

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE GRADIŠEK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE GRADIŠEK

**SPROŠČANJE HEPARINA IZ TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV S
HITOSANSKIMI NANOKOMPLEKSI**

**RELEASE OF HEPARIN FROM THERMOREVERSIBLE HYDROGELS WITH
CHITOSAN NANOCOMPLEXES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

ZAHVALA

Za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi in pisanju diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar. Prav tako se zahvaljujem Maji Radivojša, mag. farm., za usmeritve in nasvete pri delu v laboratoriju.

IZJAVA

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

Ljubljana, maj 2013

Jure Gradišek

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK.....	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD.....	1
1.1 NANODELCI.....	1
1.1.1 Nanokompleksi.....	1
1.1.2 Hitosan	2
1.2 ANTIKOAGULANTI	3
1.2.1 Heparin	4
1.3 POLIMERI	5
1.3.1 Biokompatibilni in biorazgradljivi polimeri.....	5
1.3.1.1 Poloksameri	6
1.3.1.2 HPMC.....	7
1.4 SUBKUTANA APLIKACIJA	8
1.5 ANALIZNE METODE	9
1.5.1 Spektrofotometrija.....	9
1.5.1.1 Azur A kolorimetrična metoda.....	11
1.5.2 Velikost nanokompleksov	11
1.5.3 Zeta potencial	12
1.6 POLIELEKTROLITNI NANOKOMPLEKSI	13
2 NAMEN DELA.....	15
3 EKSPERIMENTALNI DEL	16
3.1 MATERIALI.....	16
3.2 NAPRAVE	17
3.3 POSTOPKI IN METODE.....	17
3.3.1 Izdelava nanokompleksov iz hitosana in heparina	17
3.3.1.1 Vpliv različnega volumskega razmerja osnovnih raztopin hitosana in heparina na lastnosti nanokompleksov (masno razmerje 1:1)	18
3.3.1.2 Vpliv časa mešanja disperzij na lastnosti nanokompleksov	19
3.3.1.3 Vpliv koncentracije nanokompleksov v disperziji na njihove lastnosti	19

3.3.2 Fizikalno vrednotenje disperzij nanokompleksov	19
3.3.2.1. Merjenje velikosti delcev in polidisperznega indeksa.....	19
3.3.2.2 Merjenje zeta potenciala.....	20
3.3.2.3 Merjenje pH.....	20
3.3.3 Izdelava termoreverzibilnih hidrogelov z nanokompleksi iz hitosana in heparina	20
3.3.4 Raztapljanje termoreverzibilnih gelov z nanokompleksi	21
3.3.5 Sproščanje heparina iz termoreverzibilnih gelov z nanokompleksi	22
3.3.6 Sproščanje heparina iz disperzij nanokompleksov	22
3.3.7 Kvantitativno določanje heparina z Azur A kolorimetrično metodo.....	22
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	23
4.1 VREDNOTENJE FIZIKALNIH LASTNOSTI HITOSANSKIH NANOKOMPLEKSOV S HEPARINOM	23
4.1.1 Vpliv različnega volumskega razmerja osnovnih raztopin hitosana in heparina na fizikalne lastnosti nanokompleksov	23
4.1.2 Vpliv časa mešanja disperzij na fizikalne lastnosti nanokompleksov	24
4.1.3 Vpliv koncentracije nanokompleksov v disperziji na njihove fizikalne lastnosti	26
4.2 VREDNOTENJE SPROŠČANJA HEPARINA IZ HITOSANSKIH NANOKOMPLEKSOV IN TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV S HITOSANSKIMI NANOKOMPLEKSI	30
4.2.1 Izbor disperzij nanokompleksov za vgrajevanje v termoreverzibilne hidrokele	30
4.2.2 Izbor sestave termoreverzibilnih hidrogelov	31
4.2.3 Analitika heparina - priprava umeritvene krivulje	32
4.2.4 Sproščanje heparina iz termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi.....	33
4.2.4.1 Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi na sproščanje heparina	33
4.2.4.2. Vpliv koncentracije nanokompleksov v različnih formulacijah hidrogelov na sproščanje heparina	38
4.2.5 Sproščanje heparina iz hitosanskih nanokompleksov	42
4.2.6 Primerjava sproščanja heparina iz hitosanskih nanokompleksov in termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi	43
5 SKLEP	44
6 LITERATURA	46

POVZETEK

Nanodelci lahko zaradi svoje majhne velikosti v večjem obsegu prehajajo skozi biološke bariere in v telesu ostajajo daljši čas. Poleg tega povečajo biološko uporabnost ZU in zmanjšajo neželene učinke. Heparin je naravni polisaharid, ki ima v telesu ključno antikoagulatívno vlogo. Uporablja se za preprečevanje kapi, globoke venske tromboze, miokardnega infarkta ali pljučne embolije kot posledice poškodb ali operativnih posegov. Zaradi visokega negativnega naboja in velikosti molekule je aplikacija heparina omejena na parenteralno. Cilj našega dela je bil doseči podaljšano subkutano dostavo heparina, ki bi zahtevala manj pogosto aplikacijo.

V diplomski nalogi smo izdelali disperzije nanokompleksov heparina in hitosan hidroklorida (masno razmerje 1:1) z metodo polielektrolitnega kompleksiranja. Raziskovali smo vpliv različnega volumskega razmerja osnovnih raztopin, različnega časa mešanja in povečevanja končne koncentracije nanokompleksov v disperziji na povprečno velikost delcev, polidisperzni indeks, zeta potencial in pH vrednost. Izbrane disperzije s tremi različnimi koncentracijami nanokompleksov smo nato vgradili v termoreverzibilne hidrogelne iz poloksamera 407 brez ali z dodanim poloksamerom 188 in HPMC. V nadaljevanju smo spremljali potek sproščanja heparina iz samih nanokompleksov ter iz hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi v medij za sproščanje.

Ugotovili smo, da prisotnost gela v vseh treh formulacijah pri vseh koncentracijah upočasní začetno hitrost sproščanja heparina. Najbolj je to očitno pri gelih, ki poleg poloksamerov 407 in 188 vsebujejo tudi HPMC. Ko se geli popolnoma raztopijo, pa so odstotki sproščenega heparina primerljivi s tistimi v disperzijah. Zaključimo lahko, da predstavljajo termoreverzibilni hidrogeli z nanokompleksi heparina in hitosana obetaven sistem za subkutano aplikacijo heparina.

ABSTRACT

Nanoparticles due to their small size pass through biological barriers to a greater extent and remain in the body longer. In addition they increase bioavailability of the drug and reduce incidence of side effects. Heparin is a naturally occurring polysaccharide, which plays a key role in coagulation. It is used to prevent stroke, deep vein thrombosis, myocardial infarction or pulmonary embolism as a result of injury or operational procedures. Because of the high negative charge and size of the molecule the application of heparin is limited to parenteral. Our goal was to achieve extended subcutaneous delivery of heparin, which would require less frequent application.

In this thesis we developed dispersions of nanocomplexes with heparin and chitosan hydrochloride (weight ratio 1:1) made with polyelectrolyte complexation. We researched the impact of different volume ratio of stock solutions, different time mixing and increasing final concentration of nanocomplexes in the dispersion on the mean particle size, polydispersity index, zeta potential and pH value. Selected dispersions with three different concentrations of nanocomplexes were then incorporated in thermo-hydrogel composed of poloxamer 407 with or without the addition of polxamer 188 and HPMC. Than we monitored the release of heparin from nanocomplexes and from hydrogels with chitosan nanocomplexes to the medium.

We found that the presence of a hydrogel in all three formulations at all levels slows the initial release rate of heparin. This is most evident in the hydrogels, which contain poloksamer 407, 188 and HPMC. When the gels are completely dissolved the percentages of released heparin are comparable to those in the dispersions. In conclusion, thermo-reversible hydrogels containing nanocomplexes from heparin and chitosan present a promising system for subcutaneous administration of heparin.

SEZNAM OKRAJŠAV

AT III	antitrombin III
d	povprečni premer
DLS	dinamično sipanje laserske svetlobe
FT-IR	Fourierjeva transformacija infrardeče spektroskopije
Hep	heparin
Hit	hitosan
HPMC	hidroksimetilpropilceluloza
IR	infra rdeča svetloba
LDV	laserska Dopplerjeva velocimetrija
NMR	nuklearna magnetna resonanca
MM	molekulska masa
PBS	fosfatni pufer
PDI	polidisperzni indeks
PEK	polielektrolitni kompleksi
P188	poloksamer 188
P407	poloksamer 407
UV	ultravijolična svetloba
VIS	vidna svetloba
ZP	zeta potencial
ZU	zdravilna učinkovina

|

1 UVOD

1.1 NANODELCI

Nanodelci so kot dostavni sistem v zadnjem času predmet številnih raziskav. Zaradi velikosti (10-1000 nm) so njihove interakcije drugačne v primerjavi z mikro- oziroma makrosistemi, kar jim omogoča potovanje globlje v tkiva, prehod skozi epitelij in vstop v celice. (1)

Glavne prednosti nanodelcev za peroralno dajanje so:

- (a) nanodelci kot vehikel za zdravilne učinkovine nudijo zaščito pred kislinsko ali encimsko razgradnjo,
- (b) povečajo kontaktno in absorptivno površino, (2)
- (c) zaradi majhne velikosti lahko prehajajo skozi najmanjše kapilare, poleg tega se tudi izognejo hitremu odstranjevanju iz organizma s fagociti, kar jim omogoča daljše zadrževanje v krvnem obtoku,
- (d) izkazujejo možnost kontroliranega sproščanja zaradi biorazgradljivosti, pH in/ali temperaturne občutljivosti polimerov (materialov za izdelavo nanodelcev),
- (e) povečajo biološko uporabnost ZU in zmanjšajo neželene učinke. (3)

Nanodelci so sestavljeni iz nosilnega ogrodja in učinkovine. Nosilno ogrodje lahko tvorijo biokompatibilne polimerne makromolekule ali trdni lipidi. Glede na razporeditev ogrodja jih delimo na nanosfere in nanokapsule. Pri nanosferah je ogrodje prisotno po celotni prostornini nanodelca, pri nanokapsulah pa le na površini, tako da tvori polimerni film okoli trdne ali tekoče sredice. Učinkovina je v ogrodju nanodelcev raztopljena, vanj vključena ali adsorbirana na njegovo površino. Za izdelavo se uporabljajo različne metode: obarjanje polimerov, polimerizacija in prečno premreževanje makromolekul. Večina teh metod zahteva ostre pogoje, zato se veliko avtorjev odloča za uporabo milejših metod brez uporabe škodljivih organskih topil, intenzivnega mešanja in segrevanja. Med te prištevamo tudi metodo polielektrolitnega kompleksiranja. (1)

1.1.1 Nanokompleksi

Priprava nanodelcev pogosto zahteva pogoje, ki lahko poškodujejo intaktnost in funkcionalnost molekul. Pri tvorbi polielektrolitnih kompleksov (PEK) gre za spontano združevanje nasprotno nabitih ionov, zato organska topila ali intenzivno mešanje nista

potrebna. Zaradi močnih elektrostatskih interakcij (H-vezi, ionske interakcije) se molekule samostojno asociirajo v delce koloidnih velikosti, kateri tvorijo prosojno in fizikalno stabilno nanodisperzijo. (2)

Fizikalne in kemijske lastnosti (velikost delcev, ZP, pH) ter stabilnost disperzij nanokompleksov so odvisne od več dejavnikov, kot so ionska moč in pH disperznega medija, temperatura in čas mešanja, stopnja ionizacije, gostota naboja, razmerje med polimeri. Predvsem pa so lastnosti nastalih nanodelcev odvisne od lastnosti uporabljenih polimerov, njihove MM, koncentracije, volumskega/masnega razmerja. (4)

Šibki elektroliti z različnimi MM se kompleksirajo v nestehiometričnem razmerju: veriga osnovnega polimera je v kompleksu s krajšimi verigami nasprotno nabitega polimera. Močni elektroliti podobnih MM pa se večinoma kompleksirajo v stehiometričnem razmerju, zato je neto naboj enak nič, posledica pa je slabša topnost. (5)

Polielektolitni kompleksi so ravno zaradi milih pogojev priprave posebej primerni za dostavo različno nabitih bioaktivnih makromolekul (polisaharadi, nukleinske kisline in proteini). Na lastnosti nanodostavnega sistema najbolj vplivajo karakteristike uporabljenega polimera. (2)

1.1.2 Hitosan

Hitosan je biokompatibilen, biorazgradljiv in nizko toksičen kopolimer, katerega odlikujejo mukoadhezivnost in sposobnost odpiranja tesnih stikov. Zaradi teh lastnosti je predmet številnih raziskav, še posebej na področju pospeševanja absorpcije hidrofilnih makromolekul in ne-virusnega vnosa genov. Hitosan je naravni kationski polisaharid sestavljen iz naključnega števila enot D-glukozamina in N-acetil-D-glukozamina, povezanih z $\beta(1-4)$ vezjo. (2)

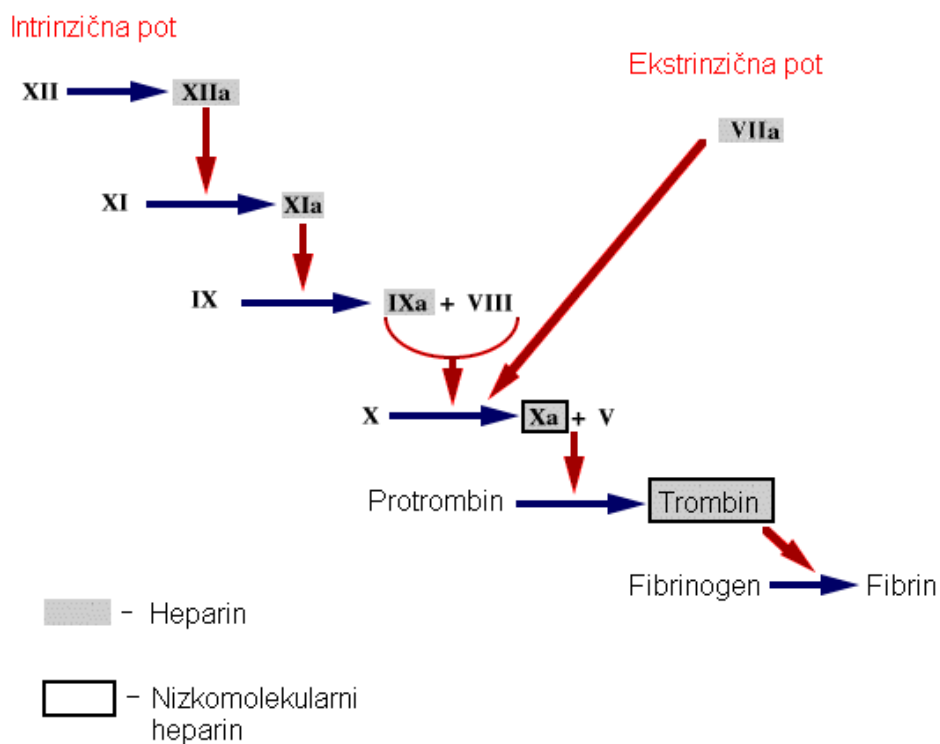
Pridobivajo ga z delno deacetilacijo hitina. Hitin, ki je za celulozo najbolj razširjen polimer v naravi, se nahaja v oklepkih rakov, nekaterih žuželkah in celičnih stenah nekaterih gliv. Struktura hitosana se lahko razlikuje po molekularski masi (50-200 kDa), stopnji deacetilacije (40-98%) ter viskoznosti. Predvsem stopnja deacetilacije določa njegov naboj (proste $-\text{NH}_3^+$ skupine) in posledično njegovo topnost. Kljub temu, da je hitosan neprimerno bolj topen od hitina, ostaja topnost problem hitosana. Zaradi navideznega $\text{pK}_a = 6,5$ je dobro topen v kisljih raztopinah (povečana protonacija aminoskupin), v alkalnem in nevtralnem pa je praktično netopen. Topnost povečamo z uporabo soli hitosana (glutamat, klorid). Hitosan je kompatibilen z veliko večino zdravilnih učinkovin in organskih spojin. Velik pozitivni naboj je odgovoren za nastanek kompleksov z negativno nabitimi spojinami (ZU), kar močno

spremeni fizikalno-kemijske značilnosti zdravila. To je, poleg drugih lastnosti, vodilo v povečano raziskovanje hitosana kot pomožne snovi za nadzorovano sproščanje in ciljano dostavo zdravilnih učinkovin. (6,7)

