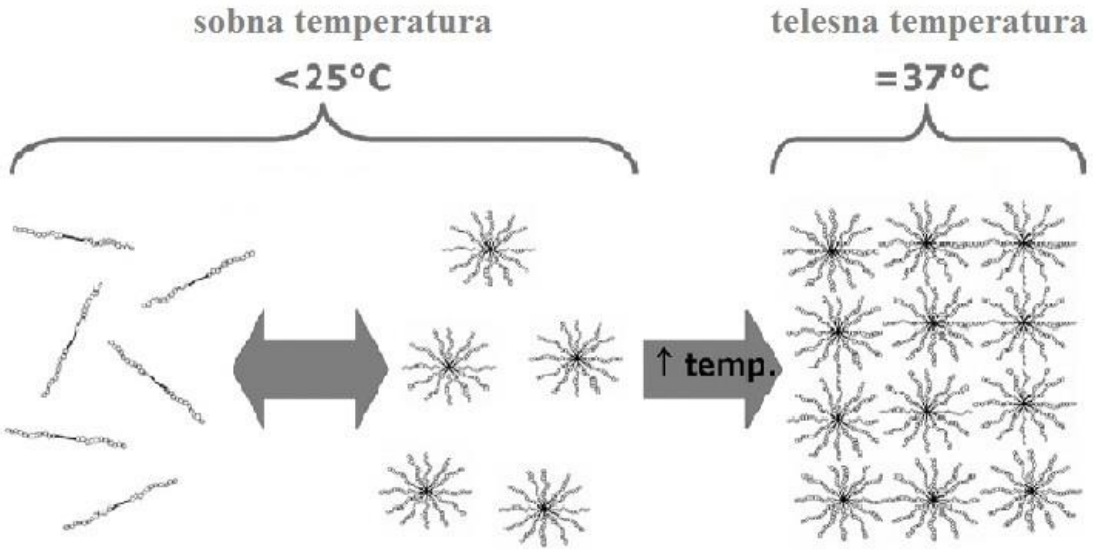
Pri nizkih koncentracijah poloksamera v vodi se ta nahaja hidratiran v monomerni obliki, pri višjih koncentracijah pa se začnejo molekule združevati v skupke, imenovane miceli. Koncentracijo, pri kateri se prične tvorba micelov, imenujemo kritična micelna koncentracija in jo označimo s kratico CMC. Miceli so sestavljeni iz hidrofobne notranjosti in hidrofilnega zunanjega dela. Če poloksamerom povečamo koncentracijo nad kritično gelsko koncentracijo, le-ti začnejo tvoriti gel, kajti miceli se uredijo v mrežo. Potreben pogoj za tvorbo gela je povišana temperatura, kjer postanejo polimerne verige dehidrirane zaradi porušenja vodikovih vezi med njimi in vodo. Posledično pride do hidrofobnih interakcij med polioksipropilenskimi verigami in do tvorbe gela (slika 2) (4).

Poloksamer 407

Poloksamer 407 je neionska, hidrofilna površinsko aktivna snov s povprečno molekulsko maso 12600 g/mol. Najpogosteje se uporablja kot zgoščevalo in gelirno sredstvo, lahko pa ima tudi vlogo koemulgatorja, stabilizatorja, ojačevalca konsistence (5,7).

Poloksamer 188

Enako kot poloksamer 407 je tudi poloksamer 188 neionska, hidrofilna površinsko aktivna snov, katere povprečna molekulska masa pa je 8400 g/mol. Uporablja se kot vlažilno sredstvo, emulgator, solubilizator. V trdnih farmacevtskih oblikah poveča topnost in biološko uporabnost slabo topnih učinkovin (5,8).



Slika 2: Prikaz faznega prehoda poloksamera pri povišanju temperature (7).

1.2 NANODELCI

Nanodelci so trdni koloidni delci velikosti od 10 do 1000 nm. Zgrajeni so iz nosilnega ogrodja, v katerem je lahko učinkovina raztopljena ali dispergirana ali pa je učinkovina na nosilno ogrodje adsorbirana (9). Ogrodje nanodelcev je lahko sestavljeno iz biokompatibilnih in biorazgradljivih polimerov, ki omogočajo nastanek polimernih nanodelcev ali pa iz trdnih lipidov, iz katerih pripravimo trdne lipidne nanodelce (10, 11). Glede na razporeditev nosilnega ogrodja jih delimo na nanosfere in nanokapsule. Nanosfere imajo ogrodje po celotnem volumnu in učinkovina je enakomerno razporejena, nanokapsule pa imajo polimerno ovojnico in jedro, v katerem je ujeta učinkovina (slika 3) (10).

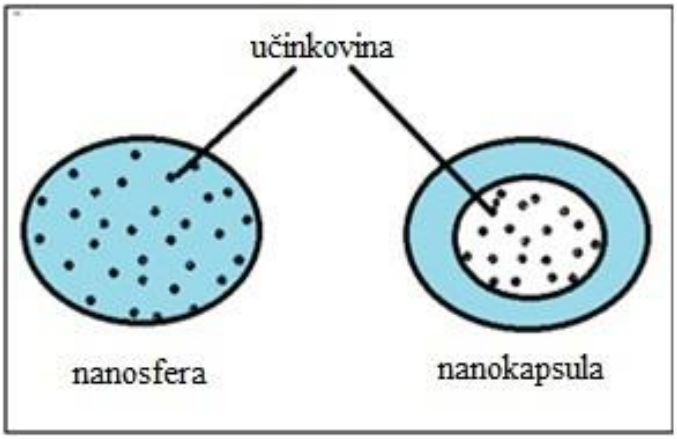
Vgradnja učinkovine v ogrodje lahko poteka med samo izdelavo ali pa z adsorpcijo na že prej izdelane nanodelce. Uspešnost vgradnje učinkovine je odvisna od kemijske sestave polimera, molekulske mase in interakcij učinkovina–polimer. Lipofilne učinkovine lažje vgrajujemo v nanodelce iz hidrofobnih polimerov. Vgradnja hidrofilnih učinkovin je lahko problematična predvsem zaradi uhajanja učinkovine iz notranje v zunanjo vodno fazo. Obstajajo možnosti optimizacije vgradnje hidrofilnih učinkovin: izbira postopka izdelave, ustrezna pH vrednost, uporaba pomožnih snovi, neionizirana in ionizirana oblika

učinkovine (9). Sproščanje učinkovine iz nanodelca poteka nadzorovano preko površinske erozije polimernega ogrodja ali preko difuzije skozi ogrodje (11).

Nanodelci imajo številne prednosti pred makro- in mikrosistemi:

- zaščitijo učinkovino pred razgradnjo,
- izboljšajo topnost učinkovine,
- zagotovijo podaljšano sproščanje,
- izboljšajo biološko uporabnost učinkovin,
- zmanjšajo toksičnost učinkovin,
- zagotovijo ciljano dostavo učinkovin (12).

Polimerne nanodelce lahko izdelujemo s postopkom polimerizacije iz monomerov npr. polimerizacija iz emulzije, suspenzije, medfazna polimerizacija; v večini primerov pa se za izdelavo polimernih nanodelcev poslužujemo metode ionotropnega geliranja, kompleksacije polielektolitov ter obarjalnih metod. Splošna prednost slednjih je odsotnost ostrih reakcijskih pogojev (npr. zelo visoke temperature, tlaka), ki jih uporabljamo pri polimerizacijskih metodah. Dodatno težavo pri izdelavi nanodelcev s polimerizacijo predstavlja težko odstranjevanje nezreagiranih monomerov, ki lahko po vnosu v organizem delujejo toksično (10).



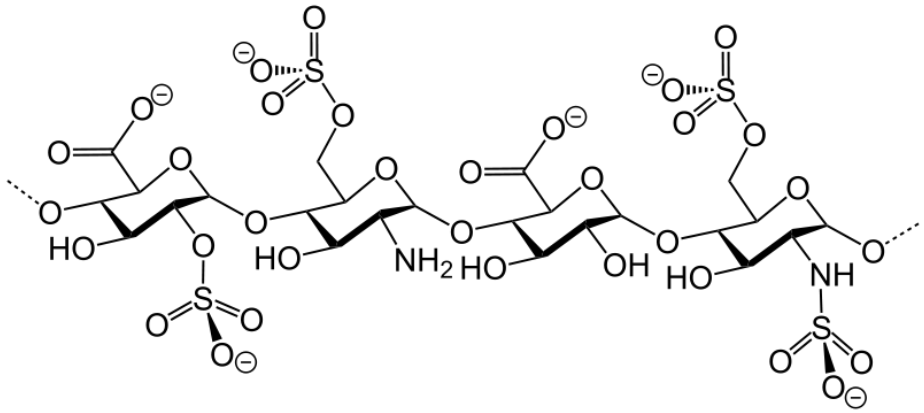
Slika 3: Razlika v razporeditvi učinkovine med nanosfero in nanokapsulo (10).

1.3 ANTIKOAGULANTI

Antikoagulanti so zdravilne učinkovine, ki se uporabljajo za zdravljenje in preprečevanje tromboemboličnih zapletov, kot so globoka venska tromboza, pljučna embolija, miokardni infarkt in kap. Poznamo peroralne antikoagulante (varfarin, acenokumarol, fenprokumon) in intravenske antikoagulante (heparin in inhibitorji trobmina) (13, 14).

1.3.1 HEPARIN

Heparin predstavlja skupino sulfatiranih mukopolisaharidov, ki so skupaj s histaminom prisotni v mastocitih. Zaradi številnih karboksilnih in sulfatnih skupin v molekuli spada heparin med najmočnejše kisline v človeškem organizmu (slika 4). Pridobivajo ga z ekstrakcijo iz govejih pljuč ali sluznice svinjskega črevesa. Poznamo tudi nizkomolekularni heparin, ki ga dobijo s hidrolizo nefrakcioniranega heparina. Heparin uporabljamo v preventivne namene, ko želimo z zaviranjem koagulacije krvi preprečiti nastanek krvnih strdkov znotraj žilnega sistema, in terapevtsko, ko preprečujemo nadaljnjo rast že nastalega strdka (13, 15).



Slika 4: Strukturna formula heparina (16).

Mehanizem delovanja

Heparin zavira koagulacijo krvi z aktivacijo antitrombina III, ki z vezavo v aktivno mesto trombina (IIa) in drugih koagulacijskih faktorjev (IXa, Xa, XIa, XIIa) inhibira njihovo encimsko aktivnost. Na antitrombin III se heparin veže s pentasaharidnim fragmentom, kar

povzroči spremembo konformacije antitrombina ter posledično poveča njegovo afiniteto do aktivnega mesta trombina. Za inhibicijo trombina z antitrombinom III je potrebna tvorba kompleksa heparina z antitrombinom in trombinom. Za inhibicijo faktorja Xa pa je zadostna samo tvorba kompleksa heparina z antitrombinom III. Molekule nizkomolekularnih heparinov so zelo majhne in se istočasno ne morejo vezati na antitrombin III in trombin, zato povečajo inhibitorno delovanje antitrombina III samo na faktor Xa, ne pa tudi na trombin (13,14).

Načini aplikacije in farmakokinetika heparina

Heparin je potrebno aplicirati intravensko ali podkožno (intramuskularna aplikacija povzroči nastanek hematoma), ker se zaradi svoje velikosti in številnih ioniziranih skupin ne absorbira iz prebavil. Po intravenski aplikaciji delovanje nastopi takoj, po podkožni pa učinek nastopi po eni uri. Razpolovni čas intravensko apliciranega heparina je od 40 do 90 minut (14).

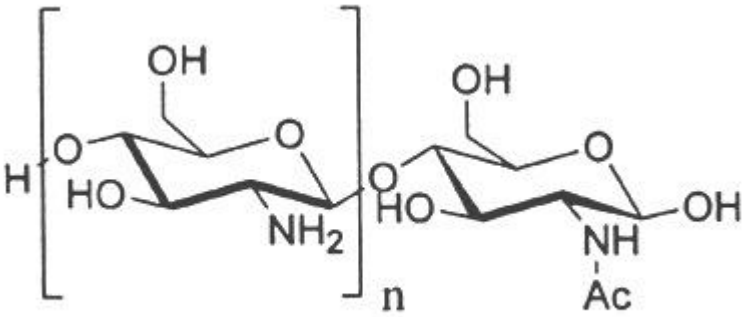
Neželeni učinki

Najpogostejši neželeni učinki zdravljenja s heparinom so lokalne spremembe na mestu aplikacije, krvavitve in povečana aktivnost jetrnih transaminaz. Do krvavitev prihaja lahko iz kože in sluznic, iz ran, prebavnega trakta, sečil in spolnih organov. Pri manjših krvavitvah lahko zmanjšamo odmerek heparina ali povečamo interval odmerjanja. S heparinom povzročena trombocitopenija lahko preko tvorbe protiteles vodi do tromboze. Takrat moramo takoj prenehati z zdravljenjem s heparinom. Med dolgotrajnim zdravljenjem se lahko pojavi reverzibilna osteoporoza, ki po prenehanju zdravljenja izgine (15).

1.4 HITOSAN

Hitosan je naravni kationski polisaharid pridobljen z delnim deacetiliranjem hitina, katerega glavni vir so celične stene nekaterih gliv ter zunanje ogrodje žuželk in rakov. Ker je hitin zelo slabo topen v vodnih raztopinah, je za industrijsko uporabo bolj primeren hitosan. Kemijsko je hitosan kopolimer glukozamina in N-acetilglukozamina, ki sta povezana z ß(1–4) vezjo (slika 17). Hitosan predstavlja vrsto polimerov, ki se med seboj

razlikujejo v molekulski masi, stopnji deacetilacije ter viskoznosti. Topen je le v kislih raztopinah, pri alkalnem in nevtralnem pH pa je netopen (pKa hitosana je okoli 6,5). Na topnost v vodnih raztopinah vpliva tudi stopnja deacetiliranja, in sicer hitosan, ki je 40 % deacetiliran, je topen do pH 9, medtem ko je pri 85 % stopnji topen samo do pH 6,5. Hitosan povečuje prepustnost sluznice na mestu absorpcije in izkazuje dobre bioadhezivne lastnosti. Slednje so predvsem posledica tvorbe vodikovih in ionskih vezi med pozitivno nabitimi amino skupinami polimera ter negativno nabito sialično kislino, prisotno v glikoproteinih na površini sluznice. Hitosan se zaradi dobrih bioadhezivnih lastnosti pogosto uporablja v razvoju novih dostavnih sistemov. Lahko se adherira tako na trda kot mehka tkiva. Bioadhezivni sistemi za dostavo učinkovin izboljšajo biološko uporabnost vgrajenih učinkovin v primerjavi s klasičnimi dostavnimi sistemi, saj podaljšajo čas zadrževanja učinkovine na mestu adhezije ter omogočijo tesnejši stik farmacevtske oblike s sluznico, skozi katero se učinkovina absorbira. V fazi razvoja so številni dostavni sistemi s hitosanom, najpogosteje pa hitosan sestavlja mikro in nanodelce ter liposome. Dostavni sistemi mikro in nanometrskih velikosti se lahko aplicirajo parenteralno ali na različne sluznice, kjer hitosan s kombinacijo bioadhezije in pospeševanja absorpcije poveča biološko uporabnost vgrajenih učinkovin. V teh dostavnih sistemih so lahko vgrajene polarne učinkovine, proteini, antigeni in DNK fragmenti, hitosan pa je lahko uporabljen kot ogrodni polimer ali le kot sredstvo za oblaganje. Hitosan ima majhno peroralno toksičnost, saj ima pri podganah LD_{50} 16 g/kg telesne teže. Toksičnost je odvisna od molekulske mase, čistosti, stopnje deacetilacije, odmerka in načina uporabe (17, 18).



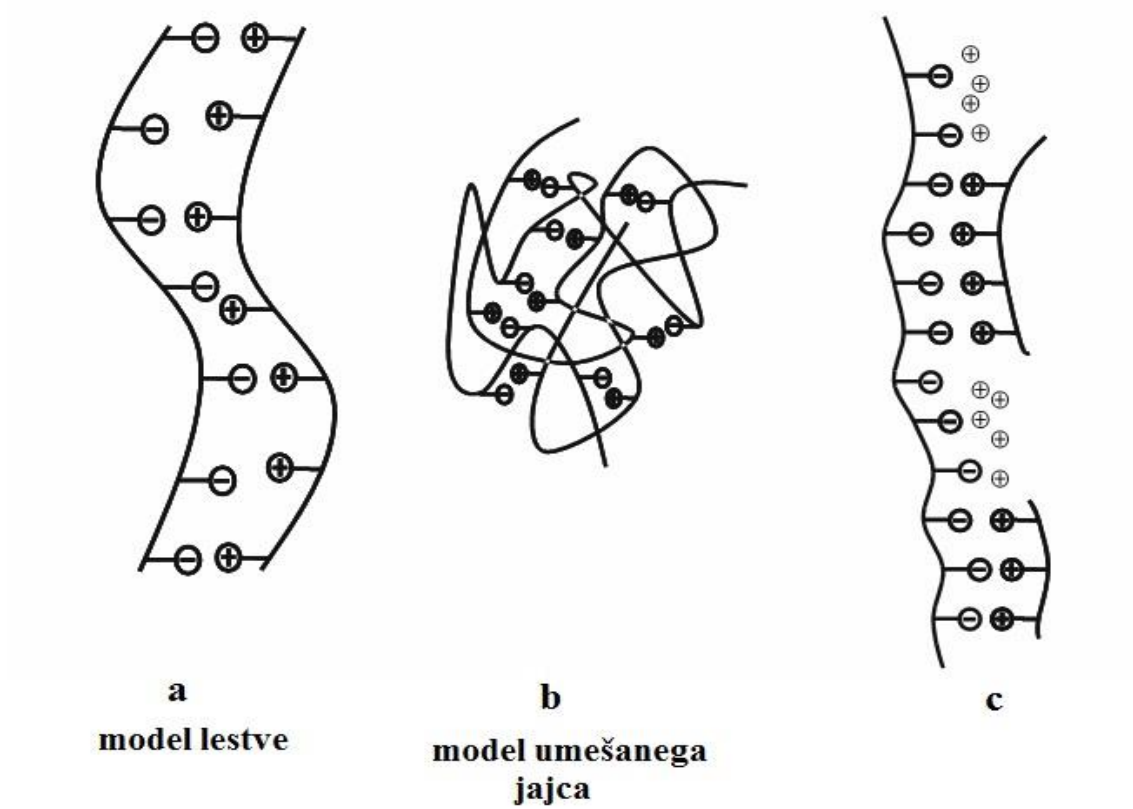
Slika 5: Strukturna formula hitosana (18).

1.5 POLIELEKTROLITNI KOMPLEKSI

Polielektrolitni kompleksi (PEK) nastanejo spontano z združevanjem nasprotno nabitih ionov v vodnih raztopinah. Pri tem pride do tvorbe močnih, a reverzibilnih intermolekularnih vezi (ionska vez, vodikova vez, van der Waalsova vez). Na nastanek in stabilnost PEK vplivajo številni dejavniki, kot so stopnja ionizacije posameznega polielektrolita, gostota naboja in njegova porazdelitev, koncentracija in razmerje med polieletrolitoma, ionska moč in pH disperznega medija. Polielektrolitni kompleksi se vse bolj raziskujejo kot dostavni sistemi za zdravilne učinkovine, proteine, peptide, DNK (19, 20).

Glede na strukturne značilnosti izhodnih polielektrolitov poznamo stehiometrične in nestehiometrične PEK.

- Stehiometrični PEK nastanejo pri močnih polielektrolitih s podobno molekulsko maso in so združeni v stehiometričnem razmerju. V tem primeru je neto naboj nič (vsebujejo enako količino nasprotno nabitih ionov). Poznamo dve vrsti PEK: model lestve in model umešanega jajca (slika 6a in 6b). Večinoma so netopni ali pa se oborijo med procesom izdelave.
- Ko imamo opravka s šibkimi polielektroliti, ki se razlikujejo v molekulski masi in so združeni v nestehiometričnem razmerju, pa nastanejo nestehiometrični PEK. Tukaj imamo presežek enega od nabojev. PEK so sestavljeni iz dolgih verig osnovnega polielektrolita, ki je kompleksiran s krajšimi verigami nasprotno nabitega polielektrolita (slika 6c). Takšne strukture so navadno vodotopne (19, 21).



Slika 6: PEK v stehiometričnem (a in b) in nestehiometričnem (c) razmerju (21).

1.5.1 POLIELEKTROLITNI NANOKOMPLEKSI IZ HITOSANA IN HEPARINA

Obstajajo številne študije o polielektrolitnih kompleksih iz hitosana in heparina, ki obravnavajo vpliv različnih fizikalno-kemijskih parametrov na tvorbo in stabilnost PEK. Ugotovili so, da je fizikalna stabilnost PEK (velikost delcev, zeta potencial, polidisperzni indeks) odvisna od masnega razmerja heparin/hitosan, pH sistema, koncentracije heparina in hitosana ter tudi od molekulske mase uporabljenega hitosana (22,23,24). Z metodo spontanega združevanja preko ionskih interakcij so izdelali nanodelce. Vpliv pH sistema na stabilnost PEK so opazovali v pH območju od 1,2 do 7,4. Delci so bili najmanjši pri pH od 4,5 do 6,5. Tam sta hitosan in heparin ionizirana in lahko tvorita PEK (pKa hitosana je 6,5; pKa heparina je 3,1). Pri pH 1,2 in 2,5 so nekatere karboksilne skupine heparina protonirane, zato so bile vezi med njima šibkejše v primerjavi z vezmi pri pH med 4,5 in 6,5, zato so nastali nanodelci večjih velikosti. Pri vrednosti nad pH 7 so nanodelci začeli

agregirati, kajti manj kot polovica amino skupin hitosana je pozitivno nabitih, zato se zmanjša topnost hitosana kot tudi elektrostatični odboj med delci (22, 23, 24).

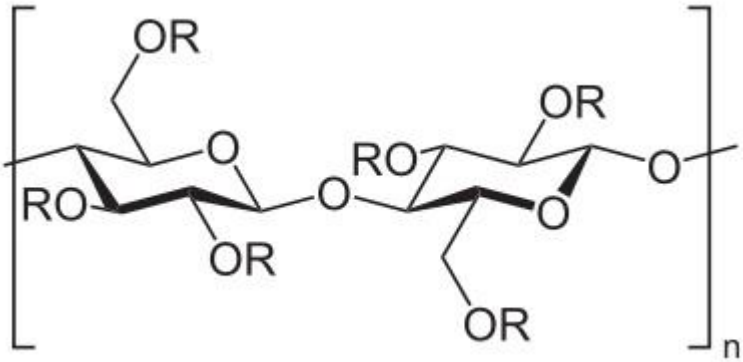
Pri PEK z različnimi masnimi razmerji so ugotovili, da z naraščanjem masnega razmerja enoksaparin/hitosan velikost delcev pada do platoja, nato pa začne zelo naraščati. Do tega sklepa so prišli na podlagi titracije različnih raztopin hitosana z raztopino enoksaparina. Na začetku titracije so nastali veliki delci, za kar je verjetno vzrok povezava ene molekule enoksaparina z več molekulami hitosana. Z nadaljnjim večanjem koncentracije enoksaparina je velikost delcev padala vse do platoja, ki je predstavljal kritično točko titracije. Velikost delcev je nato začela zelo naraščati, kar je privedlo do flokulacije. Koncentraciji ob platoju sta bili izbrani za optimalno masno razmerje. V primeru hitosana z molekulsko maso 50 kDa je le-to znašalo 1:2 (enoksaparin/hitosan). Stehiometrično razmerje je odvisno od strukture polimera, kajti v primeru različnih hitosanov so dobili različna optimalna masna razmerja (enoksaparin/trimetil hitosan 1:0,3, enoksaparin/polietilenglikol-trimetil hitosan 1:1) (23).

Molekulska masa hitosana močno vpliva na velikost delcev. V študiji so dokazali, da z njenim naraščanjem narašča tudi velikost delcev. Nanodelci hitosana z molekulsko maso 10 kDa so bili veliki 233,1 ± 7,2 nm, hitosana z molekulsko maso 400 kDa pa 697,2 ± 17,6. Pri manjši molekulski masi hitosana je struktura bolj zavita in na površju je več kationskih skupin, kar omogoči lažje oblikovanje kompleksa (23).

Velikost nanodelcev je odvisna tudi od koncentracije hitosana, in sicer velikost delcev narašča z naraščajočo koncentracijo hitosana. Hitosan z molekulsko maso 50 kDa in s koncentracijo 0,5 mg/mL je tvoril nanodelce velikosti 232,1 ± 5,8 nm, s koncentracijo 3 mg/mL pa je tvoril delce v velikosti 811,6 ± 35,3 nm. Vzroka za večanje velikosti delcev v odvisnosti od koncentracije hitosana sta lahko dva. Prvi je, da z večjo koncentracijo hitosana narašča število nanodelcev in s tem je večja verjetnost agregacije delcev. Drugi vzrok pa je lahko, da več molekul hitosana reagira z eno molekulo heparina in posledično nastane večji delec (23). Od koncentracije hitosana in heparina je odvisen zeta potencial, kateri je posledično lahko pozitiven ali negativen. Za aplikacije so zaželeni nanodelci, ki imajo pozitiven zeta potencial, torej imajo na površju delca hitosan (24).

1.6 HIDROKSIPROPILMETILCELULOZA (HPMC)

HPMC je bel do rahlo sivkasto-bel prašek. Kemijsko je delno O-metilirana in O-(2-hidroksipropilirana) celuloza (slika 7). Molekulska masa znaša med 10.000 in 1.500.000 g/mol. Pridobiva se s predelavo prečiščene celuloze, kateri dodajo natrijev hidroksid. V naslednji fazi dodajo propilen oksid in klorometan, da se tvorijo metil in hidroksipropil eterne skupine. Uporablja se kot pomožna snov v farmacevtski, prehranski in kozmetični industriji. Nahaja se predvsem v peroralnih, očesnih, nazalnih in dermalnih farmacevtskih oblikah. V trdnih peroralnih farmacevtskih oblikah se uporablja kot vezivo, za filmsko oblaganje tablet in za izdelavo ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem. V tekočih peroralnih in dermalnih farmacevtskih oblikah ter pri kapljicah za oči ima vlogo zgoščevala. Fizikalno-kemijske lastnosti so odvisne od vsebnosti metoksilnih in hidroksipropoksilnih skupin ter od molekulske mase polimera. Raztaplja se v hladni vodi, praktično netopna pa je v vroči vodi, acetonu in toluenu. Poznamo več vrst HPMC, ki se med seboj razlikujejo po viskoznosti in stopnji substitucije. HPMC je neionski polimer, zato je nabrekanje neodvisno od pH vrednosti medija. HPMC z višjo viskoznostjo bolj nabreka, ker ima večjo zmožnost privzema vode, kot tisti z nižjo viskoznostjo, ki hitreje erodira in omogoča hitrejše sproščanje učinkovine (3,25).



Slika 7: Strukturna formula HPMC (R= -H, $-CH_3$, $-CH_2$-CHOH-CH_3) (26).

1.7 PARENTERALNA APLIKACIJA ZDRAVIL

Zdravila so snovi, ki jih vnašamo v telo na različne načine. Najenostavnejši in najcenejši način dajanja zdravil za sistemsko delovanje je zaužitje zdravila skozi usta (peroralno). Parenteralnega vnosa zdravil se poslužujemo, kadar je peroralen vnos neizvedljiv, nezanesljiv, kadar bolnik ne more, ne sme ali noče zaužiti zdravila, v potrebi po hitrem, sistemskem učinku zdravila ter pri točnem odmerjanju zdravila. Ena izmed možnosti za parenteralno dajenje zdravila je v obliki injekcij. Poznamo intravensko, podkožno in intramuskularno aplikacijo. Za razumevanje delovanja parenteralno danih zdravil je pomembno poznavanje značilnosti tkiv, v katera apliciramo zdravila (27).

1.7.1 PODKOŽNA APLIKACIJA

Podkožje (subcutis) je najbolj spodnja plast kože, nahaja se pod usnjico. Sestavljajo ga vezivno tkivo, maščobne celice, krvne in limfne žile ter živci. Podkožje služi kot termoizolator in kot mehanski blažilec, ki varuje globlje ležeče organe pred mehanskimi vplivi (28).

Podkožna aplikacija zdravil je uporabna za počasno, dlje trajajočo enakomerno resorpcijo zdravila, kajti zdravilo počasi prehaja iz podkožja v krvni obtok. Učinek zdravila nastopi v petnajstih do tridesetih minutah. Primerna je za pogosto uporabo, ker je vbrizgavanje dokaj neboleče. Količina enkratnega odmerka je omejena na 1 do 2 mL. Zaradi večje oživčenosti podkožja lahko vbrizgavamo le izotonične in šibko alkalne raztopine. Hipertoničnih, kislih in močno bazičnih raztopin ne smemo uporabljati za podkožno aplikacijo, ker lahko povzročimo okvaro ali celo nekrozo podkožja. Primerno je tudi za vbrizgavanje zelo viskoznih zdravil. Najbolj priporočeno mesto podkožnega injiciranja je predel kože okoli popka (nikoli v popek), sprednji del stegen, zunanja stran nadlahti (27).

1.8 REOLOGIJA

Reologija je veda, ki nam omogoča razjasnitev notranje strukture farmacevtskih sistemov, spremljanje fizikalne stabilnosti posameznih vhodnih materialov, obnašanja snovi pod vplivom temperature, pomaga pri optimizaciji in kontroli kvalitete vhodnih surovin in končnih izdelkov. Sisteme v grobem delimo na idealne ali Newtonske in realne ali ne-Newtonske. Newtonski sistemi so idealizirane tekočine (voda, mineralna olja, raztopine topljencev z nizko molekulsko maso), pri katerih je viskoznost neodvisna od delovanja mehanske sile na sistem. Viskoznost je samo funkcija temperature in atmosferskega tlaka. Ne-Newtonsko se v glavnem obnašajo realne kapljevine, poltrdni in trdni sistemi. Njihova viskoznost je odvisna od delovanja mehanske sile na sistem, za nekatere sisteme pa tudi od časa delovanja le-te. Časovno neodvisni sistemi od delovanja mehanske sile so psevdoplastični, dilatantni in plastični. Časovno odvisni pa so tiksotropni in reopeksni sistemi (29).

Proučevanje reološkega obnašanja snovi omogočajo različni inštrumenti, kot so reometri in viskozimetri. Izbira ustreznega inštrumenta je odvisna od lastnosti snovi in namena reološkega proučevanja. Za absolutne inštrumente kot so rotacijski in kapilarni reometri ter viskozimetri strižne pogoje izračunamo s pomočjo merljivih in nastavljivih količin ter s pomočjo geometrijskih karakteristik izbranega senzorskega sistema (30).

Izbira primernega senzorskega sistema je ključnega pomena za uspešno merjenje reoloških lastnosti sistema. Izberemo ga glede na vrsto tekočine (viskoznost, sestavo, stopnjo strukturiranosti, prisotnost in velikost delcev), pogoje pri merjenju (destruktivni in nedestruktivni testi), temperaturno območje in dodatne zahteve (inertna atmosfera, povišan tlak, elektromagnetno polje) (30). Poznamo tri različne senzorske sisteme:

- Senzorski sistem stožca in plošče (slika 8A)

  Vzorec se nahaja v reži med stožcem in ploščo. Poglavitne prednosti tega sistema so enostavnost doziranja vzorca, majhne količine potrebnega vzorca in enostavnost čiščenja merilnega sistema po opravljeni meritvi. Za majhne kote stožca ($\alpha < 4^{o}$) sta strižna hitrost in napetost po celotni reži enaki (30).

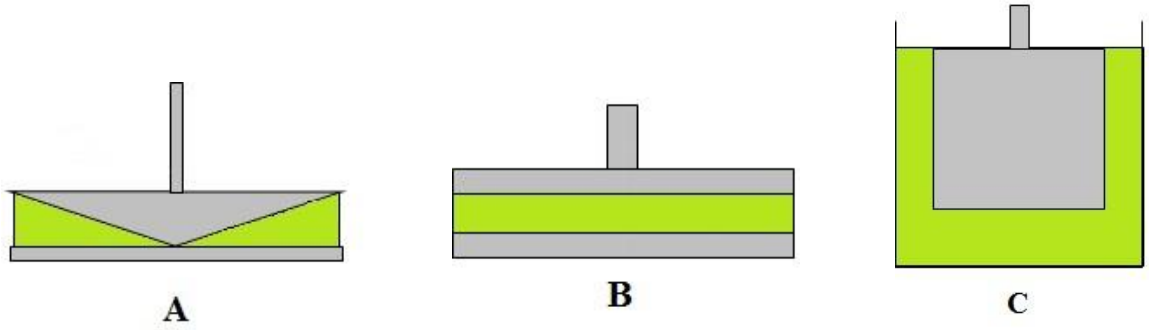
- Senzorski sistem dveh vzporednih plošč (slika 8B)

  Vzorec se nahaja v reži med dvema ploščama z določenim premerom in razdaljo med njima. Velikost reže med ploščama je nastavljiva, zato lahko preprosto

določamo različna območja strižnih hitrosti oziroma strižne deformacije. Od senzorskega sistema stožec–plošča se razlikuje po tem, da se strižna hitrost spreminja po polmeru plošče in s tem po celotnem vzorcu. Iz merjenega oz. nastavljenega navora na ploščo, kateri je posledica upora tekočine pri rotaciji ene od plošč, izračunamo strižno napetost na obodu plošče ob znanih dimenzijah (30).

- Senzorski sistem koaksialnih valjev (slika 8C)

  Vzorec se nahaja v reži med valjema določene debeline in višine. En valj rotira z določeno kotno hitrostjo, drugi pa miruje. Strižno napetost lahko izračunamo iz navora na notranji valj zaradi notranjega trenja tekočine pri pogojih strižnega toka ali strižne deformacije pri določeni strižni hitrosti (30).



Slika 8: Senzorski sistemi pri rotacijskih reometrih: A – sistem stožec–plošča, B- sistem dveh vzporednih plošč, C – sistem koaksialnih valjev (30); zeleno obarvanje predstavlja vzorec.

1.9 VREDNOTENJE NANODELCEV

1.9.1 VELIKOST DELCEV

Velikost delcev naprava Zetasizer Nano meri na podlagi dinamičnega sipanja laserske svetlobe (DLS) oziroma fotonske korelacijske spektroskopije (PCS). Osnova za določitev velikosti delcev je Brownovo gibanje, pri čemer gre za naključno gibanje delcev, ki je posledica trkov z molekulami topila. Aparatura meri stopnjo nihanja intenzitete sipane

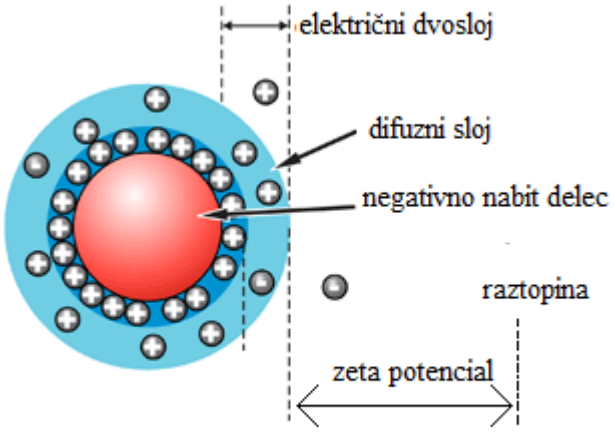
svetlobe in na podlagi teh meritev izračuna velikost delcev. Večji delci se gibljejo počasneje kot majhni, zato je hitrost nihanja intenzitete sipane svetlobe pri večjih delcih manjša (31).

1.9.2 POLIDISPERZNI INDEKS (PDI)

Polidisperzni indeks je merilo homogenosti disperzije in ima vrednost med 0 in 1. Vrednosti okoli 0 kažejo na homogen sistem (delci so večinoma enakih velikosti), medtem ko vrednosti naraščajoče proti 1 kažejo na prisotnost različno velikih delcev (24).