1.2 ANTIKOAGULANTI

Antikoagulantni so učinkovine, ki preprečujejo strjevanje krvi. V praksi se uporabljajo za preprečevanje zapletov s strjevanjem krvi v žilah (posledice udarcev, operativni posegi) z namenom preprečevanja kapi, globoke venske tromboze, miokardnega infarkta ali pljučne embolije. Zaradi narave učinkovine (visoka MM ter močan negativen naboj) je uporaba heparina (in novejših inhibitorjev trombina: argatroban, hirudin) omejena na intravensko aplikacijo, varfarin (tudi novejši dabigatran) pa se lahko uporablja kot peroralni antikoagulant. (8)

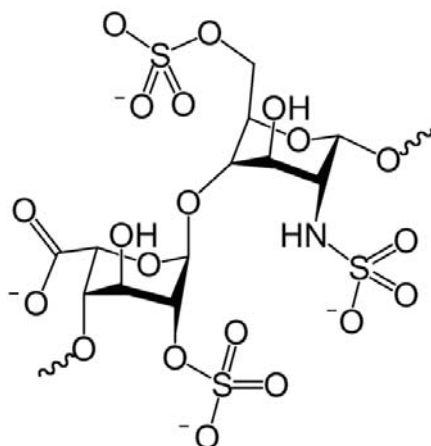
Mehanizem delovanja



Slika 1: Shematski prikaz strjevanja krvi (9)

Heparin deluje tako, da se veže na antitrombin 3 (AT III) in ga aktivira. AT III je naravno prisoten inhibitor faktorjev strjevanja krvi, ki deluje na več različnih faktorjev. Nizko molekularni heparin deluje podobno, le da ima znaten vpliv na faktor Xa, na ostale faktorje pa vpliva v manjši meri (slika 1). (8)

1.2.1 Heparin



Slika 2: Strukturna formula heparina (10)

Heparin je negativno nabit naravni polisaharid. Prisoten je v mnogih živih organizmih in se šteje za najbolj kompleksnega predstavnika glikozaminoglikanov. Za farmacevtsko industrijo ga še vedno pridobivajo iz sluznic mrtvih prašičev, krav in ovc, čeprav že obstajajo poskusi pridobivanja sinteznega. (10)

Pri heparinu gre za skupino sorodnih molekul (sulfonirani mukosaharidi), ki pa se razlikujejo v posameznih sladkorjih ter stopnji ionizacije, vendar za njih veljajo skupne značilnosti. Molekula heparina je sestavljena iz 20 do 200 1-4 povezanih disaharidov (3 do 30 kDa), predvsem uronske kisline ter glukozamina. Ima tri vrste funkcionalnih skupin, ki pomembno določajo njegove lastnosti: sulfatne, sulfamidne in karboksilne (slika 2). To mu daje največji negativni naboj katerekoli znane biološke makromolekule. Znano je, da ima heparin ključno vlogo pri strjevanju krvi, vnetnem procesu, zaščito pred virusi ter obnovi in rasti celic. (3)

Heparin je običajno shranjen v sekretornih granulah mastocitov, ki ga sproščajo v žilje na mesta poškodbe tkiva. Predpostavlja se, da primarna naloga heparina ni antikoagulativna, temveč naj bi na mestu poškodbe predstavljal zaščito pred bakterijami in drugimi ksenobiotiki. (11)

Uporablja se tudi za zdravljenje želodčnega ulkusa, saj naj bi pospeševal regeneracijo mukoze, proliferacijo in angiogenezo s stimuliranjem ekspresije fibroblastnega ter epidermalnega ravnega faktorja. (12)

1.3 POLIMERI

Polimeri so molekule z visoko molekulsko maso, ki so sestavljene iz ponavljajočih se enot (monomerov). Njihov kemizem je odvisen od kemizma monomerne enote ter od načina povezovanja teh enot. Lahko so linearni, razvejani, premreženi ali pa so kombinacija le-teh. Polimere delimo na homopolimere (monomer je eden) ter kopolimere (monomera sta dva ali več). Z različnimi kombinacijami monomernih enot dobimo različne vrste kopolimerov: naključni, alternirajoči, blok in cepljeni kopolimeri. (13)

1.3.1 Biokompatibilni in biorazgradljivi polimeri

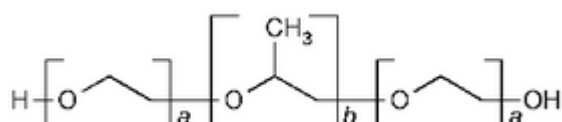
Biokompatibilni polimeri so materiali, ki so lahko v telesu prisotni skozi daljša časovna obdobja in povzročajo majhen oziroma nikakršen imunski odziv. Delimo jih na biorazgradljive in nerazgradljive. Slednji se uporabljajo predvsem kot implantati. Biorazgradljivim polimerom se sčasoma poruši molekularna struktura, posledično pa je omogočeno raztapljanje polimera. Kadar se polimeri uporabljajo kot dostavni sistem za učinkovine, so pogosto načrtovani tako, da ob stiku z vodo razpadajo skozi daljše časovno obdobje. Lahko pa razgradnja poteka tudi zaradi sprememb pH in pod vplivom encimov ali bakterij. Najbolj široko uporabljene polimere lahko razdelimo v naslednje skupine:

- Polietri,
- Poliestri,
- Poli(orto)estri,
- Polianhidridi
- Poliamidi.

Z izbiro polimerov različnih molekulskih mas in s kombinacijo različnih monomernih enot lahko pripravimo biorazgradljive materiale z zelo različnimi lastnostmi (čas razgradnje, temperatura geliranja, rigidnost/elastičnost, oblika). (14)

1.3.1.1 Poloksameri

Poloksameri so ne-ionski kopolimeri poli etilen oksida in poli propilen oksida. V farmacevtskih formulacijah se pojavljajo kot površinsko aktivne snovi, emulgatorji, solubilizatorji, snovi za dispergiranje ter in vivo pospeševalci absorpcije. Večkrat se pojavljajo kot glavna (funkcijska) pomožna snov v formulacijah.



Poloksamer	a	b
124	12	20
188	80	27
237	64	37
338	141	44
407	101	56

Slika 3: Strukturna formula poloksamerov (15)

Vsi poloksameri imajo podobno kemijsko strukturo, ki pa se razlikuje v molekularni masi ter zastopanostjo hidrofilnega (a) in hidrofobnega (b) dela (slika 3). Najpogosteje uporabljena sta poloksamer P188 (7680-9510 kDa) in P407 (9840-14600 kDa). (15)

Poloksameri so netoksični, brez vonja in okusa, v obliki voskastih belih granul. Zaradi strukturnih značilnosti v vodnih raztopinah tvorijo micelle ter so stabilni ob prisotnosti kislin, baz in kovinskih ionov. (13)

P188 in P407 imata mukoadhezivne lastnosti, nizko toksičnost, dobro kompatibilnost z drugimi molekulami in dobre lastnosti za pripravo oblik s podaljšanim sproščanjem učinkovin in neznatno dražita kožo.

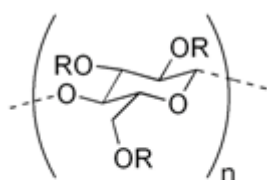
Za razliko od drugih polimerov, ki se uporabljajo v formulacijah, je poloksamere možno pripraviti v vodnih raztopinah, brez uporabe organskih topil. Z vidika varnosti je to pomembna lastnost. Druga pomembna lastnost pa je reverzibilno temperaturno geliranje. Temperatura geliranja je odvisna od vrste uporabljenega poloksamera. V večini primerov so raztopine poloksamerov pri nižjih temperaturah (cca 4°C) v tekoči obliki, ko pa se segrejejo na telesno temperaturo (37°C), tvorijo gel. (16)

Raztopina P407 je v tekoči obliki pri relativno nizki temperaturi 4°C, a tudi hitro tvori viskozne gele z zviševanjem temperature do 15 ali 18°C. Raztopino učinkovine in poloksamera lahko torej pripravimo pri nižanih temperaturah in jih injiciramo v podkožje ali mišico, kjer se potem pod vplivom telesne temperature tvori gel. Posledično naj bi se učinkovina iz gela sproščala zaradi difuzije in zaradi postopnega raztapljanja gela. (17)

V vodnih raztopinah pri nizkih koncentracijah (a vseeno višjih od kritične micelarne koncentracije) se poloksamerni micel hidratira s slojem vode, hidrofobni deli molekule pa so obrnjeni navznoter. Z naraščanjem temperature nastopi desolvatacija hidrofilnih verig, kar je posledica cepitve H-vezi. S tem je omogočena hidrofobna interakcija med propilen oksidnimi enotami, ki sproži tvorbo gela (miceli se povezujejo v cilindre). Kljub temu pa na geliranje vpliva predvsem molekulska masa poloksamera ter odstotek hidrofobnih delov. (15)

1.3.1.2 HPMC

Celulozni etri so še vedno najpogosteje uporabljeni polimeri za podaljšano sproščanje. Na Evropskem tržišču se za 50% vseh trdnih oblik s podaljšanim sproščanjem uporablja hidroksipropilmetilceluloza (HPMC).



Slika 4: Strukturna formula HPMC (18)

Vsaka monosaharidna enota ima na voljo tri hidroksilne skupine za substitucijo, vendar je relativna dostopnost teh skupin običajno manjša, kar pomeni, da pri eterifikaciji ne bodo sodelovale vse. Stopnja substitucije je zato definirana kot povprečno število hidroksilnih skupin na monosaharidno enoto, ki so bile eterificirane (Slika 4 prikazuje, da je maksimalno število 3.). Kemizem, količina in razporeditev substituent pa vpliva na topnost, površinsko aktivnost, termoplastičnost, geliranje in biorazgradljivost. Zaradi teh lastnosti so celulozni etri uporabni za različne aplikacije znotraj farmacevtske industrije.

Ko HPMC izpostavimo vodnemu okolju se začne hitra hidratacija in relaksacija verig (nabrekanje), ki nato tvori viskozni sloj oziroma t.i. hidrogel na stiku z vodo. Fizikalno-kemijske lastnosti tega sloja določajo privzem vode in sproščanje učinkovine. Nabrekanje lahko opišemo kot prodiranje vode skozi hidrogel, kjer nato hidratira delce, s tem pa se debelina gela povečuje. Na drugi strani zunanji sloj postane popolnoma hidratiran, kar povzroči erozijo in raztapljanje polimera pri nadzorovani hitrosti. Hitrost sproščanja učinkovine je odvisna predvsem od dveh procesov: difuzije učinkovine skozi hidrogel in

erozije polimera na površini, kar povzroči izpostavitve svežih, z učinkovino polnih površin mediju.

Difuzija je vodilni proces sproščanja pri vodotopnih učinkovinah, erozija gela pa pri nevodotopnih. Pri tem je potrebno poudariti, da v splošnem sproščanje poteka kot kombinacija obeh procesov.

Zaradi vsebnosti polimera, učinkovine in drugih pomožnih snovi hidrogel na različnih mestih izkazuje različne stopnje hidratacije oziroma raztapljanja. Tako je NMR pokazal, da ima HPMC hidrogel kompleksno sestavo in je nehomogen. Z uporabo različnih HPMC z različnimi stopnjami substitucije se spreminja tudi mobilnost vode skozi hidrogel, pri čemer je debelina hidrogela pri vseh enaka. Pri pripravi HPMC gelov je, poleg interakcij med vodo, polimerom, učinkovino ter pomožnimi snovmi, pomembno tudi razmerje le-teh ter velikost delcev. pH raztopine, v kateri se nahaja HPMC, naj ne bi imel učinka na hidratacijo polimera, vendar je sproščanje lahko spremenjeno zaradi topnosti učinkovine pri različnih pH vrednostih. (19)

1.4 SUBKUTANA APLIKACIJA

Nekaterih učinkovin ni mogoče aplicirati peroralno, zato ker bi delovanje encimov ali prebavnih sokov zmanjšalo njihovo učinkovitost. Učinkovine bi lahko bile prehitro odstranjene iz organizma in ne bi dosegle želenega učinka ali pa lastnosti ne bi dovolile prehoda učinkovine na mesto delovanja (kot v primeru heparina). (20)

Zaradi negativnega naboja in velikosti heparin slabo prehaja iz gastrointestinalnega trakta v kri. Njegova aplikacija poteka izključno intravensko ali subkutano. Učinek v tem primeru nastopi takoj (i.v.) ali po 1 uri (s.c.). V primeru subkutane aplikacije je bolj priporočljiva uporaba nizkomolekularnega heparina (nižja MM, večja homogenost), saj ima daljšo razpolovno dobo kot standardni heparin, manj neželenih učinkov ter nižjo pogostost odmerjanja. (8)

Med subkutano aplikacijo kožo rahlo privzdignemo s palcem in kazalcem ter pod kotom 90 stopinj z dvo centimetrsko iglo vbodemo v podkožje. Ob odsotnosti krvi lahko počasi injiciramo zdravilo. Zaradi majhnega pretoka krvi skozi maščobno tkivo se učinkovina absorbira počasneje, včasih potrebuje tudi 24 ur (20, 21).