1.9.3 ZETA POTENCIAL

Zeta potencial (ZP) je razlika v potencialih med mejno plastjo in notranjostjo raztopine (slika 9). Pri njegovem merjenju uporabljamo metodo, ki se imenuje lasersko Dopplerjevo merjenje hitrosti (LDV). Zetasizer Nano izračuna zeta potencial na podlagi Henryjeve enačbe, ki temelji na elektroforezni gibljivosti delcev. Električni potencial povzroča gibanje delcev v električnem polju. Hitrost delcev je odvisna od moči električnega polja, dielektrične konstante, viskoznosti medija in zeta potenciala. Nabiti delci potujejo k nasprotno nabiti elektrodi, viskozne sile na delcu pa nasprotujejo temu gibanju. Delec bo potoval s konstantno hitrostjo, ko bo doseženo ravnotežje med tema dvema silama (32). Zeta potencial nam daje informacijo o fizikalni stabilnosti koloidnih disperzij. Če imajo vsi delci v disperziji močan pozitiven ali negativen zeta potencial, se ti delci med seboj močno odbijajo in ni možnosti, da bi prišlo do flokulacije delcev. Do združevanja delcev pride, če je zeta potencial zelo nizek, saj se takrat delci med seboj ne odbijajo. Disperzije, katerih delci imajo zeta potencial večji od +30 mV ali manjši od -30 mV, so fizikalno stabilne. Najpomembnejši faktor, ki vpliva na vrednost zeta potenciala, je pH. Pri nižjih vrednostih pH je zeta potencial pozitiven, kajti delci so pozitivno nabiti, pri višjem pH pa je negativen, ker so delci negativno nabiti. Pri pH, kjer je zeta potencial nič, je koloidni sistem najmanj fizikalno stabilen (32).



Slika 9: Prikaz zeta potenciala (32).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge bo izdelati in ovrednotiti termoreverzibilne hidrogele z različno tekočo komponento za podkožno aplikacijo heparina.

Osnovni polimer za izdelavo termoreverzibilnih hidrogelov bo poloksamer 407, kateremu bomo dodajali poloksamer 188 in/ali HPMC. Kot tekočo komponento bomo uporabili prečiščeno vodo, raztopino heparina ali disperzijo hitosanskih nanodelcev s heparinom. Po podkožni aplikaciji hočemo zagotoviti podaljšano sproščanje heparina.
Tekočim komponentam bomo dodajali različne koncentracije poloksamera 407 in njegove kombinacije s poloksamerom 188 in/ali HPMC. Izdelanim hidrogelom bomo določili temperaturo geliranja. Z reometrom bomo spremljali spreminjanje viskoznosti hidrogelov v odvisnosti od temperature ter obnašanje viskoznosti pri 37 ºC. V inkubatorju, termostatiranem na 37 ºC, pa bomo spremljali hitrost njihovega raztapljanja.

Disperzijo hitosanskih nanodelcev s heparinom bomo pripravili z metodo polielektrolitnega kompleksiranja. Nanodelce bomo pripravili tako, da bomo z avtomatsko pipeto raztopino heparina med neprestanim mešanjem na magnetnem mešalu dodajali raztopini hitosana. Z napravo Zetasizer Nano ZS bomo izdelanim nanodelcem izmerili velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

Materiali za izdelavo termoreverzibilnih hidrogelov

- Lutrol® F127, INCI: Poloxamer 407, Ludwigshafen, Nemčija
- Lutrol® F68, INCI: Poloxamer 188, Ludwigshafen, Nemčija
- heparin Krka, 5000 i.e./mL raztopina za injiciranje, Novo mesto, Slovenija
- hitosanijev klorid, Kraeber & Co GmbH, Nemčija
- hidroksipropilmetilceluloza (HPMC K4M)
- prečiščena voda

Materiali za izdelavo nanodelcev

- hitosanijev klorid, Kraeber & Co GmbH, Nemčija
- heparin Krka, 5000 i.e./mL raztopina za injiciranje, Novo mesto, Slovenija
- prečiščena voda

Reagenti za pripravo PBS pufra za določanje hitrosti raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov

- natrijev klorid (NaCl), Merck, Darmstadt, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat ($Na_2HPO_4x12H_2O$), Merck, Darmstadt, Nemčija
- kalijev klorid (KCl), Merck, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Merck, Darmstadt, Nemčija
- klorovodikova kislina (HCl), Merck, Darmstadt, Nemčija
- bidestilirana voda

3.2 NAPRAVE

- analizna tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- analizna tehtnica, Mettler Toledo XS 205, Schwerzenbach, Švica
- avtomatske pipete (20-100 µL, 50-1000 µL, 100-5000 µL), Biohit, Finska
- magnetno mešalo IKA-WERKE Ro 15 power, Nemčija
- magnetno mešalo in grelec, IKA RCT basic, Nemčija
- sistem za merjenje temperature, IKA ETS-D5, Nemčija
- pH meter, SevenMulti, Mettler Tolledo, Schwerzenbach, Švica
- ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija
- naprava za merjenje velikosti in zeta potenciala nanodelcev, Zetasizer Nano ZS, Malvern, Velika Britanija
- reometer Physica MCR 301 (merilni sistem CP50-2), Anton Paar GmbH, Graz, Avstrija
- vodna kopel WB-13, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija

3.3 POSTOPKI IN METODE

3.3.1 IZDELAVA TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

Izdelali smo osem različnih formulacij termoreverzibilnih hidrogelov v treh različnih tekočih komponentah. Pred pripravo smo najprej natehtali ustrezne količine sestavin za vseh osem formulacij, ki so podane v preglednici I. 50 mL čaše z magnetom in 20 mL medija smo položili v večje 250 mL čaše, ki so bile napolnjene z ledom in postavljene na magnetno mešalo. Prej natehtane mase P407 smo postopoma dajali v čaše z medijem in mešali do homogenosti s hitrostjo 500 vrtljajev/minuto. Nato smo vzorcem dodajali P188 in/ali HPMC in spet mešali do homogenosti. Izdelane termoreverzibilne hidrogele smo shranili v hladilniku.

Ledeno kopel smo uporabili, ker so pri nizki temperaturi raztopine poloksamerov v tekočem agregatnem stanju (2).

Preglednica I: Uporabljene mase za posamezne formulacije termoreverzibilnih hidrogelov.

Formulacije hidrogelov	Masa (g)
18 % (m/m) P407	4,39
18 % P407 + 1 % P188	4,44 + 0,25
18 % P407 + 1 % HPMC	4,44 + 0,25
18 % P407 + 1 % P188 + 1 % HPMC	4,50 + 0,25 + 0,25
21 % P407	5,32
21 % P407 + 5 % P188	5,68 + 1,35
21 % P407 + 1 % HPMC	5,38 + 0,26
21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC	5,75 + 1,37 + 0,27

Tekoče komponente, ki smo jih uporabili za izdelavo termoreverzibilnih hidrogelov, so bile prečiščena voda, raztopina heparina (1 mg/mL) in disperzija nanodelcev iz hitosana in heparina.

Priprava raztopine heparina

Pripravili smo raztopino koncentracije 1mg/mL. Osnovna raztopina heparina, iz katere smo izhajali, je 5000 i.e./mL, kar ustreza koncentraciji 50 mg/mL (1 mg je enako 100 i.e) (33). 1 mL osnovne raztopine smo odpipetirali v 50 mL bučko in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

Izdelava nanodelcev iz hitosana in heparina

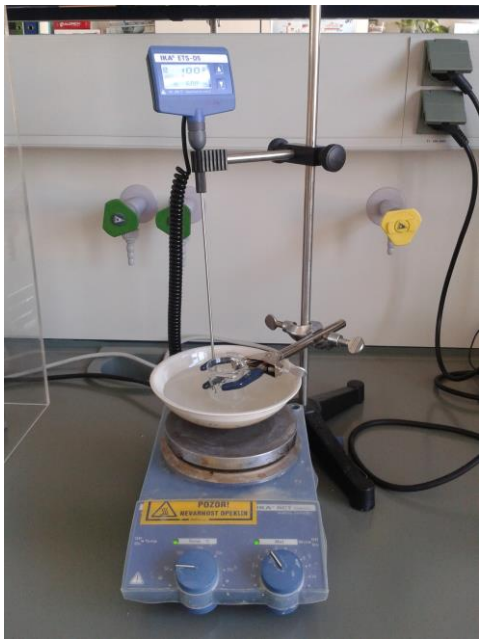
Za izdelavo termoreverzibilnih hidrogelov smo uporabili disperzijo nanodelcev z masnim razmerjem heparin/hitosan 1:1 in s koncentarcijo polimerov v disperziji 1 mg/mL. Nanodelce smo pripravili z metodo polielektrolitnega kompleksiranja, ki je opisana v podpoglavju 3.3.3.

3.3.2 VREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

Izdelanim hidrogelom smo izmerili temperaturo geliranja, viskoznost in hitrost raztapljanja.

Določanje temperature geliranja termoreverzibilnih hidrogelov

Izparilnico napolnjeno z mrzlo vodo smo postavili na magnetno mešalo. 25 mL čašo, ki je vsebovala 8 g termoreverzibilnega hidrogela in magnet velikosti 2 cm, smo s prižemo pritrdili nad izparilnico tako, da je bilo dno čaše potopljeno v vodi. Čaša se ni dotikala dna izparilnice (slika 10). Magnetno mešalo je imelo vlogo mešanja vzorca (500 vrtljajev/minuto) in dovajanja toplote (nastavitev na magnetnem mešalu je bila 60 ºC). Temperaturo vodne kopeli smo spremljali z vpetim termometrom. Temperatura geliranja je bila temperatura, pri kateri se je magnet popolnoma ustavil. Naš rezultat temperature geliranja predstavlja povprečna vrednost treh meritev (34).



Slika 10: Aparatura za določitev temperature geliranja termoreverzibilnih hidrogelov.

Reološko ovrednotenje termoreverzibilnih hidrogelov

Na rotacijskem reometru Physica MCR 301 (slika 11) smo s senzorskim sistemom stožec-plošča (CP50-2, premer = 49,962, α = 2,001º) izvajali meritve viskoznosti hidrogelov. Vzorce izdelane po postopku opisanem v podpoglavju 3.1.1 smo pred meritvijo vzeli iz hladilnika in jih dali pogrevat na vodno kopel, da so gelirali. Gele smo nato postavili na spodnjo ploščo reometra, potem pa stožec spustili do merilne pozicije (0,209 mm). Presežek vzorca, ki ga je stožec izpodrinil, smo odstranili.

Slika 11: Reometer Physica MCR 301 s sistemom stožec - plošča.

Najprej smo merili spreminjanje viskoznost hidrogelov v odvisnosti od temperature, ki smo jo spreminjali od 20 do 40 ºC. Temperaturo smo vsako minuto povečali za 1 ºC ter izvedli 60 meritev. Nato pa smo še izvajali meritev viskoznosti termoreverzibilnih hidrogelov pri 37 ºC. Postopek je trajal 120 sekund, opravili pa smo 20 meritev. Vse meritve smo izvajali pri konstantni strižni hitrosti 10 s^{-1}.

Določanje hitrosti raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov

Za vse izdelane termoreverzibilne hidrogele smo v večji vodni kopeli, ki je bila termostatirana na 37 °C, določili hitrost raztapljanja. Medij za določanje hitrosti raztapljanja je bil fosfatni pufer (PBS) s pH 7,4. V plastične epruvete (volumen 4 mL) z zamaškom smo nalili 1 mL hidrogela. Za nekaj časa smo jih postavili na temperaturo 37 ºC, da so gelirali, nato pa v vsako epruveto dodali po 2 mL PBS. Vzorce smo vsak dan ročno premešali ter vizualno določili volumen neraztopljenega hidrogela. Zaradi istočasnega izvajanja doktorske naloge in njihovega spremljanja sproščanja heparina iz hidrogelov, smo vsak dan odvzeli 0,5 mL pufra in ga nadomestili z enakim volumnom svežega PBS (35).

Priprava PBS:

Stehtali smo 8 g NaCl, 1,44 g Na_2HPO_4, 0,2 g KCl in 0,24 g KH_2PO_4 ter to kvantitativno prenesli v 1000 mL bučko. V bučko smo nalili bidestilirano vodo malo pod oznako ter mešali na magnetnem mešalu. Raztopino smo nato z 1M HCl umerili na pH 7,4. Na koncu smo bučko z bidestilirano vodo dopolnili do oznake.

3.3.3 IZDELAVA NANODELCEV IZ HITOSANA IN HEPARINA

Z metodo polielektrolitnega kompleksiranja smo, iz prej pripravljenih raztopin hitosana in heparina, izdelali disperzijo hitosanskih nanodelcev s heparinom. Diplomska naloga se nanaša na izdelavo hidrogelov za podkožno aplikacijo heparina, zato smo poskušali izdelati nanodelce s čim večjo koncentracijo heparina.

Priprava raztopine hitosana

Pripravili smo raztopine hitosanijevega klorida različnih osnovnih koncentracij (preglednica II). Najprej smo natehtali ustrezne mase hitosana in jih kvantitativno prenesli v 25 mL bučke. Mase hitosana :

- masno razmerje heparin/hitosan 1:0,5 137,5 mg hitosana
- masno razmerje heparin/hitosan 1:0,75 168,8 mg hitosana
- masno razmerje heparin/hitosan 1:1 40 mg, 80 mg, 200 mg hitosana
- masno razmerje heparin/hitosan 1:2 130 mg hitosana.

Bučke smo nato s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Da se je ves hitosan raztopil, smo dali bučke v ultrazvočno kadičko.

Priprava raztopine heparina

Pripravili smo raztopine heparina z različnimi koncentracijami (preglednica II). Izhajali smo iz osnovne raztopine heparina 5000 i.e./mL, kar ustreza 50 mg/mL. V 50 mL bučke smo odpipetirali ustrezne volumne heparina in jih nato s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Volumni heparina:

- masno razmerje heparin/hitosan 1:0,5 9,17 mL heparina
- masno razmerje heparin/hitosan 1:0,75 11,25 mL heparina
- masno razmerje heparin/hitosan 1:1 2,67 mL; 5,34 mL; 13,35 mL heparina
- masno razmerje heparin/hitosan 1:2 8,67 mL heparina.

Preglednica II: Osnovne koncentracije raztopin heparina in hitosana ter njuna koncentracija po izdelavi nanodelcev pri različnih masnih razmerjih heparin/hitosan.

Masno razmerje heparin/hitosan	**Koncentracija osnovne raztopine heparina (mg/mL)**	**Koncentracija osnovne raztopine hitosana (mg/mL)**	**Koncentracija heparin/hitosan v disperziji ND (mg/mL)**
1:0,5	9,170	5,500	5,000 / 2,500
1:0,75	11,250	6,750	5,000 / 3,750
1:1	2,670	1,600	1,000 / 1,000
1:1	5,340	3,200	2,000 / 2,000
1:1	13,350	8,000	5,000 / 5,000
1:2	8,670	5,200	2,000 / 4,000

Izdelava nanodelcev

Najprej smo izdelali nanodelce z masnim razmerjem heparin/hitosan 1:1 in z različno koncentracijo polimerov v disperziji (1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL). Kasneje smo izdelali še nanodelce z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosan (1:0,5; 1:0,75; 1:2). 6,667 mL raztopine hitosana različnih koncentracij smo odmerili v čaše. Med mešanjem na

magnetnem mešalu (800 vrtljajev/minuto) smo počasi z avtomatsko pipeto dodajali različne volumne raztopine heparina ustrezne koncentracije. Volumni uporabljeni za izdelavo nanodelcev so navedeni v preglednici III. Čaše smo na koncu prekrili s parafilmom in vzorce mešali še eno uro.

Preglednica III: Volumni osnovnih raztopin heparina in hitosana za izdelavo nanodelcev pri različnih masnih razmerjih.

Masno razmerje heparin/hitosan	**Volumen osnovne raztopine heparina (mL)**	**Volumen osnovne raztopine hitosana (mL)**
1:0,5	8,000	6,667
1:0,75	5,333	6,667
1:1	4,000	6,667
1:2	2,000	6,667

Ko smo ugotovili, katera disperzija nanodelcev z najvišjo možno koncentracijo heparina je fizikalno stabilna, hkrati pa tudi njene fizikalne lastnosti (velikost delcev, PDI, zeta potencial) ustrezajo zahtevam za nanodelce, smo za pripravo hidrogelov uporabili večja volumna raztopin hitosana in heparina (12,5 mL raztopine hitosana in 7,5 mL raztopine heparina). Za tekočo komponento pri izdelavi termoreverzibilnih hidrogelov smo namreč potrebovali 20 mL raztopine.

3.3.4 VREDNOTENJE NANODELCEV IZ HITOSANA IN HEPARINA

Izdelanim disperzijam hitosanskih nanodelcev s heparinom smo z napravo Zetasizer Nano ZS izmerili velikost delcev, zeta potencial in polidisperzni indeks. S tem smo preverili, katere izdelane disperzije nanodelcev so bile fizikalno stabilne in smo jih lahko uporabili za izdelavo termoreverzibilnih hidrogelov.

Merjenje velikosti delcev in polidisperznega indeksa

Za merjenje velikosti delcev in polidisperznega indeksa smo vzorec napolnili v kiveto in jo vstavili v merilno celico naprave Zetasizer Nano ZS. Pred meritvijo smo morali biti pozorni, da je bila kiveta čista in da ni bilo mehurčkov v vzorcu, kajti to bi motilo meritev.

Pogoji meritev:

- kiveta: DTS0012,
- temperatura: 25 ºC,
- viskoznost disperznega medija (voda): η = 0,8872 mPas,
- lomni količnik disperznega medija (voda): RI = 1,330,
- valovna dolžina laserske svetlobe (He-Ne laser): λ = 633 nm,
- kot merjenja: 173 º.

Merjenje zeta potenciala

Vzorec smo injicirali v kapilarno celico in jo vstavili v merilno celico naprave Zetasizer Nano ZS. Tudi tu smo morali biti pozorni na morebitne mehurčke v vzorcu.

Pogoji meritev:

- kapilarna celica: DTS1060C,
- model: Smoluchowski,
- temperatura: 25 ºC,
- viskoznost disperznega medija (voda): η = 0,8872 mPas,
- lomni količnik disperznega medija (voda): RI = 1,330,
- dielektrična konstanta disperznega medija (voda): ε = 78,5.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VREDNOTENJE NANODELCEV IZ HITOSANA IN HEPARINA

Izdelali smo disperzije nanodelcev z različnimi masnimi razmerji heparin/hitosan ter disperzije nanodelcev z masnim razmerjem 1:1, ki so imele različne koncentracije heparina in hitosana. Izmerili smo fizikalne lastnosti nanodelcev ter se na podlagi le-teh odločili, katere bomo uporabili za vgrajevanje v termoreverzibilne hidrogele.

Preglednica IV: Povprečni premer, PDI in zeta potencial ND v disperzijah, ki so vsebovale različna masna razmerja heparin/hitosan ter ND v disperzijah z masnim razmerjem heparin/hitosan 1:1 z različnimi koncentracijami heparina in hitosana.

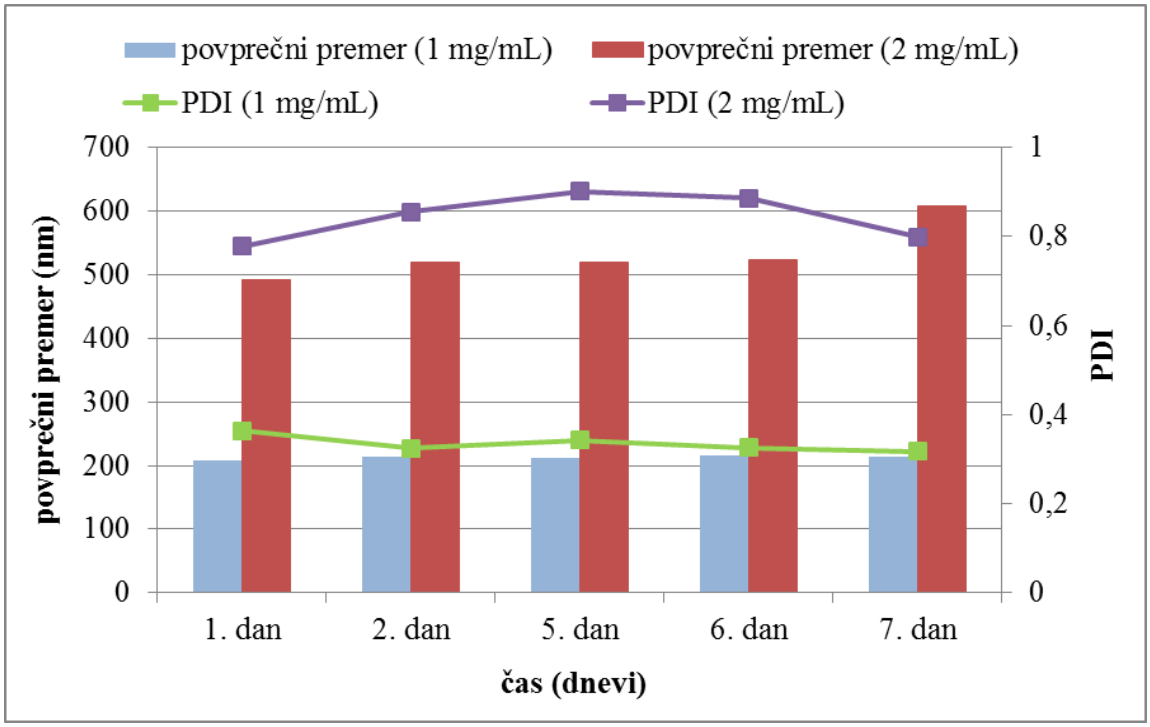
	heparin / hitosan 1:0,5	**heparin / hitosan 1:0,75**	**heparin / hitosan 1:1**			**heparin / hitosan 1:2**
			1 mg / mL	**2 mg / mL**	**5 mg / mL**	
Povprečni premer (nm)	9783	20260	208,8	492	1903	1454
PDI	1,000	1,000	0,364	0,778	0,770	1,000
Zeta potencial (mV)	/	/	43,6	46,6	33,0	/

V naših disperzijah nanodelcev smo želeli imeti čim višjo koncentracijo heparina in smo zato izdelali različne disperzije z različnimi koncentracijami heparina in hitosana ter tudi z različnimi masnimi razmerji. Kot lahko vidimo v preglednici IV, nam je uspelo izdelati disperzijo z nanometerskimi velikostmi delcev samo v dveh primerih: pri koncentracijah heparina in hitosana v disperziji ND, 1 mg/mL ter 2 mg/mL, pri masnem razmerju heparin/hitosan 1:1. V preglednici IV pri masnem razmerju heparin:hitosan = 1:1 lahko vidimo, kako povečanje koncentracije heparina in hitosana poveča velikost delcev.

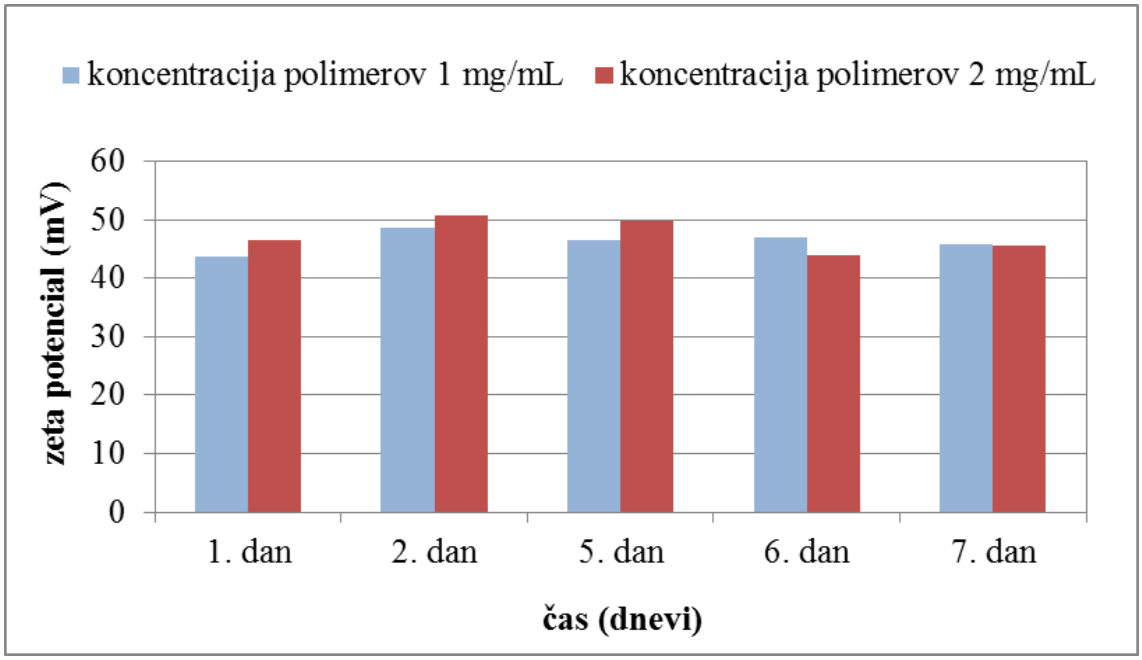
Najmanjši polidisperzni indeks (0,364) smo izmerili pri disperziji nanodelcev s koncentracijo polimerov 1 mg/mL (heparin/hitosan 1:1). PDI pri disperzijah s koncentracijo polimerov 2 mg/mL je bil že precej velik (0,778), kar predstavlja prisotnost

delcev različnih velikosti. PDI pri ostalih vzorcih pa je bil 1,000, kar kaže na popolnoma heterogen sistem.

Zeta potencial smo merili samo pri disperzijah nanodelcev z masnim razmerjem 1:1 (pri vseh treh koncentracijah), kajti pri drugih vzorcih nismo dobili delcev nanometerskih velikosti. Vrednost izmerjenega zeta potenciala (preglednica IV) je bila nad 40 mV, torej je večja od 30 mV, kar pomeni, da so bile disperzije nanodelcev s koncentracijami polimerov 1 mg/mL in 2 mg/mL fizikalno stabilne. Pri koncentraciji polimerov 5 mg/mL je bila vrednost izmerjenega zeta potenciala malenkost nižja od ostalih dveh disperzij ND, vendar to ni bilo pomembno, kajti pri tej seriji nismo dobili delcev nanometerskih velikosti.



Slika 12: Povprečni premer in PDI nanodelcev v disperzijah z masnim razmerjem heparin/hitosan 1:1 in koncentracijo polimerov 1 mg/mL ter 2 mg/mL v odvisnosti od časa.



Slika 13: Zeta potencial nanodelcev v disperzijah z masnim razmerjem heparin/hitosan 1:1 in koncentracijo polimerov 1 mg/mL ter 2 mg/mL v odvisnosti od časa.

Disperzijama z nanometerskimi velikostmi delcev smo nato spremljali stabilnost v obdobju enega tedna. Tekom tedna smo jim merili povprečni premer delcev, PDI in zeta potencial. Iz slik 12 in 13 lahko vidimo, da se povprečni premer delcev, PDI in zeta potencial s časom ne spreminjajo signifikantno, iz česar sklepamo na stabilnost nanodisperzij. Stabilnost disperzij ND je pomembna zaradi podaljšanega sproščanja heparina iz termoreverzibilnih hidrogelov po podkožni aplikaciji.

Glede na to, da ima disperzija nanodelcev s koncentracijo polimerov 2 mg/mL delce velike okoli 500 nm in PDI večji od 0,7 (prisotni delci zelo različnih velikosti), smo se za vgradnjo v hidrogele odločili za disperzijo ND s koncentracijo polimerov 1 mg/mL (heparin/hitosan 1:1). Tu so nanodelci velikosti okoli 200 nm, PDI 0,3 in zeta potencial nad 40 mV.

Za izdelavo termoreverzibilnih hidrogelov smo uporabili večje volumne raztopin hitosana (12,5 mL) in heparina (7,5 mL) od volumnov uporabljenih za ugotovitev optimalnih velikosti delcev in stabilnosti disperzije s čim večjo koncentracijo heparina. Disperzijam ND iz hitosana in heparina, ki smo jih izdelali v večji količini (20 mL), smo pravtako izmerili velikost delcev, PDI in zeta potencial. Dobljene vrednosti so bile:

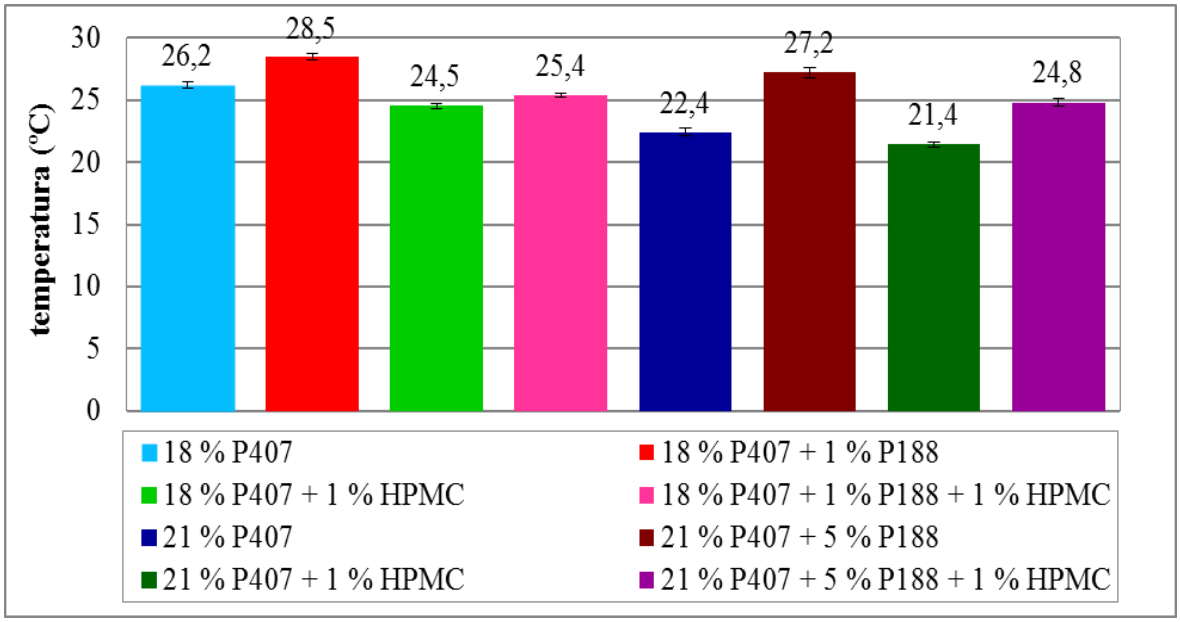
- povprečni premer: 300 nm,
- PDI: 0,462,
- ZP: 43,1 mV.

Sledila je interpretacija dobljenih vrednosti. Ugotovili smo, da vrednosti ustrezajo zahtevam za nanodelce. To disperzijo smo nato lahko uporabili kot medij za vgradnjo v termoreverzibilne hidrogele.

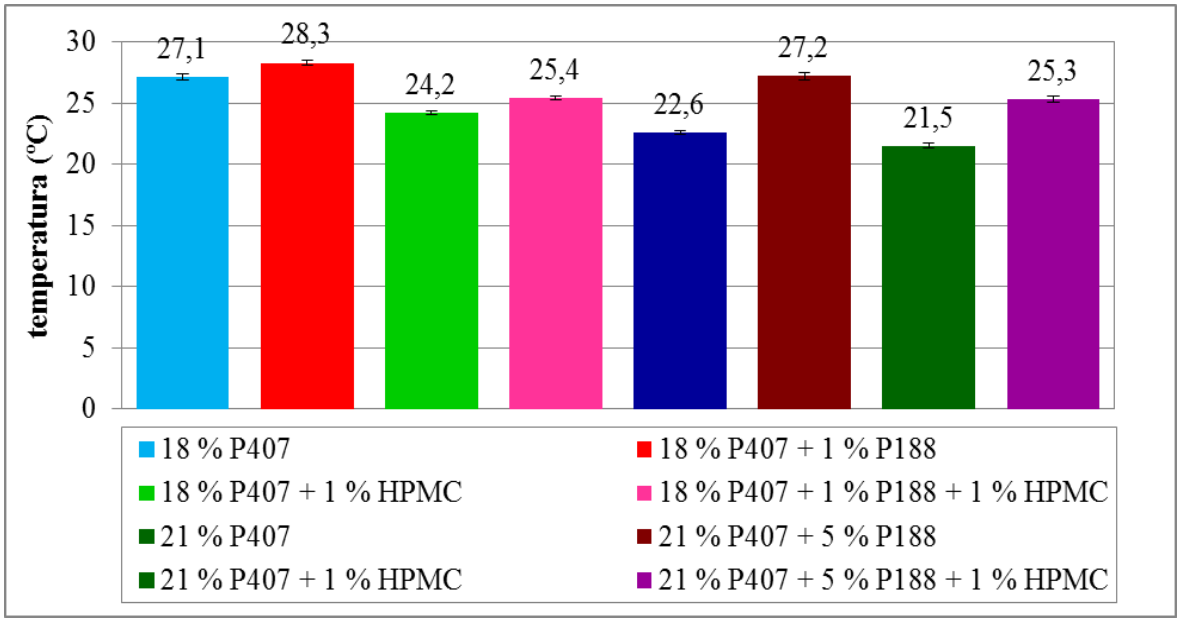
4.2 VREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

4.2.1 TEMPERATURA GELIRANJA

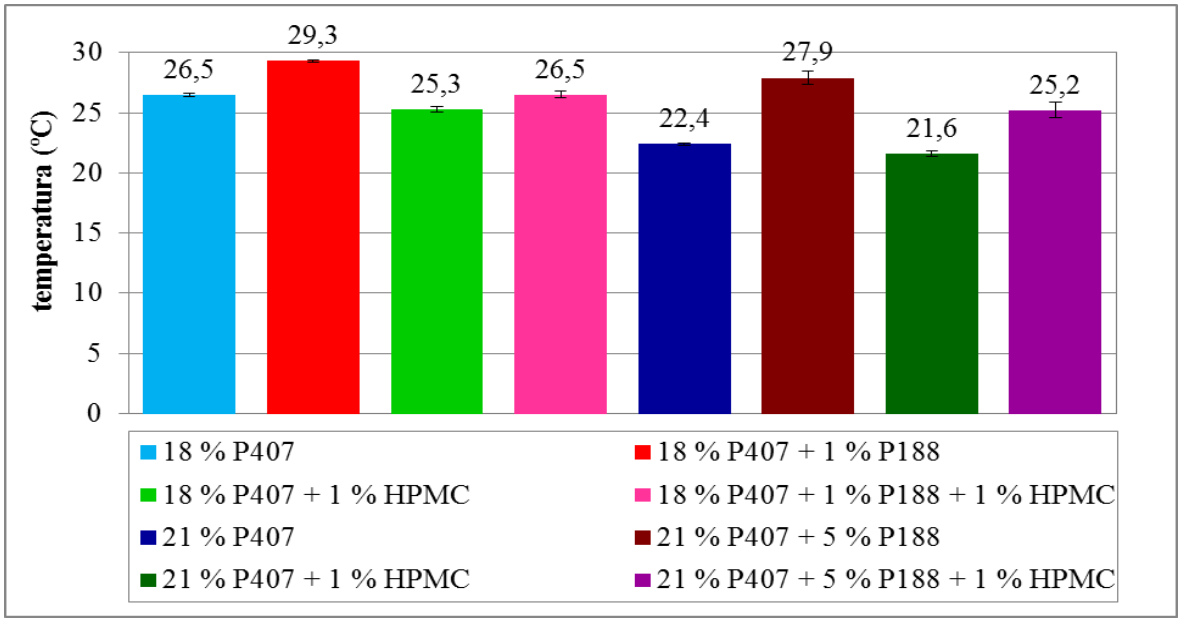
Temperatura geliranja je temperatura, pri kateri tekoča faza prehaja v gel. Le-ta mora biti nižja od telesne temperature, da ob aplikaciji v telo hidrogel gelira. Hkrati pa mora biti višja od sobne temperature (25 °C), da nimamo težav z njegovo aplikacijo (36). Po postopku opisanem v poglavju 3.3.2 smo izmerili temperaturo geliranja termoreverzibilnim hidrogelom. Izmerjene temperature geliranja, ki so povprečne vrednosti treh meritev, so predstavljene na slikah (14–16).