1.5 ANALIZNE METODE

1.5.1 Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je analizna metoda, ki meri količino (intenziteto) svetlobe, po prehodu skozi vzorec. Vse molekule absorbirajo, transmitirajo ali odbijajo svetlobo določenih valovnih dolžin. Glede na valovno dolžino ločimo UV-VIS in IR spektrofotometre:

- UV-VIS spektrofotometri uporabljajo svetlobo valovne dolžine v UV območju (185-400 nm) in v območju vidne svetlobe (400-700 nm) ter se večinoma uporabljajo za kvantitativno analizo.
 - IR spektrofotometri pa uporabljajo svetlobo valovne dolžine 700-15000 nm in se zaradi zelo specifičnega odziva v MID območju uporabljajo za kvalitativno analizo.
- (22)

Za absorpcijo svetlobe v območju UV-VIS so v večini odgovorni nevezni elektroni (n) in elektroni v orbitalah nenasičenih molekul (π), ki izredno močno absorbirajo, t.j. dvojne vezi ter še posebno konjugirane dvojne vezi, prisotne v aromatskih molekulah. (23)

Kadar je energija svetlobe (določena z valovno dolžino) enaka maksimalni energiji, ki jo molekula lahko sprejme, je absorbanca pri tej λ največja. Vsaka molekula ima svoj absorpcijski maksimum pri določeni valovni dolžini. Merjenje absorbance poteka pri absorptivnem maksimumu iz treh razlogov:

- Občutljivost in natančnost metode je največja, kar pomeni, da dobimo največji odziv glede na koncentracijo analita.
- Relativni vpliv drugih substanc in nečistot je manjši.
- Krivulja je pri maksimumu relativno ploska, zato je napaka meritve zaradi spremembe valovne dolžine majhna. (24)

Spektrofotometer je naprava, ki meri intenziteto svetlobe ob prehodu skozi vzorec oziroma transmitanco. Če s P_0 označimo moč izvirne svetlobe in s P moč svetlobe, ki je prešla skozi vzorec, potem lahko zapišemo:

$$T = P / P_0$$

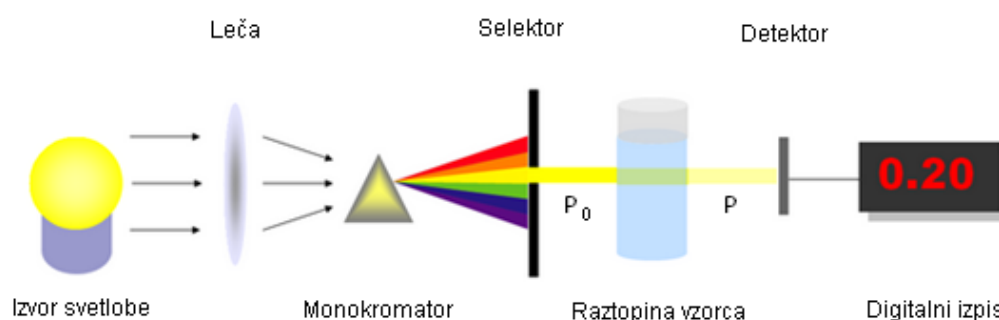
Iz tega lahko nato izračunamo količino absorbirane svetlobe:

$$A = -\log T = -\log P / P_0$$

Absorbanca je direktno sorazmerna koncentraciji preiskovanega analita v vzorčni raztopini. To odvisnost zapišemo z Beer-Lambertovim zakonom, ki velja pri nizkih koncentracijah analita:

$$A = \epsilon lc$$

Pri tem ϵ predstavlja absorptivnost (molarni ekstinkcijski koeficient), l je pot, ki jo opravi žarek skozi vzorec (dolžina kivete) in c koncentracija analita. Absorptivnost je karakteristika molekul, ki se jo da izmeriti. Tako kot absorbanca je odvisna od izbrane valovne dolžine. (23)



Slika 5: Sestava spektrofotometra (22)

Spektrofotometer je sestavljen iz naslednjih elementov (slika 5):

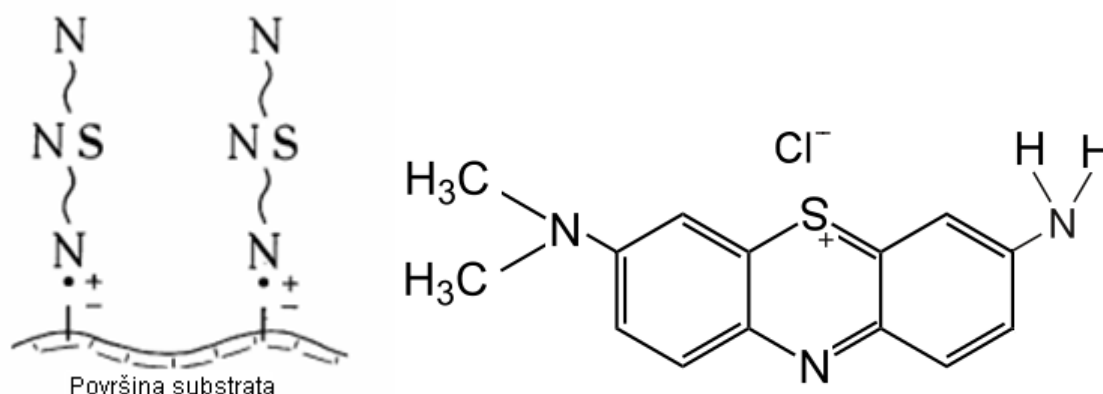
- Izvor svetlobe: v ta namen se uporabljajo žarnice napolnjene z žlahtnimi plini ali kovinskimi hlapi, katere vzbudimo oziroma ekscitiramo z električnim tokom. Ob prehodu nazaj v osnovno stanje emitirajo svetlobo v zelo ozkem pasu valovne dolžine. Poznamo vodikovo, devterijevo (160 – 360 nm), Ne, Ar, Kr, Xe žarnico.
- Monokromator: gre za optični sistem, ki zagotavlja boljšo ločitev spektralne energije. Pomemben je za izolacijo točno določenih valovnih dolžin.
- Detektor: za detekcijo se še vedno pretežno uporablja fototube in fotopomnoževalke. Diodni niz je novejši detektor, sestavljen iz velikega števila diod na mikročipu, ki so izpostavljene svetlobi spektrofotometra. To omogoča zaznavo več valovnih dolžin hkrati, kar poveča hitrost samega postopka analize.

- Programska oprema: pomembna je, ker omogoča umeritve instrumenta, zato ni potrebno vsakokratno merjenje slepega vzorca pred ali hkrati z vzorcem analita. (25)

1.5.1.1 Azur A kolorimetrična metoda

Kvantitativno določevanje heparina v bioloških vzorcih poteka indirektno, z merjenjem njegovega učinka. Najbolj primerna metoda je merjenje aktiviranega parcialnega protrombinskega časa, včasih pa se uporablja merjenje anti-faktor Xa aktivnosti. Novejši pristop merjenja temelji na direktnem merjenju množine heparina. (26)

Spektrofotometrična metoda detekcije heparina temelji na spremembi barve raztopine ob interakcijah med anioni heparina in kationi Azur A barvila. Barvilo se agregira na površini makromolekule heparina (slika 6). (27)



Slika 6: Strukturna formula Azur A barvila in shematski prikaz vezave na površino heparina (28)

Agregacija povzroči metakromatski premik absorptivnega maksimuma k nižjim valovnim dolžinam, kar je posledica tvorbe novih vezi med barvilom in substratom. Reverzibilnost in nizka energija teh vezi kaže, da gre za ionske vezi. (28)

Za določevanje heparina zmešamo enaki količini vzorca in vodne raztopine Azur A barvila ($8 \cdot 10^{-5}$ M) ter kompleksu izmerimo absorbanco pri 512 nm. Azur A ima absorptivni maksimum pri valovni dolžini 620 nm. (29)

1.5.2 Velikost nanokompleksov

Naprava Zetasizer Nano ZS meri velikost delcev na podlagi dinamičnega sipanja laserske svetlobe (DLS). Pri prehodu svetlobe skozi vzorec se le-ta na delcih sipa. Intenziteta sipanja

svetlobe zaznamo z detektorjem. Brownovo gibanje predpostavlja, da so delci, dispergirani v tekočini zaradi naključnih trkov z molekulami topila, vedno v gibanju. Manjši delci se gibljejo hitreje kot večji. Aparat izmeri hitrost nihanja intenzitete sipane svetlobe na delcih in izračuna povprečni premer delcev ter porazdelitev velikosti. To naredi s pomočjo komponente imenovane digitalni korelator, ki meri stopnjo ujemanja signalov v časovnem obdobju. Pri primerjavi intenzitet signala na začetku in po krajšem časovnem obdobju (nanosekunda) je očitno, da sta si signala med seboj podobna, t.j. obstaja dobra korelacija (vrednost blizu 1). Pri vsaki nadaljnji meritvi je zaradi gibanja molekul signal manj podoben prvotnemu. Torej stopnja ujemanja signalov počasi pada proti 0. Glede na hitrost padanja stopnje ujemanja Zetasizer izračuna velikost delcev. Hitreje kot pada, manjši so delci. (30)

1.5.3 Zeta potencial

Večina delcev dispergiranih v vodnem mediju ima površinski naboj, največkrat zaradi ionizacije skupin na površini ali pa zaradi adsorpcije nabitih molekul. Površinski naboj spremeni porazdelitev ionov okoli delca. Sternov sloj, ki vsebuje nasprotno nabite ione, je relativno trdno vezan na površino delca. (31)

Od tega sloja naprej so pozitivni in negativni ioni vedno v neravnovesju zaradi vpliva površine delca, kar zaznamo kot električni potencial. Na določeni razdalji od delca se anioni in kationi izenačijo in ni več vpliva s strani površinskega naboja. Znotraj difuznega sloja obstaja meja, do katere se ioni, vezani na delec, ob gibanju delca premikajo z njim, ostali pa ostanejo v mediju. Potencial, ki ga zaznamo na tej meji, se imenuje zeta potencial.

Pri merjenju zeta potenciala disperzijo izpostavimo električnemu polju. Delci v disperziji potujejo k elektrodi z nasprotnim nabojem s hitrostjo proporcionalno velikosti zeta potenciala. Poleg tega na hitrost vpliva tudi temperatura, viskoznost, dielektrična konstanta medija in jakost električnega toka. (30, 31)

Zeta potencial je dobro merilo fizikalne stabilnosti disperzij. Za fizikalno stabilne veljajo tiste disperzije, ki imajo vrednosti ZP večje od +30 mV oziroma manjše od -30 mV. Če imajo delci močan istovetni naboj, se bodo med seboj odbijali, v primeru majhnega naboja pa so sile odboja, ki bi preprečevale združevanje, premajhne. Ko se zeta potencial približuje 0 mV, so delci vse bolj nagnjeni k agregaciji. Na vrednosti ZP najbolj vpliva pH, saj so delci v kislem bolj pozitivno nabiti, v bazičnem pa bolj negativno. Sistem je najmanj stabilen pri tisti pH vrednosti, kjer je zeta potencial enak 0. (30, 32)

Osnovo za merjenje predstavlja celica z elektrodo na vsaki strani kapilare. Ko skozi celico steče tok, se začno delci premikati proti nasprotno nabiti elektrodi s hitrostjo proporcionalno velikosti naboja delca. Za merjenje te hitrosti instrument uporablja lasersko Dopplerjevo velocimetrijo (LDV). Laserski žarek se razdeli na dva dela. Prvi del potuje skozi celico z vzorcem, drugi pa je referenčni. Zaradi delcev je pri prehodu svetlobe skozi vzorec prisotno določeno sipanje le-te. Sipana svetloba (kot detekcije = 17°) se združi z referenčno, kar povzroči nihajočo intenziteto signala. Nihanje intenzitete pa je proporcionalno hitrosti gibajočega se delca. Vsi podatki se nato naložijo v računalnik, ki izračuna elektroforezno mobilnost in posledično tudi zeta potencial. (30)

1.6 POLIELEKTROLITNI NANOKOMPLEKSI

Vpliv masnega razmerja hitosan/enoksiarin na fizikalne lastnosti PEK so spremljali Sun W. in sodelavci. Pri nizkih koncentracijah heparina je prišlo do nastanka večjih delcev zaradi močne povezave molekul heparina z večjim številom molekul hitosana. S povečevanjem koncentracije heparina se je povprečna velikost delcev zmanjševala vse do platoja. Pri nadaljnjem povečevanju koncentracije heparina pa je bila dosežena kritična točka, pri kateri je začela velikost delcev intenzivno naraščati. To točko so izbrali za izračun optimalnega masnega razmerja med hitosanom in heparinom. Z nadaljevanjem povečevanja koncentracije heparina je velikost delcev še bolj narasla in prišlo je do flokulacije. Dokazali so, da je stehiometrično razmerje odvisno od same strukture polimera, saj so v primeru različnih hitosanov dobili različna optimalna razmerja. Iz tega sledi, da je optimalno masno razmerje v prvi vrsti odvisno od gostote naboja uporabljenega polimera. Poleg tega so še ugotovili, da z naraščajočim masnim razmerjem hitosan/heparin velikost delcev narašča. (33)

Optimalno masno razmerje za heparin/hitosanijev klorid je bilo določeno na Katedri za farmacevtsko tehnologijo in sicer 1:1. (34)

Sun W. in sodelavci so proučevali vpliv pH na lastnosti PEC z mešanjem enakih volumnov (1 ml) različnih koncentracij (heparin 0.5 mg/ml in hitosan 1 mg/ml) pri različnih vrednostih pH. Za tvorbo nanokompleksov morata biti oba polimera v ionizirani obliki, kar pomeni, da reakcija poteka le v bližini pKa intervala obeh polimerov (pKa hitosana 6,5; pKa heparina 3,1). Opazili so, da je na začetku velikost delcev padala z naraščanjem pH (3,0-4,5), potem je dosegla plato (pH = 4,5-6,5), v zadnji fazi pa se je velikost delcev povečevala (pH nad 7), saj

je prišlo do agregacije. To lahko pripišemo dejstvu, da je hitosan v kislem mediju močno pozitivno nabit in medsebojni odboj amino skupin povzroči, da je struktura hitosana močno iztegnjena, kar omogoča tvorbo večjih kompleksov z negativno nabitim nizkomolekularnim heparinom. Z naraščanjem pH se pozitivni naboj hitosana zmanjšuje, kar povzroči manjšo odbojno silo in tvorbo manjših delcev. Ko pH naraste nad 6,5 je protoniranih le še 50% amino skupin, zaradi česar se zmanjša tako topnost hitosana kakor tudi elektrostatski odboj med delci. Sistem postane nestabilen in teži h koacervaciji, pri pH nad 7.0 pa k obarjanju. (33)

Lastnosti nanokompleksov so odvisne od koncentracije uporabljenih polielektrolitov. Zonghua Liu in sodelavci so raziskovali vpliv koncentracije hitosana (pri stalni koncentraciji heparina 1mg/ml) na velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial. Ugotovili so, da se je velikost delcev povečevala od 204 nm pri koncentraciji 1 mg/ml do 779 nm pri koncentraciji 10 mg/ml. S povečevanjem koncentracije hitosana molekule heparina iz enega nanokompleksa interagirajo z več molekulami hitosana, kar posledično vodi v delce večjih velikosti. Na velikost PEK vpliva tudi MM hitosana, ki je v primeru manjše MM manj občutljiva na spremembe koncentracije hitosana. (33, 3)

V nadaljevanju so proučevali še vpliv povečevanja koncentracije obeh polielektrolitov na fizikalne lastnosti nanokompleksov. Ugotovili so, da pri konstantnem razmerju hitosan/heparin v primeru višjih koncentracij nastane več nanokompleksov. Kljub temu pa obstaja omejitev pri povečevanju koncentracije, saj se z naraščajočo koncentracijo polielektrolitov povečuje število nastalih nanokompleksov, s tem pa tudi njihova težnja k agregaciji in obarjanju. V primeru koncentracij, višjih od 2 mg/ml heparina in 4 mg/ml hitosana, se v disperziji tvori več agregatov. (3)

2 NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo predstavili različne poskuse optimizacije disperzije nanokompleksov heparina in hitosana, njihovo vgrajevanje v termoreverzibilne hidrokele ter rezultate in vitro sproščanja heparina. Cilj raziskave je doseči podaljšano subkutano dostavo heparina, ki bi zahtevala manj pogosto aplikacijo.