Slika 14: Temperatura geliranja termoreverzibilnih hidrogelov izdelanih v vodi.



Slika 15: Temperatura geliranja termoreverzibilnih hidrogelov izdelanih v raztopini heparina (1 mg/mL).



Slika 16: Temperatura geliranja termoreverzibilnih hidrogelov izdelanih v disperziji ND iz heparina in hitosana.

Vpliv koncentracije poloksamera 407 na temperaturo geliranja

Pri povišanju temperature pride zaradi porušenja vodikovih vezi med polimernimi verigami do tvorbe hidrofobnih interakcij med polioksipropilenskimi verigami in do tvorbe gela (4). Pri višji koncentraciji raztopine poloksamera imamo večjo količino hidrofobnega deleža v vzorcu kot pri nižji, zato je temperatura geliranja odvisna tudi od koncentracije poloksamera. Več je hidrofobnega deleža, večja je sila za združevanje polioksipropilenskih verig in posledično je potrebna nižja temperatura za geliranje (37).

Kot lahko vidimo iz naših izmerjenih temperatur (slike 14, 15, 16), imajo P407 z višjo koncentracijo nižje temperature geliranja kot nižje koncentracije P407, in sicer ne glede na uporabljeno tekočo komponento. Pri 21 % koncentraciji P407 smo izmerili temperature geliranja okoli 4 °C nižje kot pri 18 % koncentraciji P407. V vseh treh tekočih komponentah smo pri koncentraciji 18 % P407 izmerili temperaturo geliranja v ustreznem intervalu med sobno in telesno temperaturo. Pri koncentraciji 21 % P407 pa smo izmerili temperaturo geliranja nižjo od sobne temperature.

Vpliv poloksamera 188 na temperaturo geliranja

Polioksipropilenski del, to je hidrofoben del, predstavlja približno 30 % molekulske mase poloksamera 407. Poloksamer 188 pa vsebuje približno 20 % propilenoksida (3). Iz tega je razvidno, da P188 vsebuje manj hidrofobnega dela, zato je sila za združevanje polioksipropilenskih verig ter nastanek gela manjša. Temperatura geliranja P188 je posledično višja. Zaradi nastanka mešanih micelov bo temperatura geliranja vzorca, ki vsebuje P407 in P188 višja kot pri vzorcu, ki vsebuje samo P407.

Iz dobljenih temperatur geliranja (slike 14, 15, 16) lahko vidimo, da dodatek P188 k P407 poviša temperaturo geliranja ne glede na tekočo komponento. K 18 % P407 smo dodali 1 % P188, kar je povišalo temperaturo geliranja za povprečno 1,9 °C in je le-ta višja od 28 °C. Koncentraciji 21 % P407 pa smo dodali 5 % P188 in temperatura geliranja se je povišala za povprečno 5 °C in je višja od 27 °C. Iz tega lahko ugotovimo, da so temperature geliranja tako pri 18 % P407 kot tudi pri 21 % P407 ob dodanem P188 v intervalu med sobno in telesno temperaturo.

Vpliv HPMC na temperaturo geliranja

Dodatek HPMC k P407 zniža temperaturo geliranja. To je posledica njegove sposobnosti vezave na PEO verige v poloksameru. Ta vezava povzroči dehidracijo polimernih verig, kot tudi poveča povezavo sosednjih molekul z intermolekularnimi vodikovimi vezmi (38). Posledica je tvorba micelov pri nižji temperaturi. S slik 14, 15, 16 lahko vidimo, da se naši rezultati ujemajo s to ugotovitvijo. Vzorcem s P407 smo dodali 1 % HPMC, kar je povzročilo znižanje temperature geliranja v vseh vzorcih. Pri vzorcih s koncentracijo 18 % P407 so se temperature znižale za povprečno 2 °C ter so se gibale okoli sobne temperature. Pri vzorcih z 21 % koncentracijo P407 pa so se temperature geliranja znižale za povprečno 1 °C. Vidimo, da je pri višji koncentraciji P407 prišlo do manjšega znižanja temperature.

Vzorci, ki so vsebovali samo 21 % P407, so imeli temperature geliranja že nižje od sobne temperature. Dodatek HPMC je torej temperaturo geliranja še bolj oddaljil od intervala sobna–telesna temperatura.

Vpliv poloksamera 188 in HPMC na temperaturo geliranja

Vzorcu z 18 % koncentracijo P407 smo dodali 1 % P188 in 1 % HPMC. S slike 16 vidimo, da je temperatura geliranja tekšnega hidrogela izdelanega v disperziji ND enaka kot pri hidrogelu, ki je vseboval le 18 % P407. Sklepamo lahko, da sta se vpliva na spremembo temperature, ki sta jo npovzročila P188 in HPMC, izničila. V hidrogelih izdelanih v vodi in raztopini heparina (sliki 14,15) pa opazimo, da je temperatura geliranja hidrogela z dodanima P188 in HPMC nižja kot pri hidrogelu, ki vsebuje samo 18 % P407. Vpliv znižanja temperature geliranja, ki ga povzroči HPMC prevlada nad vplivom zvišanja temperature ki ga povzroči P188.

Vzorcu z 21 % koncentracijo P407 pa smo dodali 5 % P188 in 1 % HPMC. Zaradi višje koncentracije P188 od HPMC je prišlo do povišanja temperature geliranja. Izmerili smo višjo temperaturo geliranja od tiste, ki smo jo izmerili za 21 % P407. Zaradi dodanega HPMC je temperatura geliranja za približno 2 °C nižja od tiste izmerjene za hidrogel 21 % P407 + 5 % P188.

Izmerjene temperature geliranja v vseh vzorcih, ki vsebujejo P407, P188 in HPMC, se nahajajo v bližini sobne temperature.

Vpliv različnih tekočih komponent na temperaturo geliranja

Za izdelavo termoreverzibilnih hidrogelov smo uporabili tri različne tekoče komponente. Kot lahko vidimo na slikah 14, 15, 16, se temperature geliranja, glede na uporabljeno tekočo komponento, med seboj ne razlikujejo signifikantno. Iz naših meritev torej ne moremo sklepati, da ima tekoča komponenta kakšen pomemben vpliv na temperaturo geliranja. Najverjetnejši vzrok za to je zelo nizka koncentracija uporabljene raztopine heparina (1 mg/mL).

Znano je, da heparin v višjih koncentracijah (2,9 % m/m in 4,8 % m/m) zniža temperaturo geliranja, najverjetneje zaradi pospešene micelizacije. Heparin se s tvorbo vodikovih vezi, preko karboksilnih in sulfatnih skupin, veže na PEO verigo v poloksameru. Rezultat tega je navzkrižno povezovanje micelov (39).

Primerjava temperatur geliranja, ki so bile izmerjene po postopku, opisanem v poglavju 3.3.2, s temperaturami geliranja, ki smo jih odčitali iz grafov viskoznosti v odvisnosti od temperature

Našim vzorcem smo z reometrom izmerili viskoznost v odvisnosti od temperature (rezultati v poglavju 4.2.2). Iz grafov smo odčitali tudi temperaturo geliranja. V preglednici V so predstavljene primerjave temperatur geliranja, ki smo jih odčitali iz grafov s tistimi, ki smo jih izmerili po postopku, opisanem v poglavju 3.3.2. Rezultati kažejo, da se temperature geliranja, določene z obema metodama, med seboj dobro ujemajo.

Preglednica V: Primerjava temperatur geliranja, ki so bile izmerjene po postopku, opisanem v poglavju 3.3.2 (meritev), s temperaturami geliranja, ki smo jih odčitali iz grafov viskoznosti v odvisnosti od temperature (graf; slike 17, 19, 21).

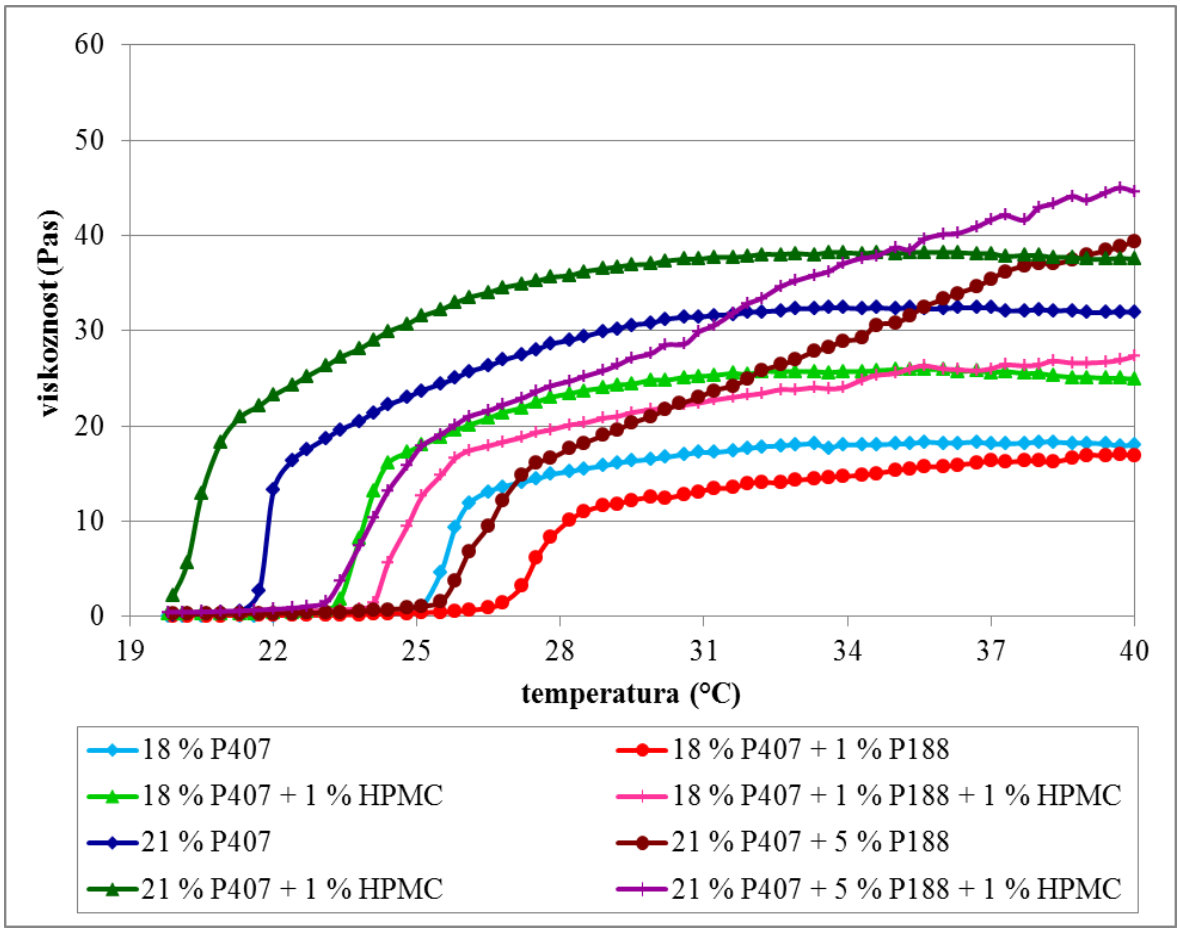
	Temperatura geliranja (°C)					
	v vodi		**v raztopini heparina**		**v disperziji ND**	
	meritev	graf	meritev	graf	meritev	graf
18 % P407	26,2	26,5	27,1	26,1	26,5	26,8
18 % P407 + 1 % P188	28,5	28,2	28,3	28,2	29,3	28,2
18 % P407 + 1 % HPMC	24,5	24,4	24,2	24,1	25,3	24,8
18 % P407 + 1 % P188 + 1 % HPMC	25,4	25,8	25,4	25,5	26,5	27,2
21 % P407	22,4	22,4	22,6	22,4	22,4	22,4
21 % P407 + 5 % P188	27,2	27,5	27,2	27,5	27,9	27,2
21 % P407 + 1 % HPMC	21,4	21,3	21,5	21,3	21,6	21,3
21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC	24,8	25,1	25,3	24,8	25,2	25,1

4.2.2 REOLOŠKO OVREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

Poloksameri so visokoelastične snovi. Vsebujejo značilnosti trdnih snovi (elastični modul) in značilnosti tekočin (viskozni modul). Pred temperaturo geliranja se nahajajo v tekoči obliki in imajo visoke viskozne lastnosti. Po temperaturi geliranja pa se jim povečajo elastične lastnosti in jih uvrščamo med gele z elastičnim obnašanjem (40).

Spremljali smo viskoznosti termoreverzibilnih hidrogelov pripravljenih v prečiščeni vodi, v raztopini heparina in v disperziji ND, v odvisnosti od temperature. Ker so pripravljeni hidrogeli namenjeni za aplikacijo v telo, smo spremljali tudi viskoznost hidrogelov pri telesni temperaturi (37 °C).

Viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov izdelanih v prečiščeni vodi



Slika 17: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih hidrogelov, pripravljenih v prečiščeni vodi, v odvisnosti od temperature.

❖ Vpliv koncentracije poloksamera 407 na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

Iz slike 17 lahko vidimo, da povišanje koncentracije poloksamera 407 poveča viskoznost vzorca. Z naraščajočo temperaturo viskoznost hidrogela z 21 % koncentracijo P407 narašča hitreje od viskoznosti vzorca z 18 % koncentracijo P407. Viskoznost 21 % P407 se začne strmo povečevati že pri 22 °C, kar sovpada s temperaturo geliranja tega hidrogela, viskoznost 18 % P407 pa začne naraščati po 25 °C. Pri višjih temperaturah vidimo, da se viskoznost 21 % P407 ustali nad 30 Pas, viskoznost vzorca 18 % P407 pa pod 20 Pas. Viskoznost vzorcev se ustali, ko le-ti gelirajo.

Tudi pri ostalih formulacijah, ki vsebujejo dodane P188 in HPMC, opazimo, da čim višja je koncentracija P407, tem večja je viskoznost vzorca.

❖ Vpliv poloksamera 188 na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

Če primerjamo 18 % P407 z 18 % P407 + 1 % P188 ter 21 % P407 z 21 % P407 + 5 % P188 (slika 17) vidimo, da dodatek P188 pri nižjih temperaturah zniža viskoznost hidrogelov. Z naraščanjem temperature pa začne viskoznost vzorcev z dodatkom P188 strmo naraščati. Bolj strmo narašča (večji naklon) viskoznost pri vzorcih, ki vsebujejo 5 % P188. Viskoznost vzorca 21 % P407 + 5 % P188 je pri temperaturi 35 °C že večja od viskoznosti hidrogela, ki vsebuje samo 21 % P407. Viskoznost vzorca 18 % P407 + 1 % P188 narašča bolj počasi in ne preseže viskoznosti vzorca 18 % P407. Vzrok za povišanje viskoznosti pri višjih temperaturah je najverjetneje dopolnjevanje med lastnostmi P407 in P188.

Takšno obnašanje hidrogelov z dodanim P188 je posledica lastnosti slednjega. Temperatura geliranja P188 je nekoliko višja od P407, zato se mu viskoznost poviša pri višjih temperaturah. Viskoznost P407 doseže plato že pri sobni temperaturi (odvisno od koncentracije P407), medtem ko viskoznost P188 doseže plato komaj po 60 °C. Višje so koncentracije P188 v vzorcu, hitrejše je naraščanje viskoznosti hidrogela. Ko dodamo P188 k P407 najverjetneje pride do dopolnjevalnega učinka P407 in P188, kar se kaže pri višjih temperaturah v povišanju viskoznosti. Pri nižjih temperaturah pa zaradi nizke viskoznosti dodanega P188, slednji zniža viskoznost hidrogela P407 (41).

Viskoznost vzorca 18 % P407 + 1 % P188 začne naraščati pri 27 °C in naglo narašča do temperature geliranja (28,2 °C). V nadaljevanju viskoznost vzorca narašča zelo počasi in se

ne ustali. Povišanje viskoznosti vzorca 21 % P407 + 5 % P188 se začne pri 26 °C, do 27,5 °C strmo narašča, nato pa se naklon naraščanja viskoznosti nekoliko zmanjša.
Iz slike 17 je razvidno tudi povišanje temperature geliranja hidrogela zaradi dodatka P188.

- Vpliv HPMC na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

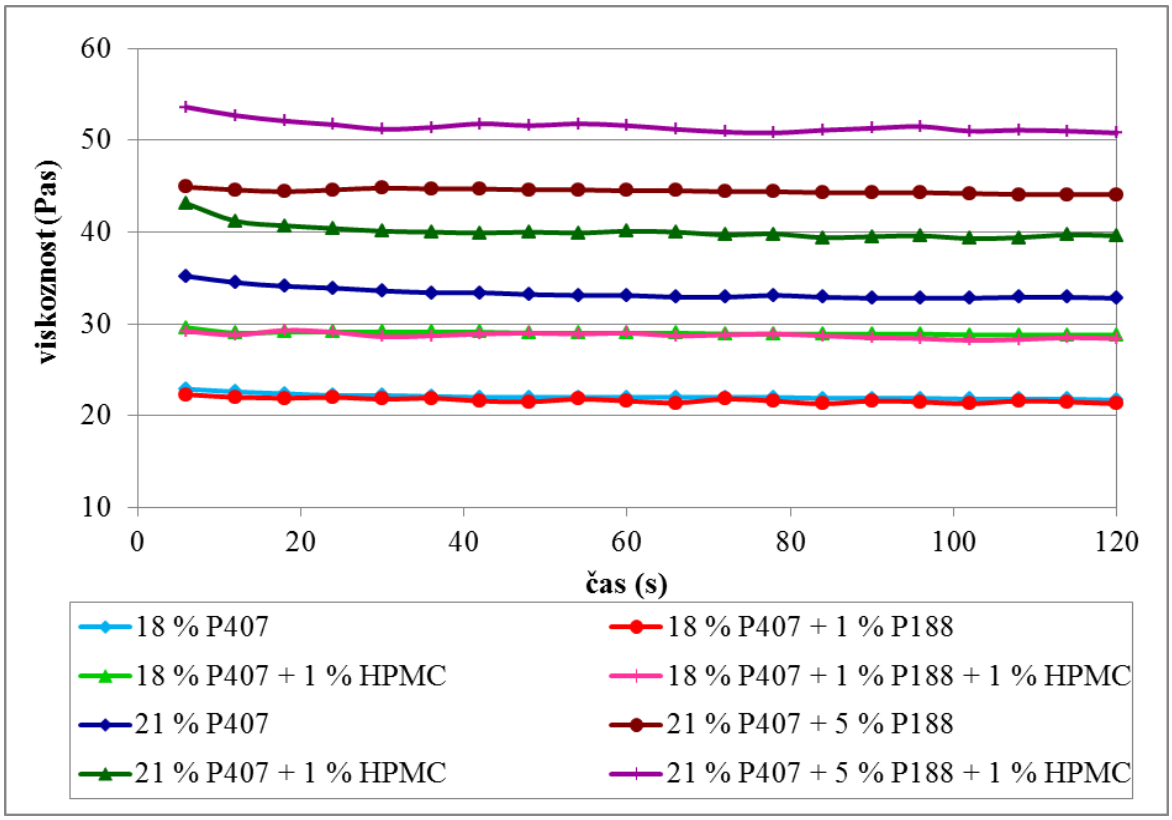
HPMC, kot visokoelastičen polimer, poviša viskoznost hidrogelov 18% P407 in 21% P407 (slika 17). Za razliko od P188, je povišanje viskoznosti zaradi HPMC konstantno enakomerno pri vseh temperaturah. Opazimo lahko tudi vpliv HPMC na znižanje temperature geliranja.
Viskoznost vzorca 18% P407 + 1% HPMC začne naraščati pri 23 °C ter se pri višjih temperaturah ustavi na 25 Pas. Začetek naraščanja viskoznosti hidrogela 21 % P407 + 15 HPMC je pri 20 °C. Viskoznost te formulacije vzorca se ustali malo pod 40 Pas.

- Vpliv poloksamera 188 in HPMC na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

Vpliv obeh dodanih snovi se dopolnjuje, kar lepo vidimo na sliki 17. Če primerjamo vzorec 21 % P407 + 5 % P188 z vzorcem 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC, opazimo kako HPMC poviša viskoznost hidrogela enakomerno pri vseh temperaturah. Vpliv dodanega P188 pa se najprej opazi pri znižanju viskoznosti vzorca v primerjavi s formulacijami vzorcev 21 % P407 in 21 % P407 + 1 % HPMC. Pri višjih temperaturah se vpliv P188 opazi s povišanjem viskoznosti in njenem strmem naraščanju. Viskoznost hidrogela 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC začne naraščati pri 23 °C. Do 25 °C (temperatura geliranja) je prisotno zelo naglo naraščanje viskoznosti, v nadaljevanju pa se naklon naraščanja viskoznosti nekoliko zmanjša, vendar ne doseže platoja.
Pri hidrogelih z 18 % P407 ter dodanima P188 in HPMC je vpliv enak, le da se viskoznost pri nižjih temperaturah ne zniža toliko, da bi bila manjša od samega vzorca 18 % P407. Manjše zmanjšanje viskoznosti pri nižjih temperaturah je najverjetneje posledica le 1 % P188, ki nima tolikšnega vpliva na viskoznost in temperaturo geliranja kot 5 % P188. Naraščanje viskoznosti pri tej formulaciji se začne pri 24 °C ter do 26 °C naglo narašča. Nato se naraščanje viskoznosti zmanjša, vendar se ne ustali.

Viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov pri telesni temperaturi

Izvedli smo tudi meritev viskoznosti termoreverzibilnih hidrogelov pri 37 °C, kajti le-ti so namenjeni za podkožno aplikacijo.



Slika 18: Viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v prečiščeni vodi, pri 37 °C.

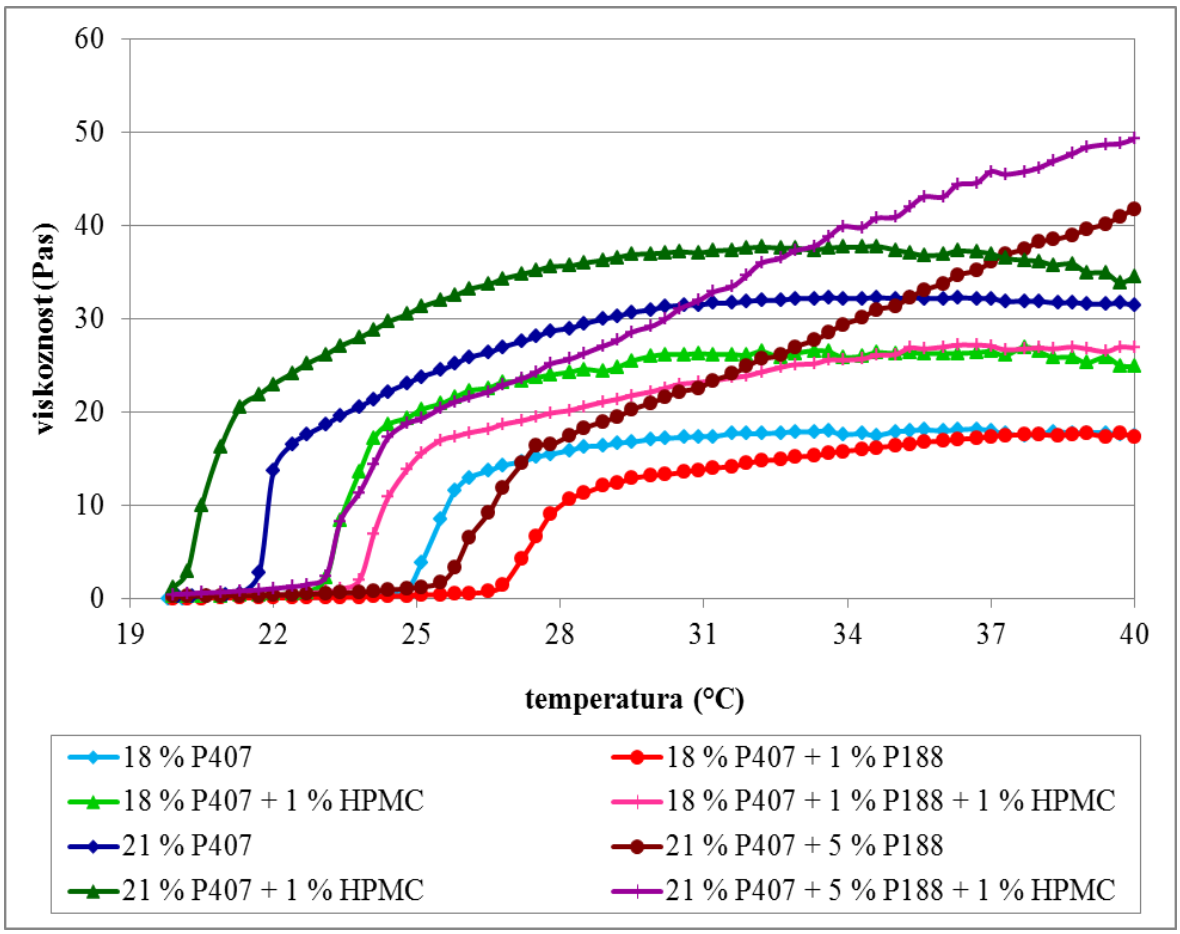
Na sliki 18 vidimo, da ima pri 37 °C najvišjo viskoznost (nad 50 Pas) hidrogel, ki vsebuje 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC. Najnižjo viskoznost (22 Pas) imata vzorca 18 % P407 in 18 % P407 + 1 % P188. Viskoznost pri 37 °C je enaka tudi pri vzorcih 18 % P407 + 1 % HPMC ter 18 % P407 + 1 % P188 + 1 % HPMC, in sicer okoli 29 Pas. Čeprav vzorci vsebujejo različne dodane snovi, so viskoznosti hidrogelov enake, kar pa je posledica dodanega P188 in njegove sposobnosti zvišanja viskoznosti pri višji temperaturi. Od formulacij s koncentracijo 21 % P407 ima pri telesni temperaturi najnižjo viskoznost vzorec z 21 % P407, in sicer 33 Pas. Viskoznost hidrogela z dodanim 1 % HPMC je okoli 40 Pas, viskoznost hidrogela z dodanim 5 % P188 pa 44 Pas. Najvišjo viskoznost ima vzorec 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC, in sicer okoli 50 Pas.

Če pogledamo sliko 17 ter viskoznosti vzorcev pri 37 °C (slika 18) lahko vidimo, da se viskoznosti hidrogelov ujemajo. Do majhnih razlik je prišlo zaradi vplivov samega postopka.

Viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov izdelanih v raztopini heparina s koncentracijo 1 mg/mL

- Vpliv heparina na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

Izdelava hidrogelov v raztopini heparina pri naših vzorcih ni povzročila pomembnih razlik v fizikalnih lastnostih, v primerjavi s hidrogeli, izdelanimi v vodi. Tudi v viskoznosti vzorcev ni razlik, kar vidimo, če primerjamo slike 17, 19 ter 21.



Slika 19: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih hidrogelov, pripravljenih v raztopini heparina (1 mg/mL), v odvisnosti od temperature.

❖ Vpliv koncentracije poloksamera 407 na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

Pri merjenju viskoznosti vzorcev izdelanih v vodi smo ugotovili, da povečanje koncentracije P407, poviša viskoznost hidrogela. To lahko potrdimo tudi pri vzorcih izdelanih v raztopini heparina (slika 19). Če primerjamo slike 17, 19 in 20 vidimo, da ni večjih razlik v viskoznosti vzorcev 18 % P407 ter 21 % P407 v odvisnosti od uporabljenega disperznega medija. Začetek naraščanja viskoznosti vzorca 18 % P407 je pri 25 °C. Viskoznost se pri višjih temperaturah ustali pri 18 Pas. Pri vzorcu 21 % P407 se naraščanje viskoznosti prične pri 22 °C, pri višjih temperaturah pa doseže plato, ki znaša 32 Pas.

❖ Vpliv poloksamera 188 na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

Enako kot pri merjenju viskoznosti hidrogelov izdelanih v vodi, dodatek P188 pri nižjih temperaturah zniža viskoznost v primerjavi z vzorcema, ki vsebujeta le P407. Z višanjem temperature pa dodatek P188 poveča viskoznost vzorcev. Pri 21 % P407 je naraščanje viskoznosti zaradi 5 % koncentracije P188 bolj strmo kot pri 18 % P407, kjer je dodan le 1 % P188. Na sliki 19 je viden tudi vpliv P188 na temperaturo geliranja. Zaradi povišanja le-te se začne viskoznost povečevati pri višjih temperaturah.

Hidrogelu s sestavo 18 % P407 + 1 % P188 se viskoznost začne povečevati pri 27 °C. Po temperaturi geliranja (28,2 °C) se viskoznost povečuje zelo počasi. Viskoznost za vzorec 21 % P407 + 5 % P188 prične naraščati pri 26 °C in do temperature 27,5 °C naglo narašča. Z nadaljnjim segrevanjem vzorca viskoznost še vedno narašča, a počasneje.

❖ Vpliv HPMC na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

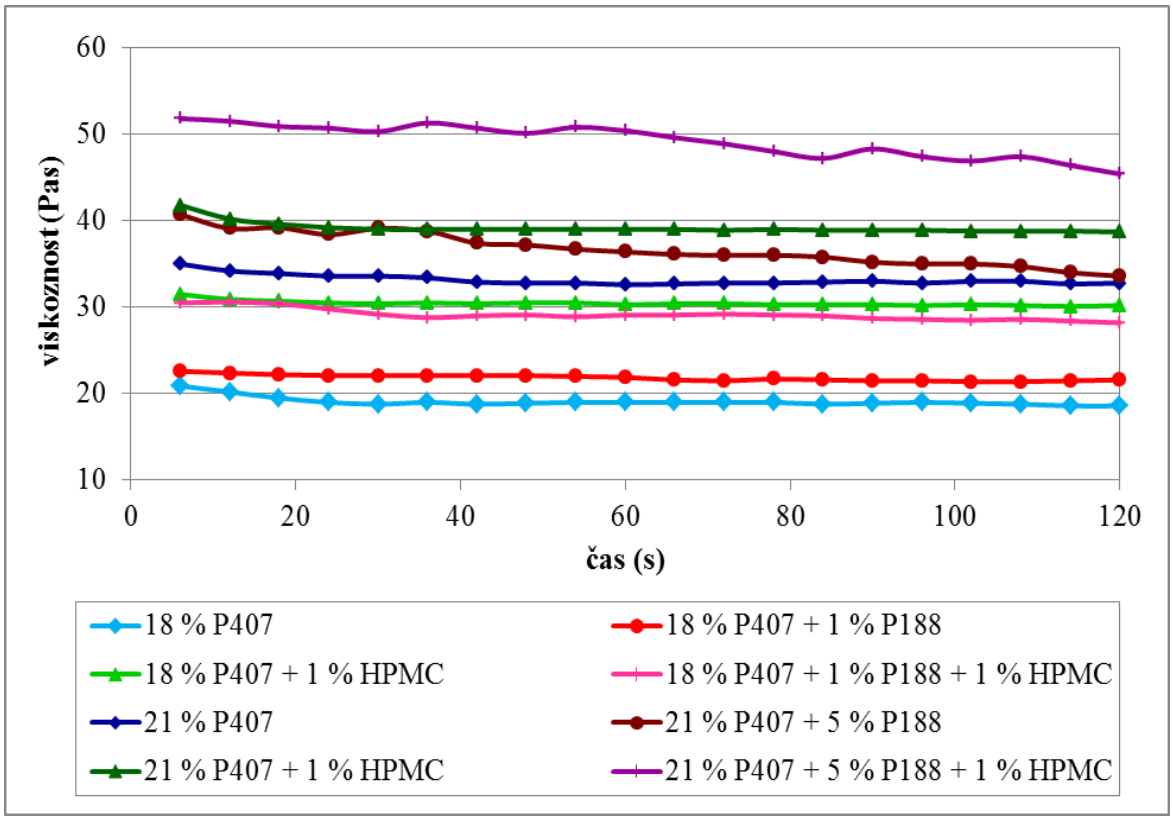
HPMC poviša viskoznost vzorcev in zniža temperaturo geliranja, kar lahko razberemo s slike 19. Viskoznost vzorca 18 % P407 + 1 % HPMC prične naraščati pri 23 °C. Najvišja dosežena vrednost viskoznosti je 26 Pas. Za hidrogel 21 % P407 + 1 % HPMC se viskoznost začne poviševati pri 20 °C ter se poviša do največ 38 Pas.

❖ Vpliv poloksamera 188 in HPMC na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

Viskoznost vzorca 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC narašča s temperaturo hitreje kot pri 18 % P407 + 1 % P188 + 1 % HPMC (slika 19). Vzrok je 5 % koncentracija P188, ki pri višjih temperaturah povzroči hitrejše naraščanje viskoznosti.

Viskoznost vzorca 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC začne naraščati pri 23 °C. Do temperature 24,8 °C (temperatura geliranja) viskoznost naglo narašča, nato nekoliko počasneje, vendar se ne ustali. Viskoznost hidrogela 18 % P407 + 1 % P188 + 1 % HPMC pa začne naraščati pri 24 °C. Do temperature geliranja, ki znaša 25,5 °C, je to poviševanje viskoznosti naglo, nato pa se naraščanje viskoznosti upočasni.

Viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov pri telesni temperaturi



Slika 20: Viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v raztopini heparina, pri 37 °C.

Vzorci izdelani v raztopini heparina (slika 20) imajo pri 37 °C podobne vrednosti viskoznosti kot vzorci izdelani v vodi (slika 18) in v disperziji ND (slika 22). Tudi vrednosti viskoznosti pri 37 °C, ki jih odčitamo iz slik 19 in 20, se ujemajo med seboj. Do manjših sprememb pride zaradi vplivov posameznega postopka merjenja.

Viskoznost vzorcev 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC ter 21 % P407 + 5 % P188, izdelanih v raztopini heparina, s časom rahlo pada (slika 20). To je lahko posledica interakcije heparina s PEO verigami v P407 in P188. S tem se zmanjša nastajanje micelov med molekulami poloksamera, zaradi česar ima hidrogel pri višjih temperaturah manjše elastične lastnosti od hidrogelov, izdelanih v vodi in disperziji ND (39). Učinek pri hidrogelih 18 % P407 + 1 % P188 in 18 % P407 + 1 % P188 + 1 % HPMC najverjetneje ni viden zaradi nižje koncentracije obeh poloksamerov.