Nanokomplekse bomo pripravili z metodo polielektrolitnega kompleksiranja. Glede na to, da je bilo optimalno masno razmerje za heparin in hitosanijev klorid že določeno, bomo izbrali razmerje 1:1. V prvem delu bomo ugotavljali, kako na lastnosti nanokompleksov vpliva različno volumsko razmerje osnovnih raztopin, čas mešanja ter samo povečevanje končne koncentracije nanokompleksov. Ob dvigovanju koncentracije bomo ugotavljali, do katere vrednosti je disperzija še fizikalno stabilna.

V drugem delu bomo disperzije s tremi različnimi koncentracijami nanokompleksov vgradili v termoreverzibilne hidrokele različnih sestav (poloksamer 407, poloksamer 188, HPMC) in skozi časovno obdobje (480 ur) spremljali koncentracijo heparina v mediju za sproščanje. Zanimale nas bodo razlike v odstotku sproščenega heparina med različnimi formulacijami hidrogelov in različnimi koncentracijami nanokompleksov. Poleg tega bomo izvedli še sproščanje heparina iz samih nanokompleksov in te rezultate primerjali med seboj.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

Materiali za pripravo nanokompleksov

- heparin, 5.000 i.e./1 ml raztopina za injiciranje, Braun, Melsungeng, Nemčija
- hitosanijev klorid, Kraeber & Co GmbH, Nemčija MM 30 – 400 kDa, stopnja deacetilacije 87,2%
- prečiščena voda

Materiali za pripravo termoreverzibilnih hidrogelov

- prečiščena voda
- poloksamer 407, Lutrol® F127, Ludwigshafen, Nemčija
- poloksamer 188, Lutrol® F68, Ludwigshafen, Nemčija
- HPMC, Methocel K4M Premium, Colorcon, Velika Britanija

Reagenti za pripravo medija za sproščanje (fosfatni pufer pH 7,4)

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

Postopek izdelave:

Natehtali smo 8 g NaCl; 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; 0,2 g KCl in 0,24 g KH_2PO_4 , vse skupaj kvantitativno prenesli v 1 l bučko in dopolnili do oznake z bidestilirano vodo. Na koncu smo ob stalnem merjenju pH po kapljicah dodajali HCl, dokler vrednost raztopine ni dosegla 7,4.

Reagenti za kvantitativno določevanje heparina

- prečiščena voda
- Azure A klorid, Standard Fluka, za mikroskopiranje, Fluka, Sigma-Aldrich, Švica

3.2 NAPRAVE

- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- pH meter, SevenMulti, Mettler Tolledo, Schwerzenbach, Švica
- avtomatska pipeta, 50-1000 µl, Biohit, Finska
- avtomatska pipeta, 20-100 µl, Biohit, Finska
- magnetno mešalo, IKA-WERKE Ro 15 power, Nemčija
- magnetno mešalo, Rotamix 550, Tehnica, Slovenija
- vodna kopel, Vakumska tehnika, Kambič, Semič, Slovenija
- ultrazvočna kadička, Sonorex RK514 BH, Bandelin electronic, Berlin, Nemčija
- ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija
- spektrofotometer, Agilent 8453 UV-visible spectroscopy system, Hewett-Packard, Waltbron, Nemčija
- Zetasizer Nano ZS, Malvern, Velika Britanija

3.3 POSTOPKI IN METODE

3.3.1 Izdelava nanokompleksov iz hitosana in heparina

Priprava raztopin hitosana

Pripravili smo raztopine z različnimi koncentracijami hitosanijevega klorida v vodi. Natehtali smo ustrezno količino hitosana in jo kvantitativno prenesli v 100 ml bučko ter dodali prečiščeno vodo. Bučko smo nato izpostavili ultrazvoku, dokler se ni raztopil ves hitosan. Na koncu smo bučko dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

Priprava raztopin heparina

Za pripravo raztopin z različnimi koncentracijami heparina smo izhajali iz osnovne raztopine heparina 5000 i.e./ml, kar ustreza koncentraciji 50 mg/ml. Odpipetirali smo ustrezne volumne osnovne raztopine, jih prenesli v 25 ml bučko ter dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

Izdelava nanokompleksov

Nanokomplekse iz hitosana in heparina smo izdelali z metodo polielektrolitnega kompleksiranja nasprotno nabitih polimerov. V vseh primerih smo uporabili masno razmerje heparin/hitosan = 1:1. V čaše smo odmerili ustrezen volumen raztopine hitosana in med mešanjem na magnetnem mešalu (900 vrtljajev/min) počasi z avtomatsko pipeto dodajali ustrezen volumen raztopine heparina. Čaše smo prekrili s parafilmom in tako preprečili izhlapevanje topila. Vzorce smo na magnetnem mešalu mešali eno uro.

3.3.1.1 Vpliv različnega volumskega razmerja osnovnih raztopin hitosana in heparina na lastnosti nanokompleksov (masno razmerje 1:1)

V tem primeru smo pripravili ustrezne koncentracije osnovnih raztopin, ki so ustrezale trem v naprej določenim končnim koncentracijam nanokompleksov (tabela I in II). V prvem primeru smo za pripravo nanokompleksov uporabili 8 ml raztopine hitosana in 8 ml raztopine heparina (tabela I). Z namenom določitve vpliva volumna osnovnih raztopin na lastnosti nanokompleksov, smo v drugem primeru zmešali 5 ml raztopine heparina in 10 ml raztopine hitosana (tabela II).

Tabela I: Končne koncentracije hitosana in heparina v disperziji nanokompleksov po uporabi osnovnih raztopin hitosana in heparina v volumskem razmerju 1:1 (8 ml + 8 ml)

c(hit) = c(hep)	V(hep)	c(hep)	m(hep)	V(hit)	c(hit)	m(hit)
[mg/ml]	[ml]	[mg/ml]	[mg]	[ml]	[mg/ml]	[mg]
1,6	8	3,2	25,5	8	3,2	25,5
2	8	4	32	8	4	32
2,5	8	5	40	8	5	40

Tabela II: Končne koncentracije hitosana in heparina v disperziji nanokompleksov po uporabi osnovnih raztopin hitosana in heparina v volumskem razmerju 2:1 (10 ml + 5 ml)

c(hit) = c(hep)	V(hep)	c(hep)	m(hep)	V(hit)	c(hit)	m(hit)
[mg/ml]	[ml]	[mg/ml]	[mg]	[ml]	[mg/ml]	[mg]
1,6	5	4,8	24	10	2,4	24
2	5	6	30	10	3	30
2,5	5	7,5	37,5	10	3,75	37,5

3.3.1.2 Vpliv časa mešanja disperzij na lastnosti nanokompleksov

Nanokomplekse iz heparina in hitosana smo izdelali kot je opisano v 3.3.1. Uporabili smo 4 ml raztopine heparina s koncentracijo 1 mg/ml in 6,667 ml raztopine hitosana s koncentracijo 0,6 mg/ml. Končna koncentracija heparina v disperziji nanokompleksov je bila 0,375 mg/ml. Po izdelavi smo disperzije mešali na magnetnem mešalu (900 vrtljajev/min) 0,5h, 1h, 2h, 3h oziroma 4 h.

3.3.1.3 Vpliv koncentracije nanokompleksov v disperziji na njihove lastnosti

Nanokomplekse smo izdelali kot je opisano v 3.3.1. Uporabili smo 4 ml raztopine hitosana in 6,667 ml raztopine heparina ter tako dobili disperzije nanokompleksov s končno koncentracijo heparina od 0,375 mg/ml do 2,625 mg/ml (tabela III).

Tabela III: Koncentracije in volumni raztopin heparina in hitosana za izdelavo disperzij nanokompleksov z različnimi končnimi koncentracijami heparina (masno razmerje heparin:hitosan = 1:1)

c(hit) = c(hep) [mg/ml]	c(hep) [mg/ml]	V(hep) [ml]	m(hep) [mg]	c(hit) [mg/ml]	V(hit) [ml]	m(hit) [mg]
0,375	1	4	4	0,6	6,667	4
0,75	2	4	8	1,2	6,667	8
1,125	3	4	12	1,8	6,667	12
1,5	4	4	16	2,4	6,667	16
1,875	5	4	20	3	6,667	20
2,25	6	4	24	3,6	6,667	24
2,625	7	4	28	4,2	6,667	28

3.3.2 Fizikalno vrednotenje disperzij nanokompleksov

Disperzijam nanokompleksov smo določili pH vrednosti, povprečno velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial.

3.3.2.1. Merjenje velikosti delcev in polidisperznega indeksa

Velikost delcev smo določali z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (Zetasizer Nano ZS). Metoda nam daje rezultat v obliki povprečnega premera delcev in polidisperznega indeksa, ki je merilo za širino porazdelitve velikosti nanokompleksov. PDI lahko zavzame vrednosti od 0 do 1. Vrednost 0 pomeni, da so delci v ozkem intervalu velikosti

(monodisperzni sistem), vrednost 1 pa nakazuje na zelo nehomogeno porazdelitev velikosti delcev. Disperzije nanokompleksov smo shranjevali v hladilniku.

Pogoji merjenja

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

3.3.2.2 Merjenje zeta potenciala

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

Pogoji merjenja

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

3.3.2.3 Merjenje pH

Merjenje pH je potekalo z metodo merjenja elektrokemijskega potenciala s SevenMulti pH-metrom s stekleno elektrodo.

3.3.3 Izdelava termoreverzibilnih hidrogelov z nanokompleksi iz hitosana in heparina

Izdelava nanokompleksov

Nanokomplekse iz hitosana in heparina smo izdelali kot je opisano v 3.3.1. Pripravili smo tri paralelke s tremi različnimi končnimi koncentracijami heparina (0,375; 1,125 in 1,875 mg/ml) (Tabela IV).

Tabela IV: Koncentracije in volumni raztopin heparina in hitosana za izdelavo disperzij nanokompleksov, ki smo jih vgrajevali v termoreverzibilne hidrokele.

končna koncentracija heparina v nanodisperziji	c(hep)	V(hep)	m(hep)	c(hit)	V(hit)	m(hit)
[mg/ml]	[mg/ml]	[ml]	[mg]	[mg/ml]	[ml]	[mg]
0,375	1	4	4	0,6	6,667	4
1,125	3	4	12	1,8	6,667	12
1,875	5	4	20	3	6,667	20

Izdelava termoreverzibilnih gelov

V že pripravljene disperzije nanokompleksov smo počasi raztopili ustrezne količine poloksamerov 407, P188 in HPMC ob stalnem mešanju (500 vrtljajev/min) in znižani temperaturi (5-10°C). Pripravljene raztopine smo pred nadaljnjim delom pustili 24 ur v hladilniku na +4°C.

Za in vitro spremljanje sproščanja heparina smo 1 ml tako pripravljene disperzije napolnili v graduirane plastične epruvete z notranjim premerom 1 cm ter jih postavili v vodno kopel (37°C), da je koloidna raztopina prešla iz sol v gel stanje. Posamezne formulacije smo zaradi lažje predstavitve podatkov označili s F1, F2 in F3, koncentracije heparina v vzorcih pa z A, B in C (tabela V).

Tabela V: Oznake za različne formulacije termoreverzibilnih hidrogelov z nanokompleksi heparina in hitosana (koncentracije se nanašajo na končne koncentracije heparina v gelih)

		Koncentracije heparina v gelih		
	Sestava hidrogelov	0,375 mg/ml	1,125 mg/ml	1,875 mg/ml
F1	18% P407	F1A	F1B	F1C
F2	18% P407 + 1% P188	F2A	F2B	F2C
F3	18% P407 + 1% P188 + 1% HPMC	F3A	F3B	F3C

3.3.4 Raztapljanje termoreverzibilnih gelov z nanokompleksi

1ml hladne disperzije smo napolnili v plastične graduirane epruvete z notranjim premerom 1 cm ter jih postavili na vodno kopel (37°C), da je koloidna raztopina prešla iz sol v gel stanje. Nato smo na površino gela nalili 2 ml medija za sproščanje (T=37°C). V določenih časovnih intervalih smo epruvete previdno obrnili za 180° ter ocenili volumen gela, ki se še ni

raztopil. V vsaki časovni točki smo 0,5 ml medija za sproščanje nadomestili z enakim volumnom svežega medija.

3.3.5 Sproščanje heparina iz termoreverzibilnih gelov z nanokompleksi

Za spremljanje in vitro poteka sproščanja heparina smo uporabili metodo brez membrane. Postopek je bil enak kot pri spremljanju raztapljanja gelov. V vsako od graduiranih epruvet, ki so že imele 1 ml gela, smo dodali 2 ml medija za sproščanje z enako temperaturo (37°C). Za medij smo izbrali fosfatni pufer (pH 7,4). V določenih časovnih intervalih smo z avtomatsko pipeto odvzeli 0,5 ml medija ter ga nadomestili z enako količino svežega medija, segretega na 37°C. Koncentracijo heparina v vzorcih smo določali z Azur A kolorimetrično metodo.

3.3.6 Sproščanje heparina iz disperzij nanokompleksov

1 ml disperzije nanokompleksov smo prenesli v graduirane plastične epruvete z notranjim premerom 1 cm in jih termostatirali na 37°C. Nato smo dodali na enako temperaturo segret fosfatni pufer (2 ml), ki je predstavljal medij za sproščanje. V določenih časovnih intervalih smo z avtomatsko pipeto odvzeli 0,5 ml medija ter ga nadomestili z enako količino svežega medija segretega na 37°C. Koncentracijo heparina v vzorcih smo določali z Azur A kolorimetrično metodo.

3.3.7 Kvantitativno določanje heparina z Azur A kolorimetrično metodo

Določevanje heparina v vzorcih je potekalo po Azur A kolorimetrični metodi. Vzorce smo redčili 5- do 10-krat z destilirano vodo. Iz razredčenega vzorca smo odpipetirali 1 ml, ga prenesli v epruveto in mu dodali 1 ml vodne raztopine azura ($8 \cdot 10^{-5}$ M oziroma 0,02 mg/ml). Kompleksu med heparinom in azur barvilom smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 512 nm. Za izračun koncentracije na podlagi izmerjene absorbance smo predhodno postavili umeritveno krivuljo. To smo storili z merjenjem absorbance kompleksa azur/heparin različnih koncentracij (0,001; 0,0025; 0,005 in 0,01 mg/ml), nato pa iz podatkov izračunali umeritveno krivuljo.

Slepi vzorec je vseboval 1 ml prečiščene vode in 1 ml raztopine azur barvila s koncentracijo 0,02 mg/ml. Vsi rezultati predstavljajo povprečje treh paralelk.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VREDNOTENJE FIZIKALNIH LASTNOSTI HITOSANSKIH NANOKOMPLEKSOV S HEPARINOM

4.1.1 Vpliv različnega volumskega razmerja osnovnih raztopin hitosana in heparina na fizikalne lastnosti nanokompleksov

Kot so že dokazali nekateri avtorji, so lastnosti nanokompleksov odvisne od koncentracije raztopin posameznih polielektrolitov. Ugotovili so, da se s povečevanjem koncentracije hitosana pri konstantnem masnem razmerju povečuje tudi povprečni premer delcev. (33)

V diplomskem delu nas je zanimalo, kakšen vpliv na lastnosti nanokompleksov ima različno volumsko razmerje raztopin heparina in hitosana ob povečevanju njune končne koncentracije v disperziji. Vse disperzije so imele masno razmerje hitosan:heparin=1:1. Rezultati so zbrani v tabeli VI.

Pri obeh uporabljenih volumskih razmerjih osnovnih raztopin hitosana in heparina je razvidno, da povprečna velikost delcev narašča s povečevanjem končne koncentracije. Pri uporabi raztopine hitosana z višjo koncentracijo (volumsko razmerje 1:1) smo dobili delce s cca. 20-30 nm večjim premerom. Tudi preliminarni test, pri katerem smo hitosan v prahu raztopili direktno v raztopini heparina, je dajal večje delce. To bi lahko bila posledica tega, da pride pri višji koncentraciji hitosana do interakcij več molekul hitosana z molekulo heparina in posledično do večjega povprečnega premera delcev. Takšno razlago so predlagali tudi Wei Sun in sodelavci (33).

Tabela VI: Vpliv volumskega razmerja osnovnih raztopin heparina in hitosana na ZP, PDI, pH in velikost delcev v disperziji

V (hit) : V (hep)	c (hit)= c (hep) [mg/ml]	V (hep) [ml]	V (hit) [ml]	ZP [mV]	d [nm]	PDI	pH
1:1	1,6	8	8	43,6	418	0,709	4,644
	2	8	8	43,4	459	0,634	4,346
	2,5	8	8	41	629	1	4,298
2:1	1,6	5	10	41,3	384	0,685	4,431
	2	5	10	43,3	434	0,736	4,044

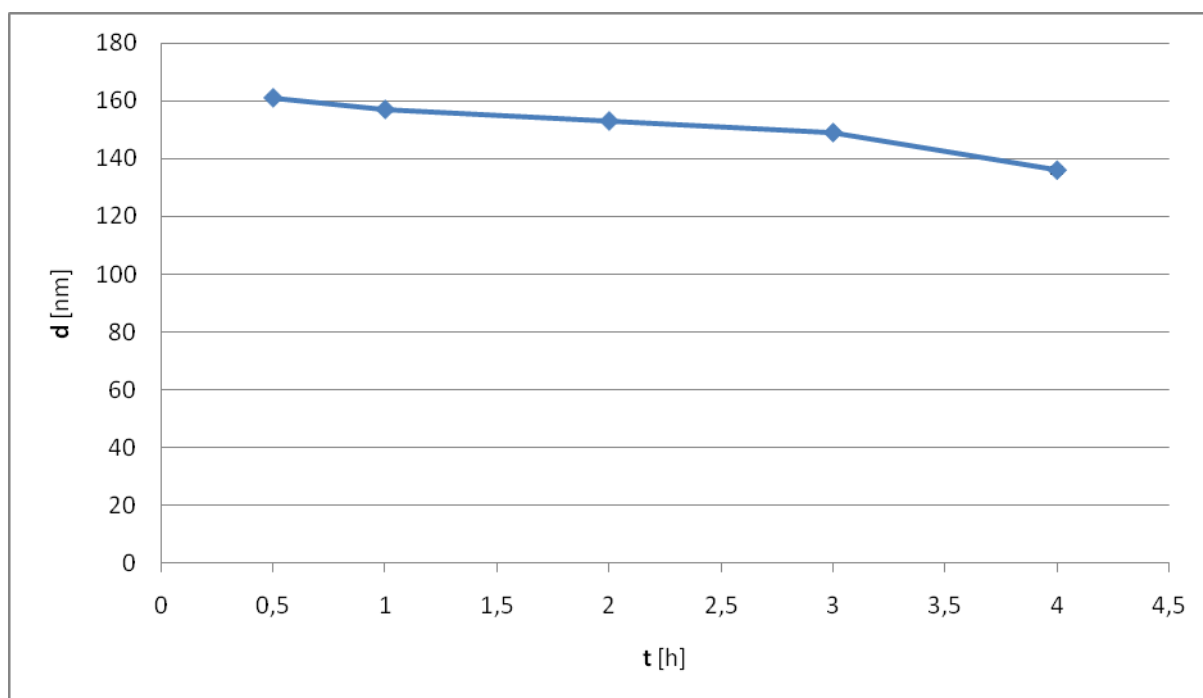
	2,5	5	10	41,5	597	0,868	3,993
--	-----	---	----	------	-----	-------	-------

Vrednost PDI s povečevanjem koncentracije nanokompleksov pričakovano narašča. Razlike med vzorci, pri katerih smo za izdelavo uporabili različna volumska razmerja osnovnih raztopin, so zanemarljive. Različno volumsko razmerje osnovnih raztopin tudi ne vpliva na vrednost zeta potenciala nanokompleksov.

Iz tabele VI je razvidno, da pH disperzij pada z naraščajočo končno koncentracijo heparina in hitosana v disperziji. Prav tako je vrednost pH disperzij za cca. 0,2-0,3 nižja v primeru volumskega razmerja osnovnih raztopin hitosan:heparin = 2:1. Višja je končna koncentracija hitosana v disperziji, nižja je vrednost pH, kar je pričakovano, saj je hitosan v obliki hitosanijevega klorida.

4.1.2 Vpliv časa mešanja disperzij na fizikalne lastnosti nanokompleksov

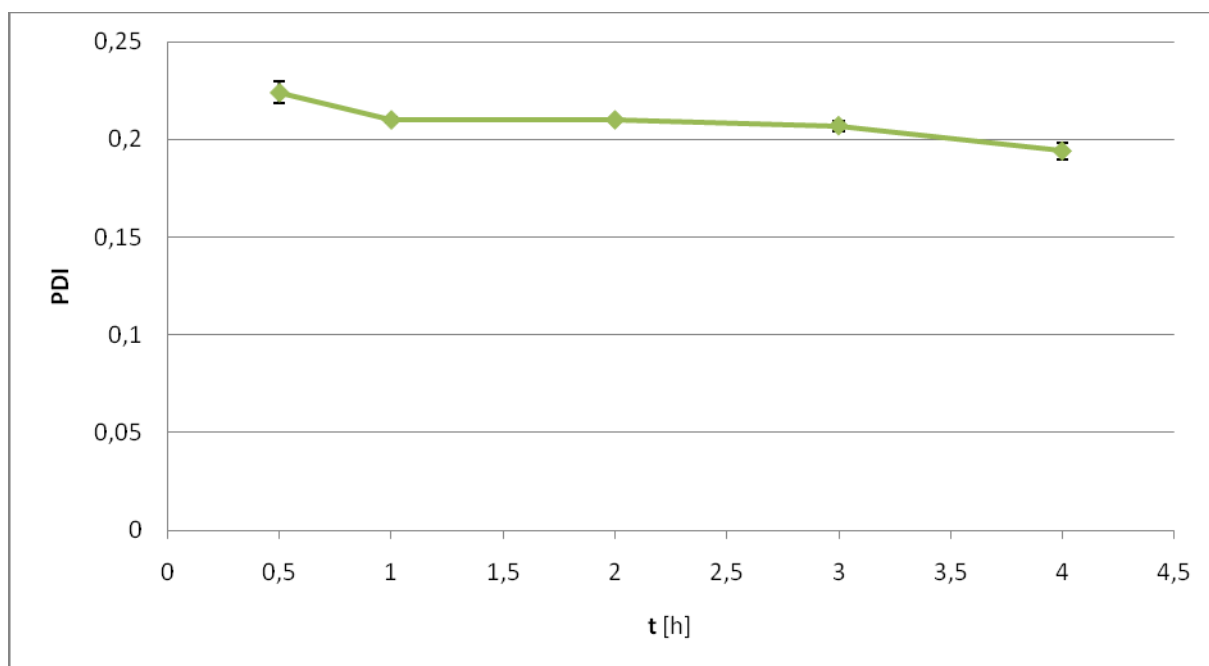
Ugotavljali smo vpliv časa mešanja disperzij na lastnosti nanokompleksov. V ta namen smo izdelali 5 disperzij (masno razmerje heparin:hitosan = 1:1), ki so bile nato izpostavljene različnim časom mešanja. Iz rezultatov je razvidno, da se povprečna velikost delcev s povečevanjem časa mešanja zmanjšuje (slika 7).



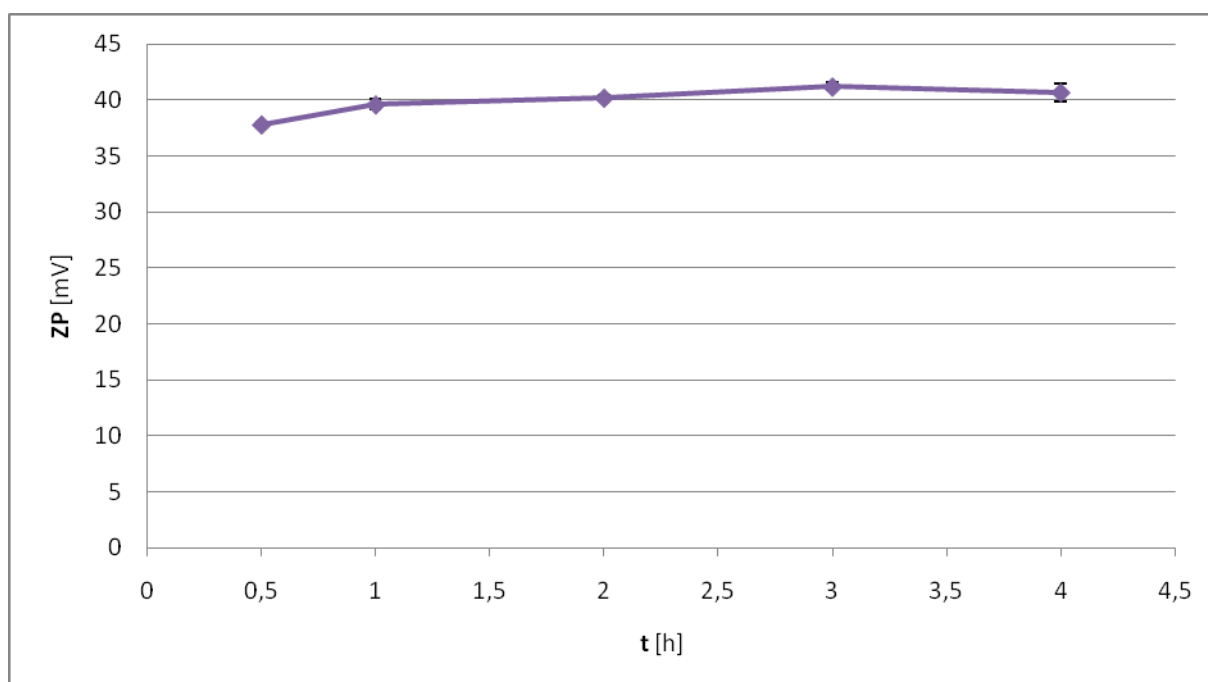
Slika 7: Povprečni premer nanokompleksov v odvisnosti od časa mešanja disperzij. Končna koncentracija heparina v disperziji je 0,375 mg/ml.

Povprečna velikost delcev je največja pri najkrajšem času mešanja, in sicer 161 nm pri 30 min mešanju. Zmanjševanje velikosti delcev od 1. do 3. ure poteka skoraj po linearni odvisnosti (od 157 nm do 149 nm). Po 4-urnem mešanju pa je zmanjšanje povprečnega premera, glede na predhodne rezultate, še večje. Slednje nakazuje na to, da je čas mešanja pomemben dejavnik, ki vpliva na povprečno velikost delcev. Zaradi povečanega števila interakcij med nabitimi skupinami molekul heparina in hitosana pri daljših časih mešanja pride do zmanjševanja povprečnega premera delcev. Pri kratkotrajnem mešanju pa vse interakcije še niso vzpostavljene. Pozitivno nabite amino skupine hitosana se med seboj odbijajo, kar pomeni sterično večjo (bolj iztegnjeno) strukturo. To pa je razlog za izmerjene večje povprečne velikosti delcev. Vpliv nabitih amino skupin na velikost delcev so proučevali tudi Sun W in sodelavci ter prišli do podobnih zaključkov. (33)

Tudi slika 8 prikazuje rezultate, ki so v skladu s to trditvijo. PDI se zniža iz začetne vrednosti 0,224 pri 0,5-urnem mešanju na 0,194 pri 4-urnem mešanju. To pomeni, da so si delci po daljšem času mešanja, v smislu velikosti, med sabo bolj podobni.



Slika 8: Polidisperzni indeks nanokompleksov v odvisnosti od časa mešanja disperzij. Končna koncentracija heparina v disperziji je 0,375 mg/ml.