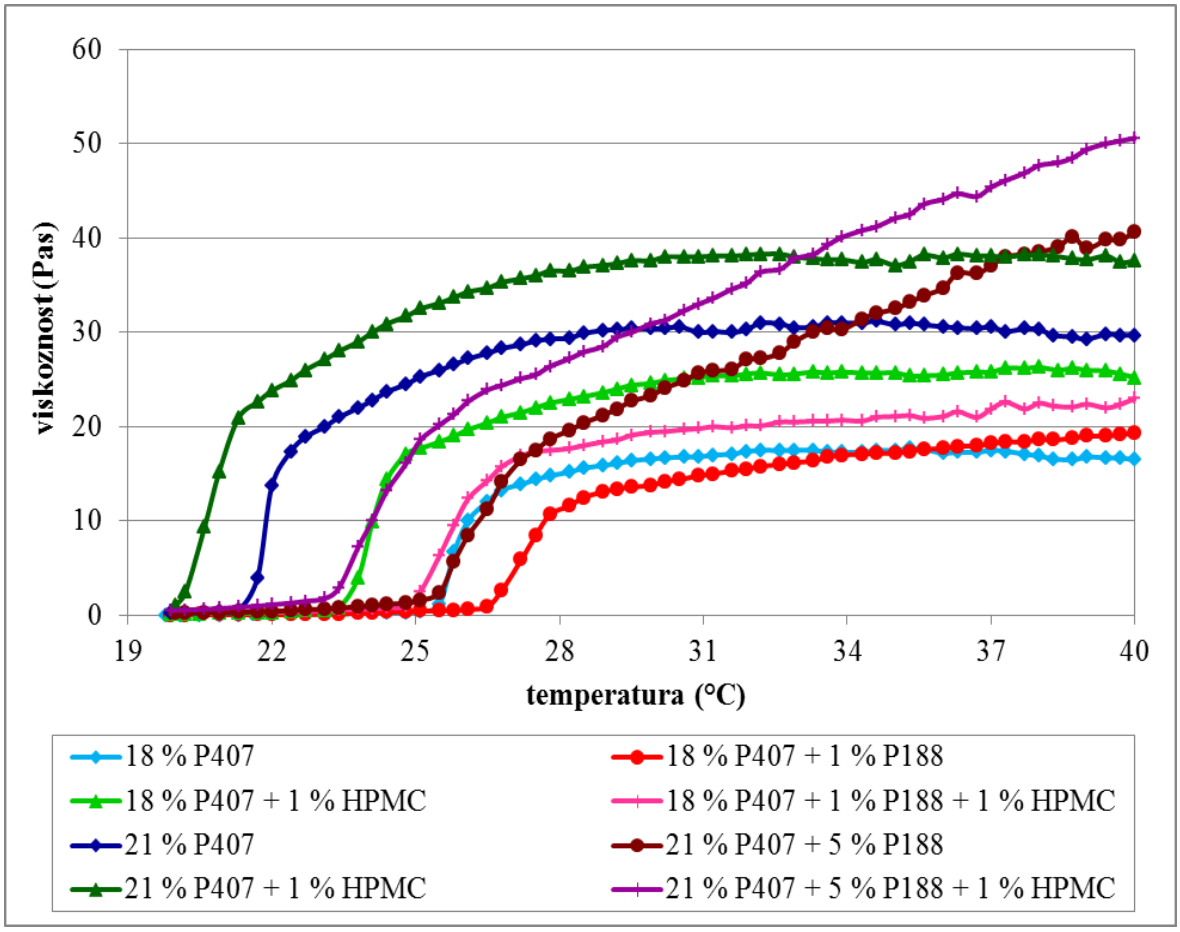
Izmed hidrogelov izdelanih v raztopini heparina ima pri 37 °C (slika 20) najnižjo viskoznost (19 Pas) vzorec 18 % P407, sledi mu vzorec 18 % P407 + 1 % P188 (22 Pas). Viskoznosti teh dveh vzorcev, izdelanih v vodi, sta se prekrivali (slika 18).

Viskoznost vseh hidrogelov, ki so vsebovali 21 % koncentracijo P407, je bila višja od vzorcev z 18 % koncentracijo P407. Tudi v primeru, ko smo uporabili raztopino heparina kot disperzni medij, je povišana koncentracija P407 povečala viskoznost hidrogelov. Med vzorci z 21 % koncentracijo P407, izdelanimi v raztopini heparina, ima pri 37 °C najmanjšo viskoznost vzorec, ki vsebuje 21 % P407. Le-ta znaša okoli 33 Pas. Viskoznost vzorca, ki vsebuje poleg P407 tudi HPMC znaša 40 Pas. Preostalima vzorcema z 21 % koncentracijo viskoznost med meritvijo upade, zato njene točne vrednosti ne moremo določiti.

Viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v disperziji nanodelcev hitosana in heparina, s koncentracijo polimerov 1 mg/mL in masnim razmerjem 1:1

- Vpliv disperzije ND na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

Po primerjavi slik 17, 19 in 21 lahko zaključimo, da nanodelci nimajo vpliva na viskoznost hidrogelov. Pri nekaterih vzorcih vidimo malenkost povišano viskoznost (21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC), pri nekaterih pa znižano (21 % P407), vendar so te razlike zelo majhne.



Slika 21: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih hidrogelov, pripravljenih v disperziji ND iz hitosana in heparina, v odvisnosti od temperature.

❖ Vpliv koncentracije poloksamera 407 na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

Vpliv koncentracije P407 na viskoznost hidrogelov je enak kot pri vzorcih izdelanih v vodi in raztopini heparina, in sicer večja koncentracija P407 poveča viskoznost vzorca. Viskoznost vzorca 18 % P407 začne po 25 °C naraščati ter se pri višjih temperaturah ustali pri 17 Pas. Na enak način narašča viskoznost vzorca 21 % P407, le da začne naraščati pod 22 °C in se ustali okoli 30 Pas.

❖ Vpliv poloksamera 188 na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

Na sliki 21 je opazen vpliv P188 na povišanje temperature geliranja ter na viskoznost hidrogelov (enak kot pri vzorcih izdelanih v vodi in raztopini heparina). Dodajanje P188 k 18 % P407 povzroči, da se začne viskoznost vzorca poviševati pri višjih temperaturah, in

sicer pri 27 °C. Viskoznost naglo narašča do temperature geliranja hidrogela (28,2 °C), nato narašča počasneje. Hidrogelu 21 % P407 + 5 % P188 se viskoznost začne poviševati pri 25,5 °C in strmo narašča do 27,2 °C, nato narašča počasneje.

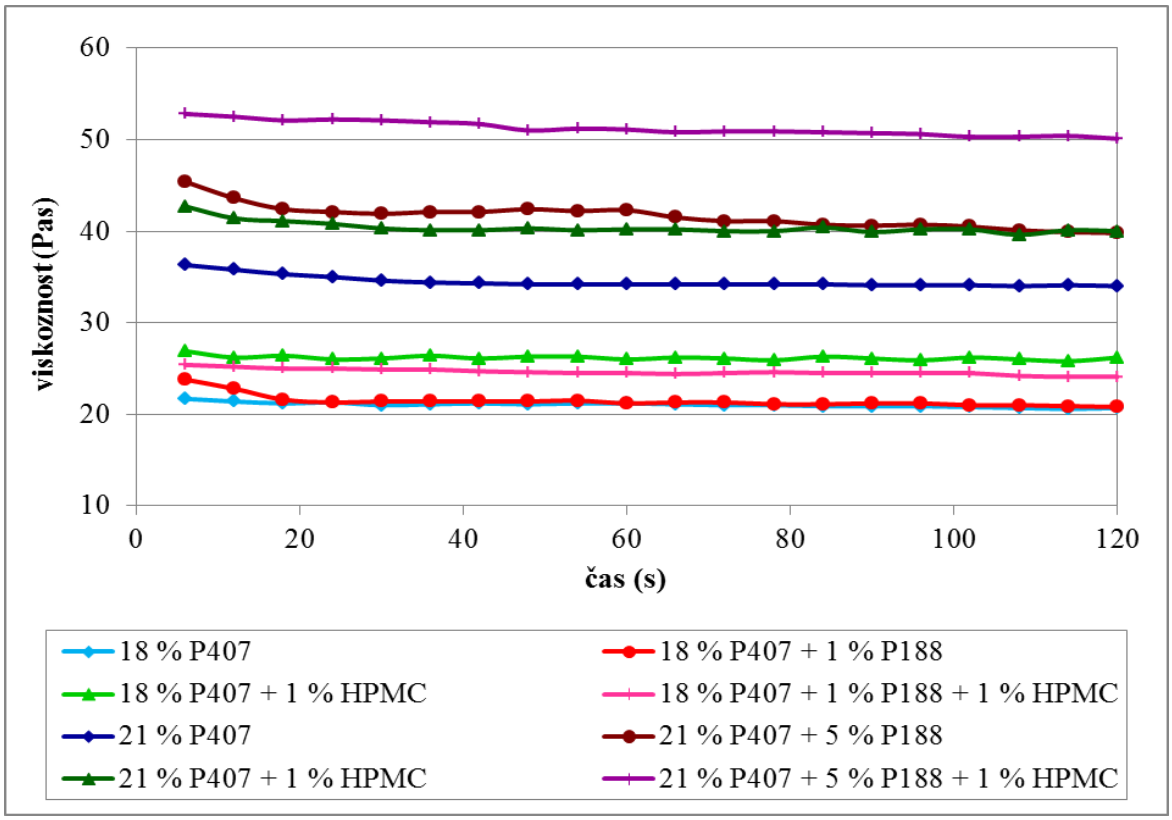
- Vpliv HPMC na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

HPMC zniža temperaturo geliranja, zato pomakne začetek naraščanja viskoznosti hidrogelov proti nižjim temperaturam. HPMC poveča tudi viskoznost hidrogelov (slika 21). Viskoznost vzorca 18 % P407 + 1 % HPMC začne naraščati malo pod 24 °C se ustali, ko doseže 26 Pas. Vzorcu 21 % P407 + 1 % HPMC pa se začne viskoznost poviševati, zaradi večje koncentracije P407, pri nižji temperaturi, in sicer pri 20 °C. Naraščanje viskoznosti tega hidrogela se ustavi pri 38 Pas.

- Vpliv poloksamera 188 in HPMC na viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov

Vzorcu 18 % P407 + 1 % P188 + 1 % HPMC se začne viskoznost povečevati pri 25 °C ter se, enako kot vzorcem izdelanim v vodi in raztopini heparina, naglo povečuje do temperature geliranja vzorca (27,2 °C). V nadaljevanju poviševanja temperature, viskoznost narašča zelo počasi. Vzorcu 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC se viskoznost začne poviševati pri 23 °C in strmo narašča tudi po tem, ko že doseže temperaturo geliranja.

Viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov pri telesni temperaturi



Slika 22: Viskoznost termoreverzibilnih hidrogelov, izdelanih v disperziji ND pri 37 °C.

Najvišjo viskoznost pri telesni temperaturi ima tudi v primeru vzorcev izdelanih v disperziji ND, formulacija 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC (slika 22). Če primerjamo vzorce z enako sestavo in različnima disperznima medijema (sliki 20 in 22), vidimo, da je viskoznost vzorca izdelanega v disperziji ND konstantna, medtem ko viskoznost vzorca, izdelanega v raztopini heparina, ves čas merjenja niha. Predvidevamo, da je vzrok za stabilizacijo sistema vgrajevanje nanodelcev v polimerno strukturo hidrogela in s tem njena stabilizacija (6). Ta vpliv je viden tudi pri vzorcu 21 % P407 + 5 % P188, kjer viskoznost hidrogela, pripravljenega v raztopini heparina (slika 20), s časom bolj niha od viskoznosti vzorca, izdelanega v disperziji ND (slika 22). Pri ostalih vzorcih tega vpliva ne vidimo. Predvidevamo, da je stabilizacija z ND bolj opazna pri višjih viskoznostih in je odvisna tudi od sestave hidrogela.

Najnižjo viskoznost pri telesni temperaturi sta imela vzorca 18 % P407 ter 18 % P407 + 1 % P188 izdelana v disperziji ND, in sicer 21 Pas (slika 22). Sledila sta mu hidrogel 18 % P407 + 1 % P188 + 1 % HPMC (25 Pas).

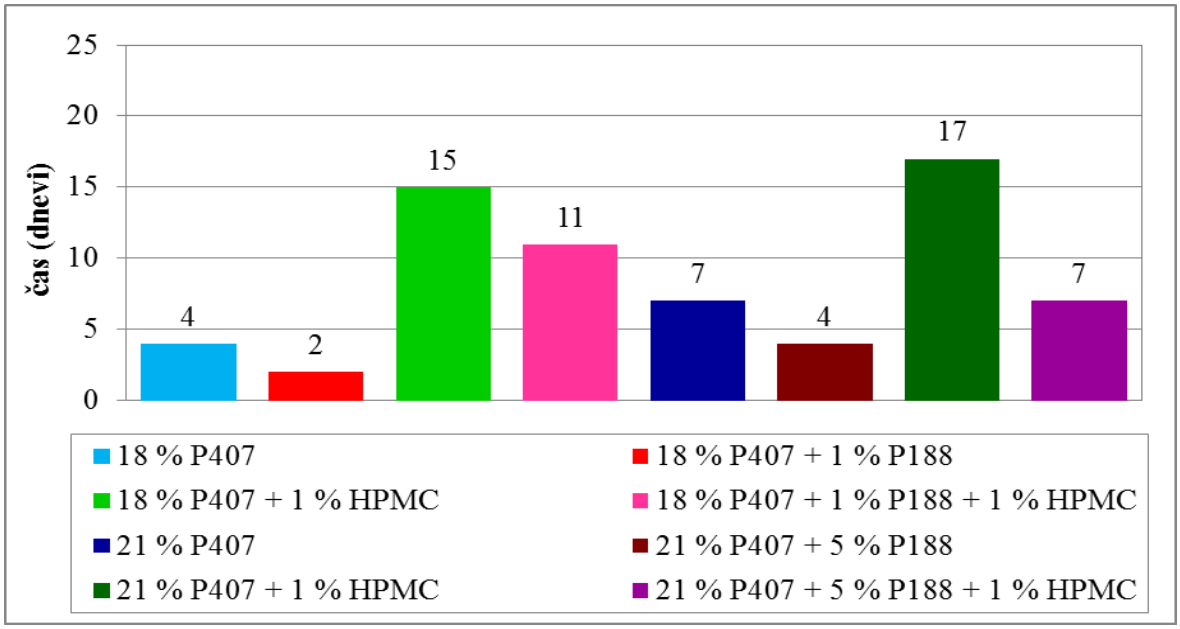
Najnižjo viskoznost izmed vzorcev z 21 % koncentracijo P407 je imel vzorec, ki je vseboval samo P407 (34 Pas). Le-ta pa je bila višja od najvišje viskoznosti vzorca z 18 % koncentracijo P407. Vzorec, ki je imel k P407 dodan 1 % HPMC, je imel vrednost viskoznosti 40 Pas, vzorec 21 % P407 + 5 % P188 pa 42 Pas. Enako kot pri vseh merjenjih viskoznosti pri 37 °C, smo izmerili najvišjo viskoznost (50 Pas) vzorcu 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC.

4.2.3 HITROST RAZTAPLJANJA TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

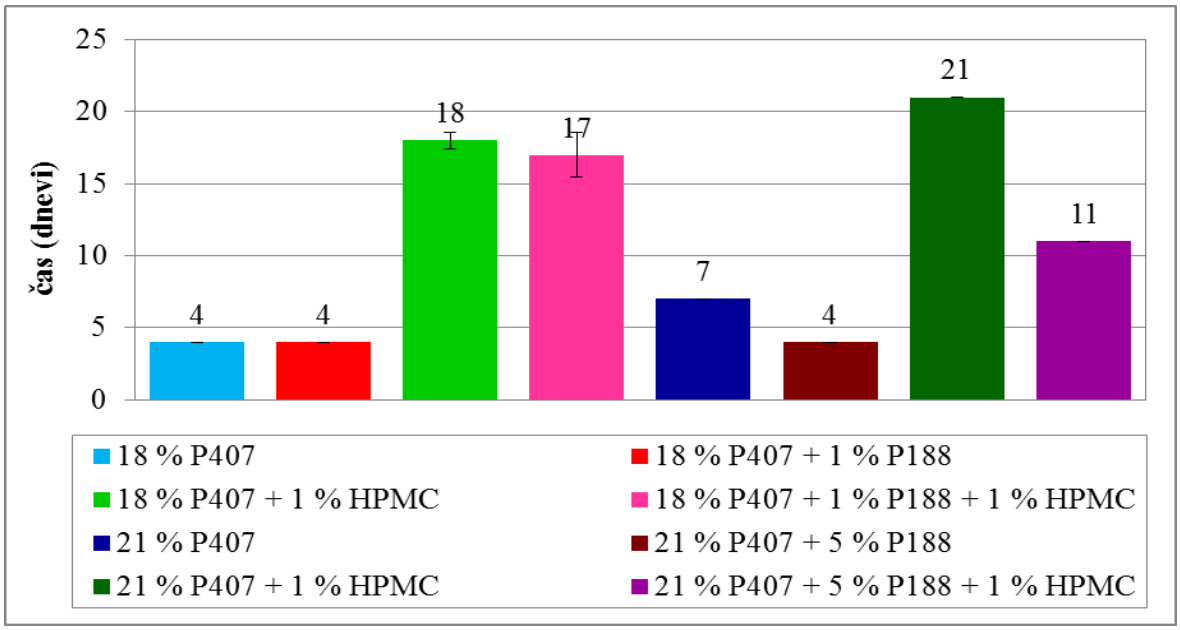
Hitrost sproščanja učinkovin je kontrolirana s hitrostjo površinske razgradnje poloksamera. Razgradnja poloksamera poteče zaradi hidratacije hidrofobnih stranskih skupin, ki se pretvorijo v hidrofilne z ionizacijo, protonacijo ali hidrolizo skupin (42).

Našim vzorcem smo določili hitrost raztapljanja v vodni kopeli pri 37 °C. Ti podatki so pomembni zaradi zaželjenega podaljšanega sproščanja heparina iz hidrogelov po podkožni aplikaciji. Spremljali smo, koliko dni je potrebno, da se raztopi 1 mL hidrogela, na katerega smo nalili 2 mL PBS.