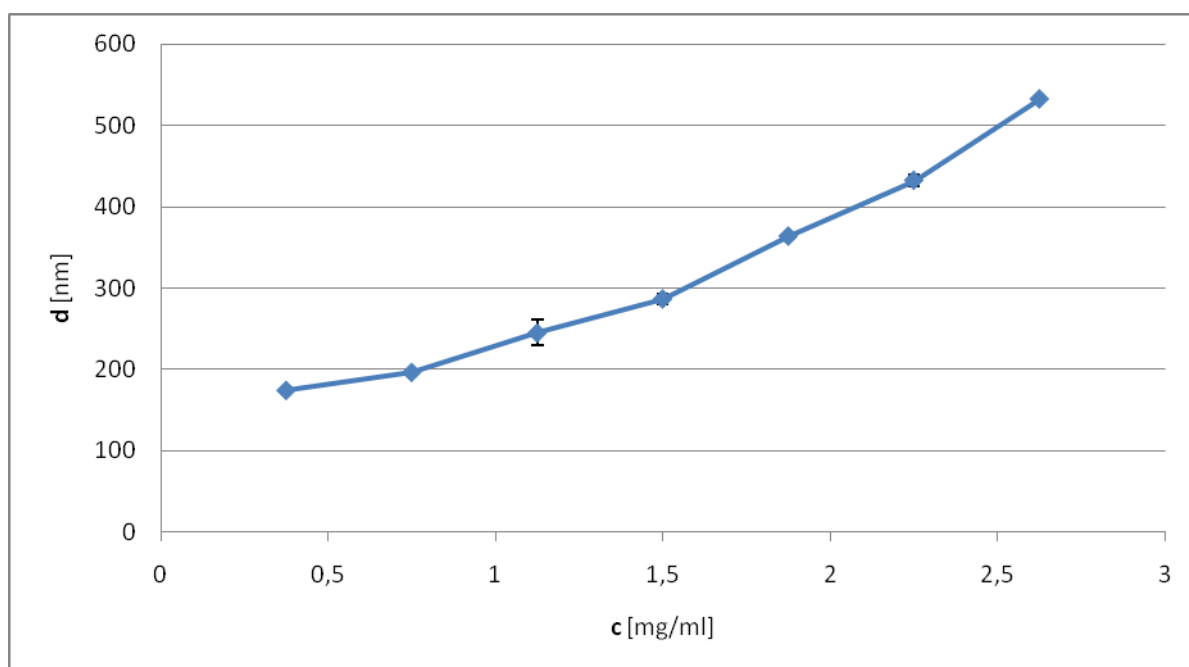


Slika 9: Zeta potencial nanokompleksov v odvisnosti od časa mešanja disperzij. Končna koncentracija heparina v disperziji je 0,375 mg/ml.

Vpliv časa mešanja disperzij na zeta potencial nanokompleksov prikazuje slika 9. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da čas mešanja nima signifikantnega vpliva na vrednosti zeta potenciala.

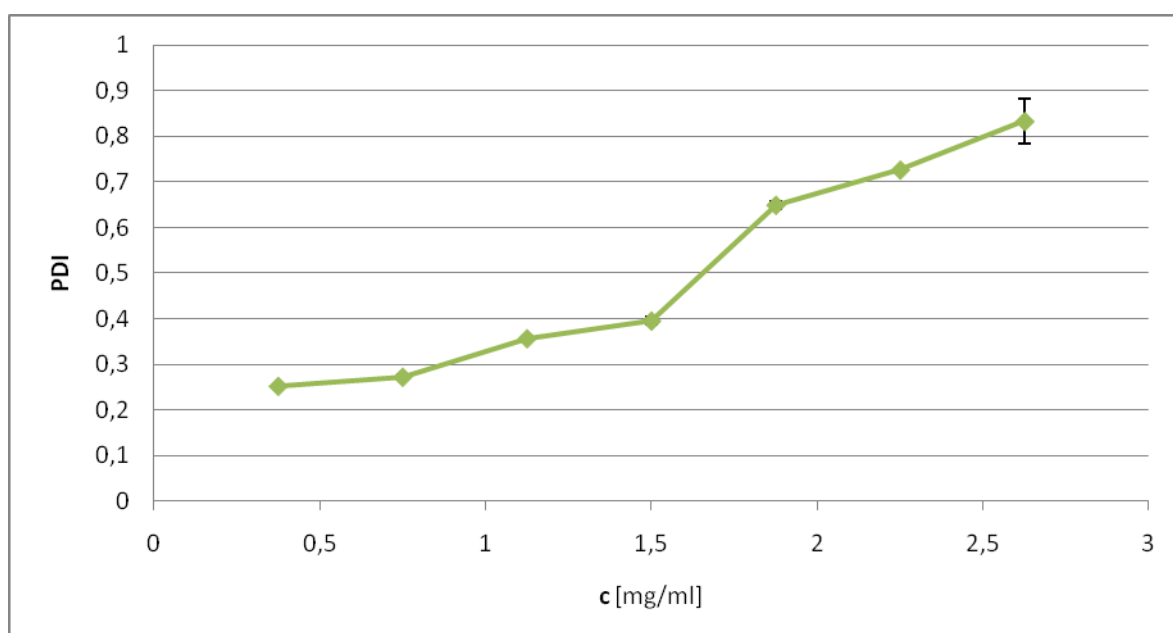
4.1.3 Vpliv koncentracije nanokompleksov v disperziji na njihove fizikalne lastnosti

Slika 13 prikazuje, da se povprečna velikost delcev pričakovano povečuje z naraščanjem končne koncentracije heparina in hitosana v disperziji (masno razmerje 1:1). Pri koncentraciji heparina 0,375 mg/ml smo izmerili premer nanokompleksov 175 nm, pri 7-krat višji koncentraciji (2,625 mg/ml) pa 532 nm (slika 10). Kot so pokazali Zonghua Liu in ostali, je povečevanje koncentracije heparina in hitosana pri optimalnem razmerju dober način za pridobitev večjega števila nanokompleksov v disperziji, vendar le do določene mere. Preliminarni poskusi so pokazali, da obstaja povečana tendenca za tvorbo agregatov, kadar so koncentracije heparina in hitosana višje od 2 in 4 mg/ml. To je posledica nagnjenosti nanokompleksov k agregiranju v primeru visokih koncentracij. Prav tako predpostavljajo, da s povečevanjem koncentracije hitosana molekule heparina vstopajo v interakcije z večjim številom molekul hitosana. To privede do vedno večjih nanokompleksov.(3)



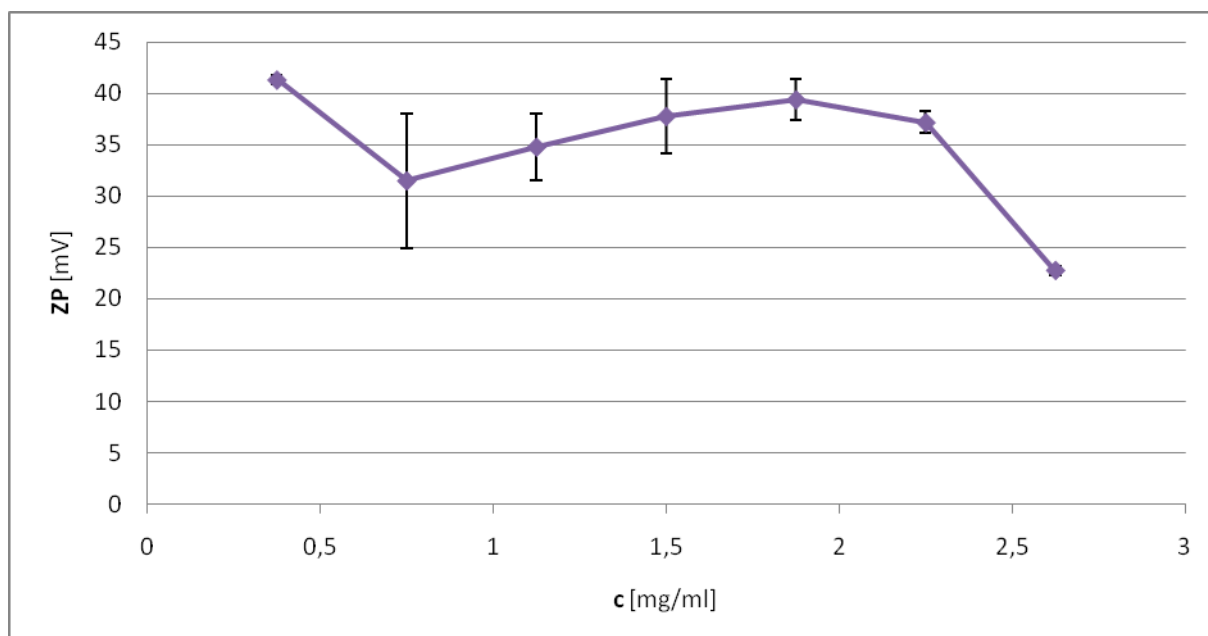
Slika 10: Povprečni premer nanokompleksov v odvisnosti od končne koncentracije polimerov v disperziji. Masno razmerje heparin : hitosan = 1:1.

Enako kot povprečna velikost delcev tudi polidisperzni indeks narašča sorazmerno s koncentracijo (slika 11). Pri nižjih koncentracijah heparina (0,375-1,5 mg/ml) je vrednost PDI manjša od 0,4. Velik preskok se zgodi pri koncentraciji heparina 1,875 mg/ml, kjer PDI naraste do 0,650. To je lahko posledica agregacije nanokompleksov pri višjih koncentracijah.

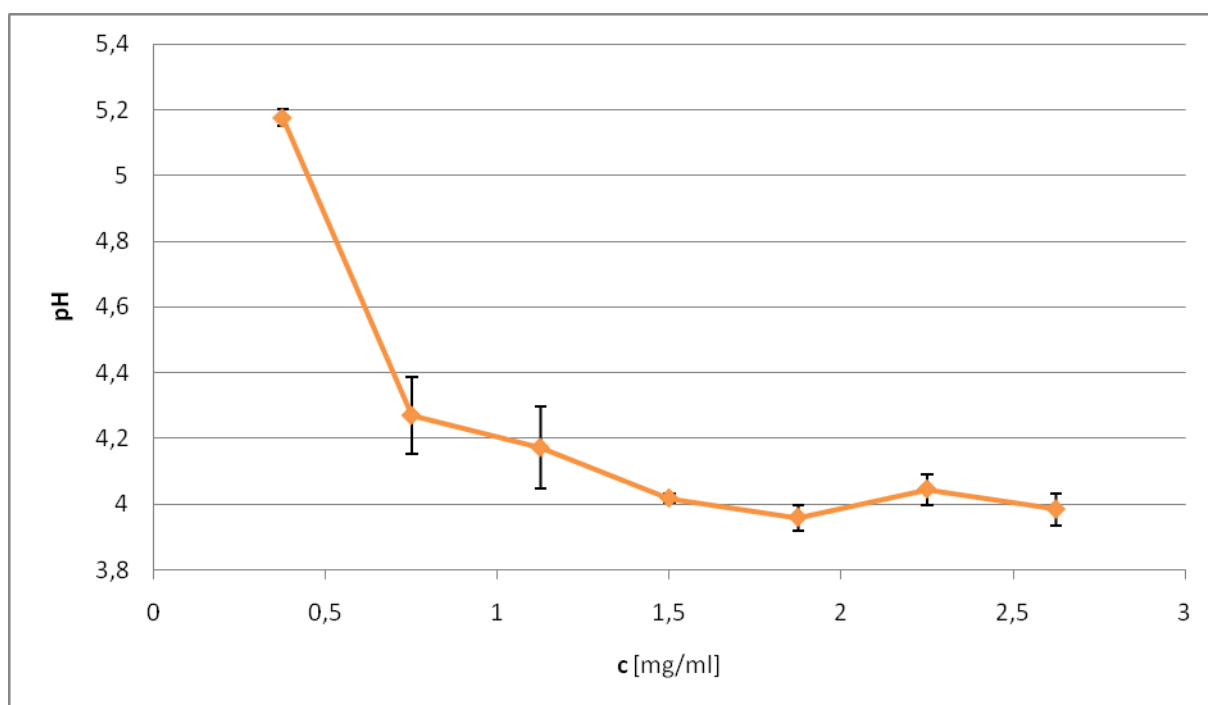


Slika 11: Polidisperzni indeks nanokompleksov v odvisnosti od končne koncentracije polimerov v disperziji. Masno razmerje heparin : hitosan = 1:1

Slika 12 prikazuje trend zmanjševanja ZP s povečevanjem koncentracije nanokompleksov v disperziji. Za pozitivni zeta potencial so odgovorne amino skupine, ki so izpostavljene na površini nanokompleksov. Ugotovili smo že, da pri višjih koncentracijah hitosana in heparina nastajajo večji nanokompleksi, ki pa imajo očitno na površini manj pozitivno nabitih amino skupin.



Slika 12: Zeta potencial nanokompleksov v odvisnosti od končne koncentracije polimerov v disperziji. Masno razmerje heparin : hitosan = 1:1



Slika 13: pH disperzij nanokompleksov v odvisnosti od končne koncentracije polimerov v disperziji. Masno razmerje heparin : hitosan = 1:1

Slika 13 prikazuje odvisnost pH disperzij od končne koncentracije nanokompleksov. pH vrednost disperzije s končno koncentracijo heparina 0,375 mg/ml je 5,18, pri 2-krat višji koncentraciji (0,750 mg/ml) pa pade na 4,27. Pri najvišji koncentraciji heparina v disperziji (2,625 mg/ml) je pH 3,98. Nizek pH pri višji koncentraciji polielektrolitov v disperziji je posledica večje koncentracije hitosanijevega klorida. Zaradi protiona (Cl^-) je pH raztopin hitosana nizek in se s povečevanjem koncentracije še znižuje. To pa pomeni tudi nižji pH pri disperzijah nanokompleksov. Z vidika stabilnosti disperzij je pH vrednost blizu optimalne, saj, kot so pokazali Yu-Hsin Lin in sodelavci, je največje število interakcij med funkcionalnimi skupinami heparina in hitosana v območju vrednosti pH od 4,5 do 6,5. Heparin ima tri vrste funkcionalnih skupin: sulfatne, sulfamidne in karboksilne. Pri pH vrednostih med 1,5 in 2,5 so na podlagi FT-IR spektrov ugotovili, da so bile na heparinu prisotne neprotonirane sulfatne skupine ($-\text{SO}_4^{2-}$) in določen del karboksilnih skupin, ki je bil protoniran ($-\text{COOH}$). V območju vrednosti pH med 4,5 in 6,5 pa je, poleg sulfatnih, tudi večina karboksilnih skupin neprotoniranih ($-\text{COO}^-$). To pomeni večje število interakcij med negativno nabitimi skupinami heparina in pozitivno nabitimi amino ($-\text{NH}_3^+$) skupinami hitosana. (3, 12)

4.2 VREDNOTENJE SPROŠČANJA HEPARINA IZ HITOSANSKIH NANOKOMPLEKSOV IN TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV S HITOSANSKIMI NANOKOMPLEKSI

Eksperiment smo nadaljevali z ugotavljanjem vpliva različne sestave termoreverzibilnih hidrogelov na profil in hitrost sproščanja heparina iz hitosanskih nanokompleksov. Raziskali smo tudi vpliv koncentracije polielektrolitov v disperziji na hitrost sproščanja heparina. Uporabili smo metodo brez membrane, pri kateri imamo neposreden stik med hidrogelom in medijem, kar omogoča spremljanje erozije gela. Pri tem modelu potekata dva procesa: Fickova difuzija učinkovine in raztapljanje poloksamerov.

Pri sproščanju učinkovine iz hidrogelov ima, poleg difuzije pomembno vlogo tudi nabrekanje. Poloksameri sodijo v skupino sistemov, pri katerih z nabrekanjem nadzorujemo sproščanje. Ob stalnem nabrekanju se lahko gel raztaplja tekom nabrekanja ali pa kasneje. (36)

4.2.1 Izbor disperzij nanokompleksov za vgrajevanje v termoreverzibilne hidrogele

Na podlagi rezultatov iz poglavja 4.1.3 smo izbrali tri koncentracije polimerov, ki so dajale nanokomplekse primernih velikosti. Najvišja koncentracija polimerov (heparina in hitosana), ki je še dajala nanokomplekse manjše od 300 nm, je bila 1,125 mg/ml. Pri koncentraciji polimerov 1,875 mg/ml je zanimivo dejstvo, da se je, v primerjavi z ostalimi koncentracijami, polidisperzni indeks naglo povečal na 0,73. To pomeni, da je porazdelitev velikosti delcev nehomogena, nas pa je zanimalo, kako to vpliva na hitrost sproščanja heparina. V tabeli VII so prikazane lastnosti nanokompleksov v disperziji z različnimi koncentracijami polimerov.

Tabela VII: Povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial nanokompleksov v disperzijah z različnimi koncentracijami hitosana in heparina

c (hit)	c (hep)	d	PDI	ZP	pH
[mg/ml]	[mg/ml]	[nm]		[mV]	
0,375	0,375	160	0,241	35,8	5,12
1,125	1,125	282	0,455	38,5	4,35
1,875	1,875	380	0,729	38,5	4,07

4.2.2 Izbor sestave termoreverzibilnih hidrogelov

Tabela VIII: Oznake za različne termoreverzibilne hidrogelove z različnimi končnimi koncentracijami heparina kompleksiranega s hitosanom

	Sestava hidrogelov	Koncentracije heparina v gelih		
		0,375 mg/ml	1,125 mg/ml	1,875 mg/ml
F1	18% P407	F1A	F1B	F1C
F2	18% P407 + 1% P188	F2A	F2B	F2C
F3	18% P407 + 1% P188 + 1% HPMC	F3A	F3B	F3C

Za lažjo interpretacijo in večjo preglednost rezultatov smo različne formulacije hidrogelov označili s črko F (1, 2, 3) in koncentracije s črkami A, B, C (tabela VIII).

Za doseg podaljšane sproščanja smo uporabili poloksamer 407 (formulacije F1), kateremu smo dodali poloksamer 188 (formulacije F2) in v tretjem primeru še HPMC (formulacije F3). Poloksamer 407 se je izkazal kot dobra osnova za tvorbo hidrogelov, saj so Lewis P. Stratton in sodelavci ugotovili, da je formulacija tudi po 18 dneh pri 37°C uspela zadržati homogeno distribucijo proteina v gelu, t.j. ni prišlo do sedimentacije. (17) Ta fizikalna lastnost poloksamera je pomembna tudi v našem primeru, saj je zaželeno, da se ohrani relativno konstantna hitrost sproščanja ob raztapljanju gela. V primeru sedimentacije nanokompleksov bi se hitrost sproščanja s časom spreminjala.

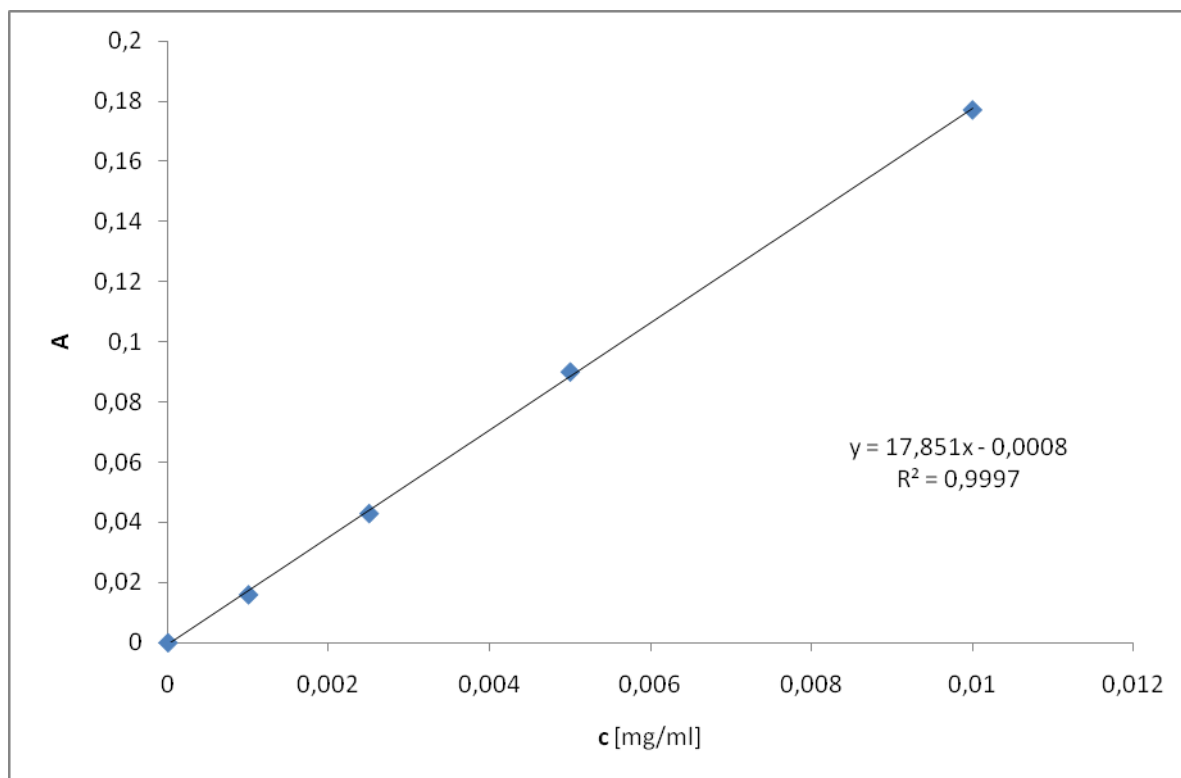
Pri pripravi koloidne raztopine, ki je vsebovala le P407, so avtorji ugotovili, da ima prenizko temperaturo geliranja (18,2°C). Če je temperatura geliranja nižja od 25°C, to predstavlja težave za proizvodnjo in aplikacijo zdravila, saj je v obliki gela pri sobni temperaturi. Če pa je višja od 37°C, formulacija ne gelira pri telesni temperaturi.

Temperatura geliranja narašča z dodajanjem poloksamera 188, in sicer do 28,2°C pri vsebnosti 10%. Geliranje pri povišani temperaturi je posledica interakcij med posameznimi deli poloksamerov. Z naraščajočo temperaturo se molekule kopolimera združujejo v micelle zaradi dehidracije hidrofobnih polioksiopropilen enot. Te predstavljajo notranjost micela, zunanja površina pa je sestavljena iz hidratiranih nabreklih polioksietilenskih verig. Ko je koncentracija poloksamerov dovolj velika, se miceli uredijo v mrežo in pride do geliranja. (36)

4.2.3 Analitika heparina - priprava umeritvene krivulje

Spektrofotometrična metoda detekcije heparina izkorišča spremembo barve raztopine, ki se zgodi med interakcijo aniona heparina s kationom Azur A barvila. (3)

Azur A barvilo agregira na površini makromolekule heparina, kar povzroči premik absorptivnega maksimuma barvila iz 620 nm na 512 nm. Za tvorbo takšnega kompleksa je torej potrebna prisotnost negativnih skupin. V primeru kompleksa heparin/hitosan le-te niso na voljo, kar pomeni, da barvilo ne more interagirati s heparinom. To dejstvo je osnova za razlikovanje med prostim heparinom in heparinom v nanokompleksih s hitosanom.



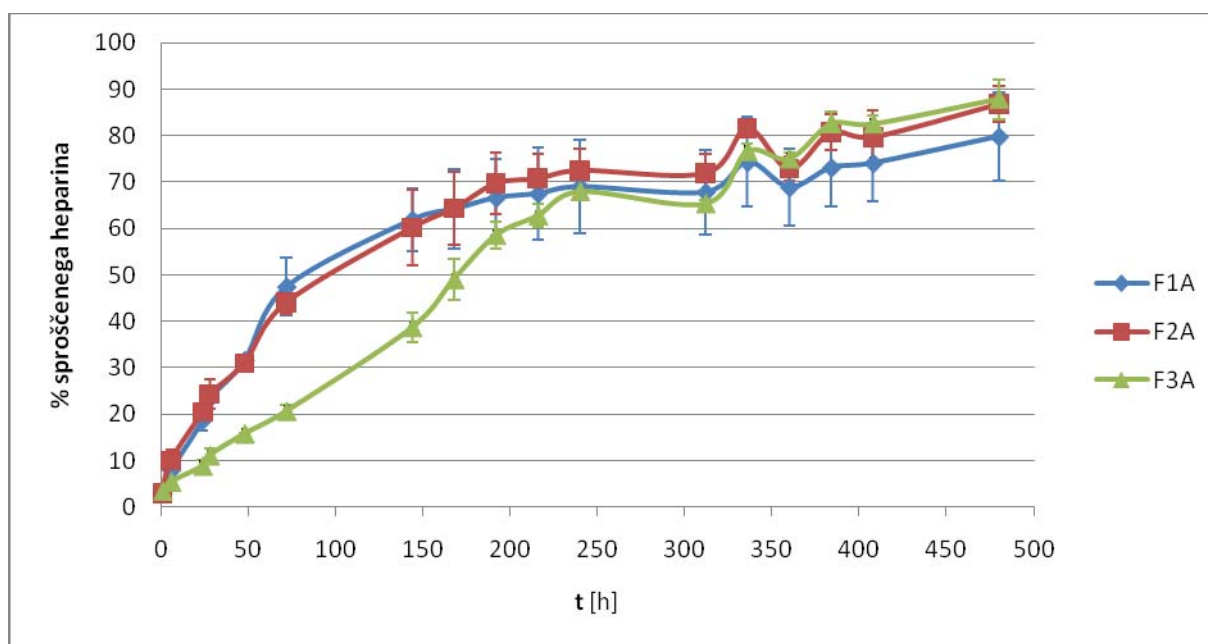
Slika 14: Umeritvena krivulja za komplekse heparin/azur

Najprej smo določili odvisnost odziva instrumenta (absorbanca) od koncentracije kompleksa heparin/azur. Pri tem se je izkazalo, da ustreza enačbi $y = 17,851x - 0,0008$, katero smo potem uporabljali ves čas trajanja eksperimenta. Kot je razvidno s slike 14, je prileganje premice na izmerjene točke zelo dobro (korelacijski koeficient R^2 je blizu 1), kar pomeni, da bodo koncentracije, izračunane na podlagi te premice, točne.

4.2.4 Sproščanje heparina iz termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi

4.2.4.1 Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi na sproščanje heparina

Najprej smo primerjali hitrost sproščanja heparina iz treh različnih hidrogelov, izdelanih iz disperzij nanokomplekskov, v katerih je bila koncentracija heparina in hitosana 0,375 mg/ml.



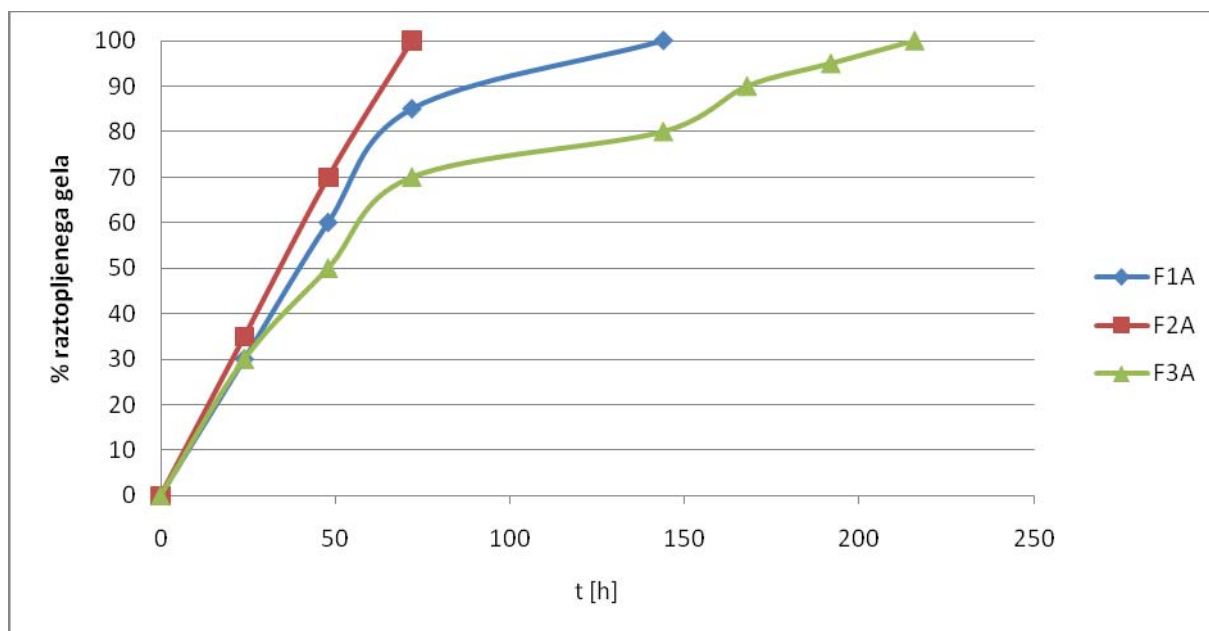
Slika 15: Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi na hitrost sproščanja heparina. Koncentraciji heparina in hitosana v disperziji: 0,375 mg/ml.

Na podlagi rezultatov s slike 15 lahko ugotovimo, da sta profila sproščanja heparina podobna za formulaciji F1A in F2A. Pri formulaciji F3A odstotek sproščenega heparina na začetku narašča počasneje. To je posledica sestave termoreverzibilnih hidrogelov, saj F3A vsebuje tudi HPMC, ki nabreka počasneje in tako povzroči, da je erozija gela počasnejša, odstotek sproščenega heparina pa nižji.