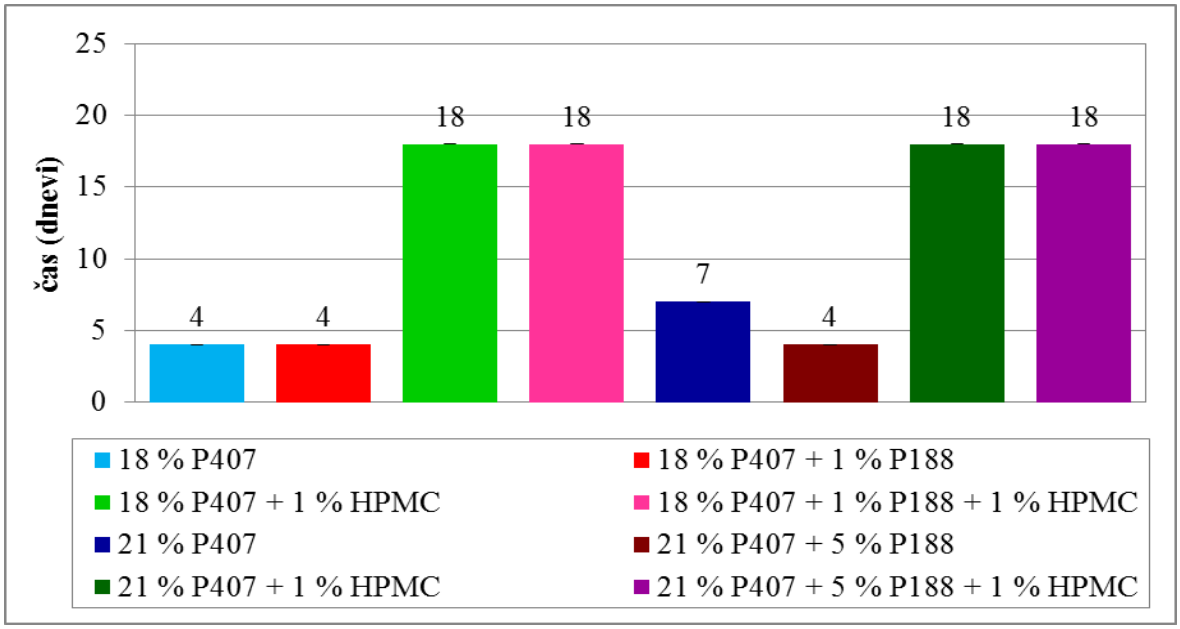
Hitrost raztapljanja v raztopini heparina in disperziji ND smo izvajali s tremi meritvami.



Slika 23: Število dni, ki so potrebni, da se raztopi 1 mL termoreverzibilnega hidrogela (vzorci izdelani v vodi).



Slika 24: Število dni, ki so potrebni, da se raztopi 1 mL termoreverzibilnega hidrogela (vzorci izdelani v raztopini heparina).



Slika 25: Število dni, ki so potrebni, da se raztopi 1 mL termoreverzibilnega hidrogela (vzorci izdelani v disperziji ND).

Vpliv koncentracije poloksamera 407 na hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov

S povečanjem koncentracije poloksamera 407 se podaljša čas, ki je potreben, da se raztopi 1 mL hidrogela (slike 23–25). To pomeni, da se z zvečanjem koncentracije P407 zmanjša hitrost raztapljanja hidrogelov. Vzorci, ki vsebujejo 18 % P407 (v vseh treh medijih), se v PBS raztopijo v štirih dneh. Hidrogeli z 21 % P407 pa za popolno raztopitev potrebujejo sedem dni.

Pri višjih koncentracijah P407 je prisotno večje število micelov, razdalje med njimi so krajše, število vezi med njimi pa je večje. Vse to poveča čvrstost hidrogela, kar upočasni hitrost raztapljanja (42). Vzorci z višjo koncentracijo P407 so imeli tudi višjo viskoznost.

Vpliv poloksamera 188 na hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov

Primerjava slik 23, 24 in 25 kaže, da se vzorci 21 % P407 + 5 % P188 izdelani v vseh medijih raztapljajo hitreje kot vzorci 21 % P407. Čas raztapljanja se skrajša iz sedem na štiri dni. Čeprav ima vzorec 21 % P407 + 5 % P188 pri 37 °C višjo viskoznost (slika 18) od vzorcev 21 % P407 ter 21 % P407 + 1 % HPMC, pa je njegova hitrost raztapljanja

veliko hitrejša. Hidrogel 21 % P407 potrebuje za raztapljanje sedem dni, hidrogel 21 % P407 + 1 % HPMC od 17 do 21 dni, hidrogel 21 % P407 + 5 % P188 pa štiri dni (slike 23–25). Vzrok je verjetno v tem, da z dodatkom P188 k P407 povečamo število hidrofilnih verig PEO in tako pospešimo hitrost raztapljanja.

Vzorci 18 % P407 + 1 % P188 izdelani v vodi so potrebovali za raztapljanje dva dni, hidrogeli izdelani v raztopini heparina in disperziji ND pa štiri dni. Predvidevamo, da na razliko vpliva vrsta uporabljene tekoče komponente. Pri teh vzorcih ne opazimo vpliva P188, vzrok je lahko njegova premajhna koncentracija (1 %).

Vpliv HPMC na hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov

Dodatek HPMC vzorcem zelo podaljša čas, ki je potreben za raztopitev 1 mL hidrogela (slike 23–25). To pomeni, da HPMC zmanjša hitrost raztapljanja. Pri vzorcih je majhno odstopanje v dnevih, ki so potrebni, da se hidrogel raztopi. Hidrogeli 18 % P407 so potrebovali za raztapljanje od 15 do 18 dni, hidrogeli 21 % P407 pa od 17 do 21 dni.

Če pogledamo viskoznosti pri 37 °C vzorcev 18 % P407 + 1 % HPMC, 21 % P407 in 21 % P407 + 5 % P188 (slike 18, 20, 22), vidimo, da imata hidrogela z 21 % P407 precej višjo viskoznost kot hidrogel z 18 % P407 + 1 % HPMC. Kljub temu se slednji raztaplja počasneje. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da viskoznost ni toliko pomembna kot sestava hidrogela.

Vpliv poloksamera 188 in HPMC na hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov

Hidrogeli 18 % P407 + 1 % P188 + 1 % HPMC izdelani v vodi (slika 23) so potrebovali za raztapljanje 11 dni, hidrogeli izdelani v raztopini heparina in disperziji ND pa 17 oziroma 18 dni (sliki 24, 25).

Pri vzorcih 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC (slike 23–25) opazimo, da je bila hitrost raztapljanja pri vseh treh tekočih medijih različna. Čas raztapljanja za vzorce, izdelane v vodi, je bil sedem dni. Vzorci, izdelani v raztopini heparina, so potrebovali za raztapljanje 11 dni, vzorci izdelani v disperziji ND pa 18 dni. Sklepamo na vpliv tekočih komponent na hitrost raztapljanja. Nanodelci se vežejo v strukturo polimera ter s tem zmanjšajo hitrost vdiranja vode v hidrogel in njegovo raztapljanje (6). Heparin vstopa v interakcije z

molekulami poloksamera in tako prepreči medsebojno povezovanje verig poloksamera. S tem se zmanjša čvrstost hidrogela in njegovo raztapljanje je hitrejše (39).

Hidrogeli 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC izdelani v vodi in raztopini heparina so se raztopili hitreje od hidrogelov 21 % P407 + 1 % HPMC (sliki 23, 24). Če pa pogledamo njihove viskoznosti pri 37 °C (sliki 18, 20) opazimo, da je viskoznost hidrogelov 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC višja od viskoznosti hidrogelov 21 % P407 + 1 % HPMC. P188 poveča hitrost raztapljanja hidrogelov.

Vpliv različnih tekočih komponent na hitrost raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov

S slik 23–25 je razvidno, da so se hidrogeli (razen 18 % P407, 21 % P407 in 21 % P407 + 5 % P188) izdelani v vodi raztapljali hitreje od hidrogelov izdelanih v raztopini heparina in disperziji ND. Iz tega lahko sklepamo, da heparin in disperzija ND upočasnita hitrost raztapljanja hidrogelov. Med vzorci izdelanimi v raztopini heparina in disperziji ND ni bilo razlik v hitrosti raztapljanja (izjema 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC).

5. SKLEP

Z metodo polielektrolitnega kompleksiranja smo izdelali nanodelce iz hitosana in heparina različnih masnih razmerij heparin/hitosan (1:0,5; 1:0,75; 1:1; 1:2). Disperzije nanodelcev z masnim razmerjem 1:1 smo izdelali še s tremi različnimi koncentracijami polimerov (1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL). Prišli smo do sledečih zaključkov:

- delci nanometerskih velikosti so nastali le pri masnem razmerju heparin/hitosan 1:1, in sicer pri koncentracijah polimerov 1 mg/mL (208,8 nm) ter 2 mg/mL (492 nm).
- Polidisperzni indeks je bil najnižji pri nanodelcih z masnim razmerjem 1:1 in koncentracijo polimerov 1 mg/mL, in sicer 0,364. Pri ostalih disperzijah je bil večji od 0,7, kar kaže na prisotnost delcev različnih velikosti.
- Zeta potencial smo merili samo pri nanodelcih z masnim razmerjem heparin/hitosan 1:1. Ta je bil med 33 do 46,6 mV. Ker je višji od 30 mV, to kaže na fizikalno stabilnost disperzije.
- Disperziji ND s koncentracijami polimerov 1 mg/mL in 2 mg/mL sta bili fizikalno stabilni v obdobju enega tedna, kajti njuna velikost delcev, PDI in zeta potencial se niso bistveno spremenili.
- Ugotovili smo, da na nastanek nanodelcev vplivata masno razmerje heparin/hitosan ter koncentracija heparina in hitosana.
- Na podlagi dobljenih fizikalnih vrednosti smo kot tekočo komponento hidrogelov izbrali disperzijo ND z masnim razmerjem 1:1 in koncentracijo 1 mg/mL.

Termoreverzibilne hidrogele smo izdelali s tremi različnimi tekočimi komponentami (voda, raztopina heparina s koncentracijo 1 mg/mL in disperzija ND iz hitosana in heparina). Osnovni polimer za izdelavo hidrogelov je bil poloksamer 407, kateremu smo dodali poloksamer 188 in/ali HPMC. Hidrogelom smo nato določili temperaturo geliranja, hitrost raztapljanja in jim z reometrom izmerili viskoznost. Spremljali smo spreminjanje viskoznosti v odvisnosti od temperature ter viskoznost pri 37 °C.

- Višja koncentracija poloksamera 407 zniža temperaturo geliranja, upočasni hitrost raztapljanja ter poveča viskoznost hidrogela.

- Dodatek poloksamera 188 k poloksameru 407 poviša temperaturo geliranja in poviša hitrost raztapljanja hidrogelov. Pri nižjih temperaturah zniža viskoznost hidrogelov, pri višjih temperaturah pa jo poviša.
- Dodan HPMC k poloksameru 407 zniža temperaturo geliranja, poviša viskoznost in upočasni raztapljanje hidrogelov.
- Ko smo dodali k poloksameru 407 oba dodatka (P188 in HPMC) sta oba prispevala k lastnostim hidrogela. Enkrat so se ti vplivi izničevali drugič spet dopolnjevali.
- Ugotovili smo, da na hitrost raztapljanja hidrogelov bolj vpliva njegova sestava kot viskoznost.
- Različne tekoče komponente večinoma niso imele pomembnega vpliva na fizikalne lastnosti hidrogelov. Izjema je hidrogel 21 % P407 + 5 % P188 + 1 % HPMC, pri katerem je vrsta medija vplivala na hitrost raztapljanja hidrogela.
- Z izbiro vrste poloksamera, njegove koncentracije in drugih dodanih snovi lahko vplivamo na temperaturo geliranja, viskoznost in hitrost raztapljanja hidrogelov.

Zaključimo lahko, da nam je uspelo izdelati termoreverzibilne hidrogele s polielektrolitnimi kompleksi heparina in hitosana.
Primerne lastnosti za podkožno aplikacijo heparina, to je ustrezno temperaturo geliranja, viskoznost in hitrost raztapljanja, imajo vzorci 18 % P407, 18 % P407 + 1 % P188 in 21 % P407 + 5 % P188.

6. LITERATURA

1. Hamidi M, Azadi A, Rafiei P: Hydrogel nanoparticles in drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60: 1638-1649.
2. Xuan J J, Balakrishnan P, Oh D H, Yeo W H, Park S M, Yong C S, Choi H G: Rheological characterization and in vivo evaluation of thermosensitive poloxamer-based hydrogel for intramuscular injection of piroxicam. Int J Pharm 2010; 395: 317-323.
3. Rowe R C, Sheskey P J, Owen S C: Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Edition, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington, 2006: 535-538, 346-349.
4. Escobar-Chávez J J, López-Cervantes M, Naik A, Kalia Y N, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A: Applications of thermoreversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. J Pharm Pharmaceut Sci 2006; 3: 339-358.
5. Lutrol®L and Lutrol F-Grades. Technical Information. BASF 2010.
6. Ur-Rehman T, Tavelin S, Gröbner G: Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. Int J Pharm 2011; 409: 19-29.
7. Kojarunchitt T, Hook S, Rizwan S, Rades T, Baldursdottir S: Development and characterisation of modified poloxamer 407 thermoresponsive depot systems containing cubosomes. Int J Pharm 2011; 408: 20-26.
8. Nair L M, Konkel J, Thomas M, Koberda M: Comparison of electrospray ionization mass spectrometry and evaporative light scattering detections for the determination of Poloxamer 188 in itraconazole injectable formulation. J Pharmaceut Biomed Anal 2006; 41: 725-730.
9. Obermajer N, Kos J, Kristl J: Nanodelci: sodobni dostavni sistemi za učinkovine in antigene celicam imunskega sistema. Farm Vestn 2007; 58: 39-44.
10. Nagavarma B V N, Hermant K S Y, Ayaz A, Vasudha L S, Shivakumar H G: Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles. Asian J Pharm Clin Res 2012; 5: 16-23.
11. Mirković B, Lah Turnšek T, Kos J: Nanotehnologija pri zdravljenju raka. Zdrav Vestn 2010; 79: 146-155.
12. Kristl J: Vpliv nanotehnologije na razvoj zdravil. Farm Vestn 2012; 63: 67-73.
13. Kikelj D: Antitrombotična zdravila pri starostnikih. Farm Vestn 2005; 56: 78-82.

14. Rang H P, Dale M M, Ritter J M, Flower R J: Rang and Dale's pharmacology. 6th Edition, Churchill Livingstone, Edinburg, 2007; 331-346.
15. http.//www.zdravila.net (Heparin Braun 5000 i.e./mL raztopina za injiciranje, SmPC); dostopano: december 2012.
16. http://de.wikipedia.org/wiki/Heparin; dostopano: december 2012.
17. Kerec Kos M: Uporaba hitosana v farmaciji. Farm Vestn 2006; 57: 287-291.
18. Erman A: Hitosan in možna uporaba v medicini. Zdrav Vestn 2011; 80: 489-498.
19. Hamman J H: Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. Mar Drugs 2010; 8: 1305-1322.
20. Etrych T, Leclercq L, Boustta M, Vert M: Polyelectrolyte complex formation and stability when mixing polyanions and polycations in salted media: A model study related to the case of body fluids. Eur J Pharm Sci 2005; 25: 281-288.
21. Koetz J, Kosmella S: Polyelectrolytes and Nanoparticles. Springer Laboratory, Berlin, 2007; 5-46.
22. Lin Y H, Chang C H, Wu Y S, Hsu Y M, Chiou S F, Chen Y J: Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-Helicobacter pylori therapy. Biomaterials 2009; 30: 3332-3342.
23. Sun W, Mao S, Mei D, Kissel T: Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and enoxaparin. Eur J Pharm Biopharm 2008; 69: 417-425.
24. Chen M C, Wong H S, Lin K J, Chen H L, Wey S P, Sonaje K, Lin Y H, Chu C Y, Sung H W: The characteristics, biodistribution and bioavailability of a chitosan-based nanoparticle system for the oral delivery of heparin. Biomaterials 2009; 30: 6629-6637.
25. Kuder D: Načrtovanje, izdelava in vrednotenje tablet s celekoksibom s prirejenim sproščanjem. Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2009.
26. http://de.wikipedia.org/wiki/Hydroxypropylmethylcellulose; dostopano: januar 2013.
27. Šmitek J: Parenteralno dajanje zdravil- intramuskularna injekcija. Obzor Zdr N 2005; 39: 63-71.
28. Kristl J, Gašperlin M, Jeras M: Izbrane vsebine iz kozmetologije (učbenik za kozmetologijo), Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2005.

29. Vaje iz fizikalne farmacije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2003, 39-52.
30. Zupančič Valant A: Uvod v reologijo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2007, 35-48.
31. Malvern Instruments Ltd. Size theory. Zetasizer Nano Series User Manual. MAN0317; 2004: 14-1 do 14-6.
32. Malvern Instruments Ltd. Zeta Potential theory. Zetasizer Nano Series User Manual. MAN0317; 2004: 2-6, 16-1 do 16-11.
33. http://www.salibaburnsinstitute.org/PROTOCOL.html; dostopano januar 2013.
34. Choi H G, Jung J H, Ryu J M, Yoon S J, Oh Y K, Kim C K: Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository. Int J Pharm 1998; 165: 33-44.
35. Radivojša M, et al.: Thermoreversible in situ gelling poloxamer-based systems with chitosan nanocomplexes for prolonged subcutaneous delivery of heparin: Design and in vitro evaluation. Eur. J. Pharm. Sci. (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.03.002
36. Gratieri T, Gelfuso G M, Rocha E M, Sarmento V H, Freitas O, Lopez R F V: A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. Eur J Pharm Biopharm 2010; 75: 186-193.
37. Hoare T R, Kohane D S: Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. Polymer 2008; 49: 1993-2007.
38. Yuan Y, Ying C, Li Z, Hui-ping Z, Yi-Sha G, Bo Z, Xia H, Ling Z, Xiao-hui W, Li C: Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide. Int J Pharm 2012; 430: 114-119.
39. Chung Y I, Lee S Y, Tae G: The effect of heparin on the gellation of Pluronic F-127 hydrogel. Colloid Surface Physicochem Eng Aspect 2006; 284-285: 480-484.
40. Ricci E J, Bentley M V L B, Farah M, Bretas R E S, Marchetti J M: Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. Eur J Pharm Sci 2002; 17: 161-167.
41. Agnese T, Brandenstein F, Cech T, Hertig M G, Soergel F: Determination of the gel point of Poloxamer using different rheological methods. BASF, The Chemical Company.

42. Zhang L, Parsons D L, Navarre C, Kompella U B: Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. J Control Release 2002; 85: 73-81.