Zawar L.R. in sodelavci so pokazali, da se pri formulacijah, ki vsebujejo P407, P188 in HPMC, podaljša čas sproščanja učinkovine, ker ima HPMC inertno matriks strukturo in tvori kletko na površini gela. S tem upočasnjuje nabrekanje ter upočasnjuje sproščanje učinkovine v medij. (16)

Enako ugotovitev podpira tudi naše spremljanje raztapljanja hidrogelov (slika 16). Na začetku poskusa so vsi trije vzorci imeli 1 ml hidrogela s hitosanskimi nanokompleksi. Formulacija F3A se je popolnoma raztopila kasneje kot formulaciji F1A in F2A, in sicer po 216-ih urah.

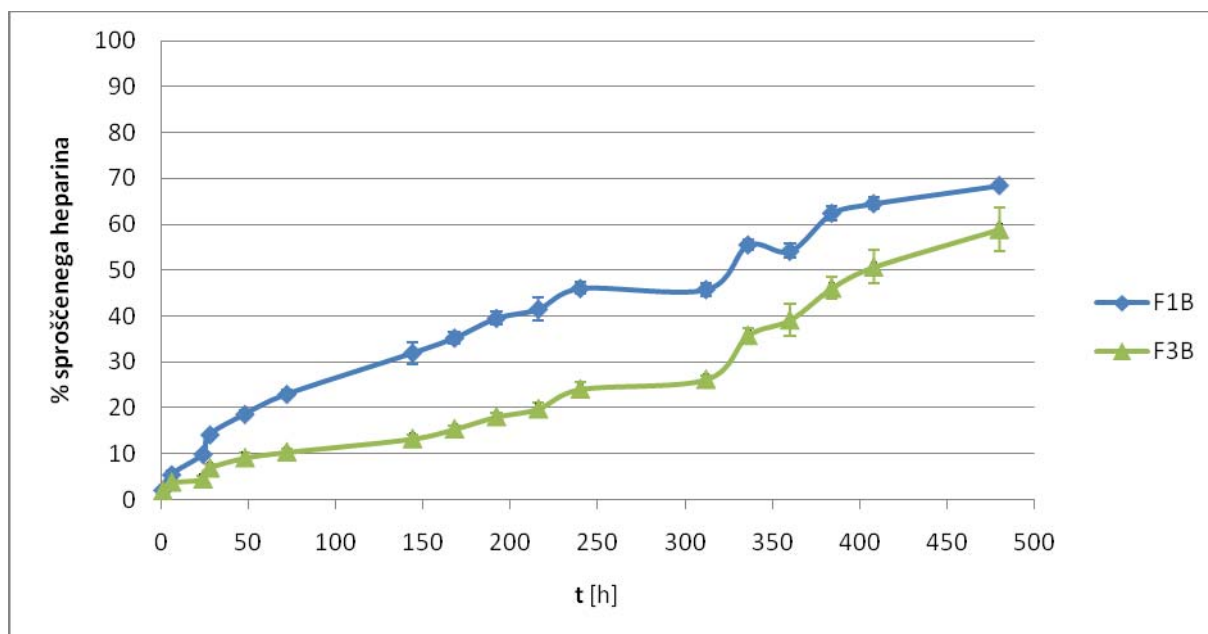
Ob tem času pa formulacija F3A doseže približno enak odstotek sproščene heparina kot formulaciji F1A in F2A. Pri nadaljnjem spremljanju se vse obnašajo podobno.



Slika 16: Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi na hitrost raztapljanja hidrogelov. Koncentraciji heparina in hitosana v disperziji: 0,375 mg/ml.

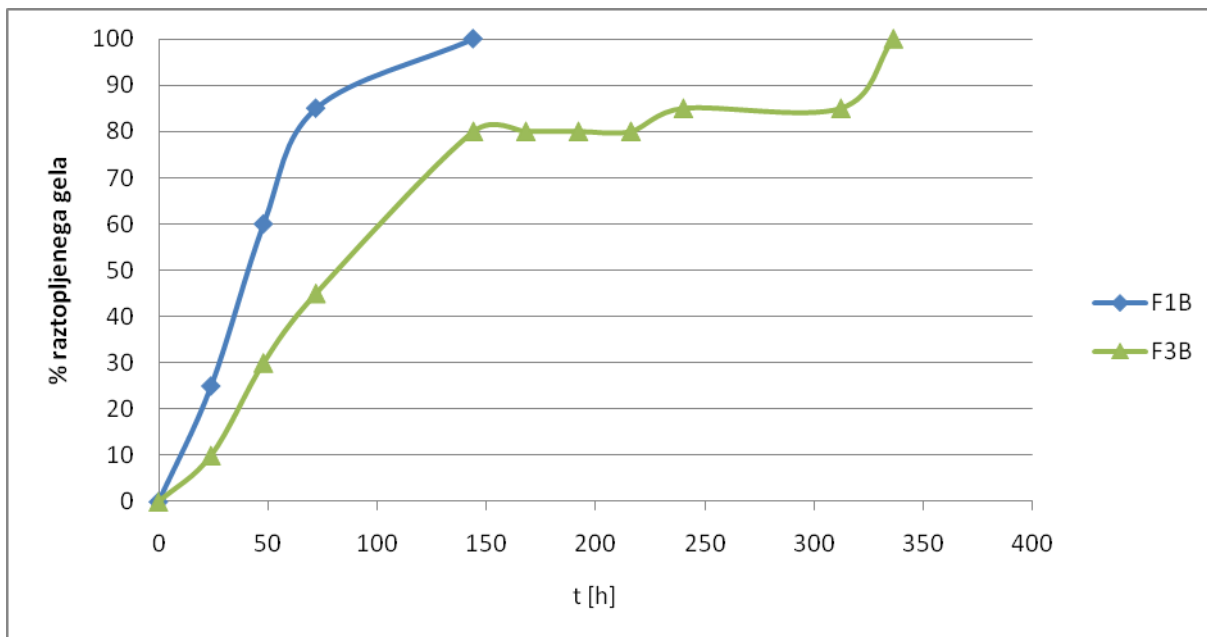
S slike 16 je razvidno, da se je formulacija F2A raztopila hitreje kot formulacija F1A, kar kaže na to, da je prisotnost poloksamera 188 pospešila raztapljanje. Bermudez J.M. in sodelavci so prišli do nasprotnih rezultatov. Pri 5% koncentraciji poloksamera 188 v raztopini P407 so opazili 12% znižanje erozije gela, kar očitno pomeni, da ima P188 precejšen vpliv na erozijo. To bi lahko pripisali povečanju števila micelov in njihove velikosti pri višjih koncentracijah kopolimerov. Poleg tega lahko višje koncentracije poloksamerov povzročijo krajše razdalje med miceli, kar vodi v več povezav med sosednjimi miceli. (36)

Po podatkih številnih avtorjev so lastnosti hidrogela iz različnih kombinacij poloksamerov v veliki meri odvisne od učinkovine, ki je vključena v gel. Z vsako molekulo so interakcije poloksamerov drugačne, kar zahteva vsakokratno optimizacijo. Poleg višje koncentracije je to zelo verjeten razlog za takšne rezultate.



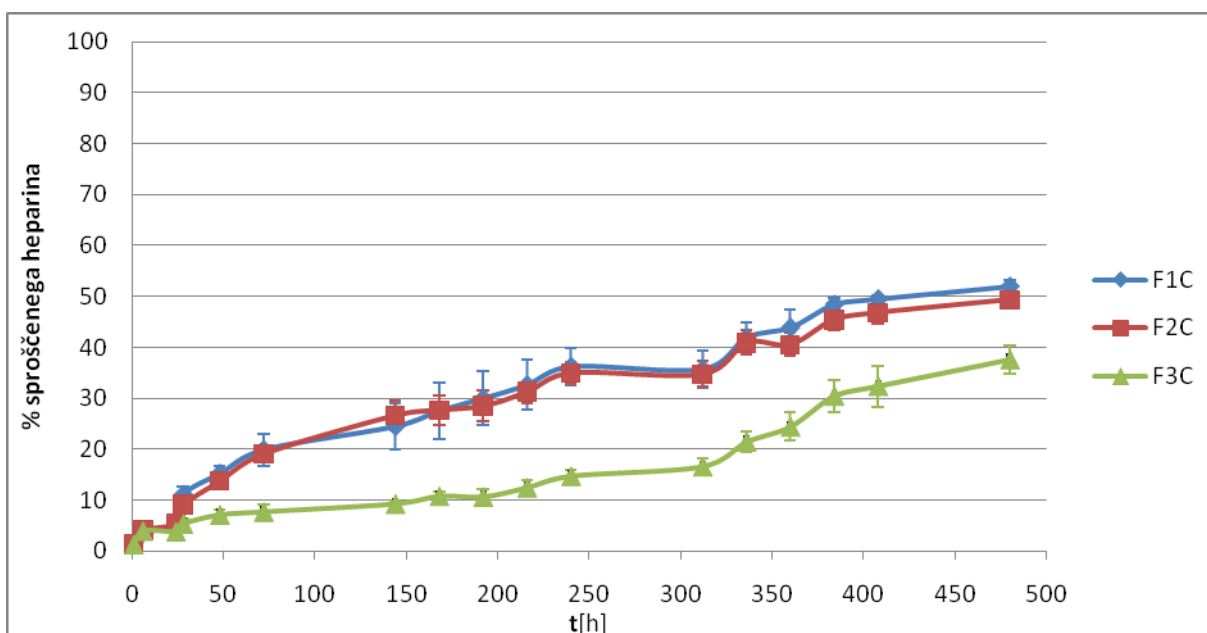
Slika 17: Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi na hitrost sproščanja heparina. Koncentraciji heparina in hitosana v disperziji: 1,125 mg/ml.

V nadaljevanju smo primerjali hitrost sproščanja heparina iz treh različnih hidrogelov, izdelanih iz disperzij nanokompleksov, v katerih je bila koncentracija heparina in hitosana 1,125 mg/ml. Oblika profila sproščanja je pri formulacijah F1B in F3B podobna (slika 17). F2B smo izločili, ker je izkazovala nerealne rezultate, kar je verjetno posledica napake pri pripravi hidrogela. To so potrdili tudi rezultati raztapljanja hidrogela. Odstotek sproščena heparina se je počasi povečeval, to pa se je hitreje dogajalo pri F1B kot F3B. Na podlagi rezultatov s slike 17 lahko ugotovimo, da se odstotek sproščena heparina povečuje hitreje pri formulaciji F1B, ki vsebuje nižjo koncentracijo polimerov. S slike 18 je razvidno, da poteka erozija gela pri formulaciji F3B bistveno počasneje kot pri F1B. Primerjava slik 17 in 18 nam pokaže povezavo med raztapljanjem gela in odstotkom sproščena heparina, ki je najbolj očitna pri F3B. Tu je profil sproščanja bolj položen, dokler še obstaja gel (0-336 h), nato pa odstotek sproščena heparina narašča hitreje.



Slika 18: Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi na hitrost raztapljanja hidrogelov. Koncentraciji heparina in hitosana v disperziji: 1,125 mg/ml.

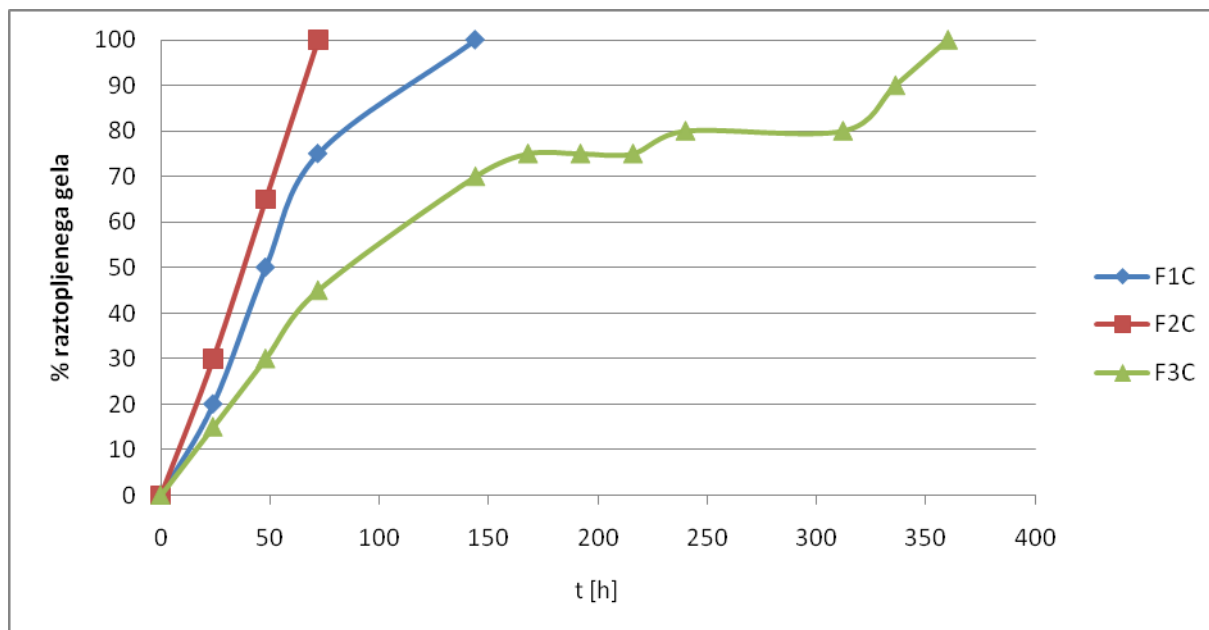
Nazadnje smo primerjali še hitrost sproščanja heparina iz treh različnih hidrogelov, izdelanih iz disperzij nanokompleksov, v katerih je bila koncentracija heparina in hitosana 1,875 mg/ml.



Slika 19: Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi na hitrost sproščanja heparina. Koncentraciji heparina in hitosana v disperziji: 1,875 mg/ml.

Na podlagi rezultatov s slik 15, 17 in 19 lahko ugotovimo, da višja kot je koncentracija nanokompleksov, manjši odstotek heparina se sprosti v 480 urah. V primeru koncentracije

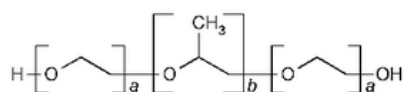
heparina 1,875 mg/ml je ta odstotek komaj 38-50% v primerjav s koncentracijo 0,375 mg/ml, kjer je skoraj 90%. Pri najvišji koncentraciji heparina je razlika med posameznimi formulacijami tudi najbolj očitna. Formulacija F3C ima ob koncu poskusa izrazito nižji odstotek sproščenega heparina, kar je posledica prisotnosti HPMC, ki nabreka počasneje kot poloksamera ter s tem povzroča počasnejšo erozijo gela. To dejstvo podpira tudi slika 20, iz katere je razvidno, da je v primeru F3C gel prisoten skozi daljše časovno obdobje kot pri ostalih dveh formulacijah.



Slika 20: Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi na hitrost raztapljanja hidrogelov. Koncentraciji heparina in hitosana v disperziji: 1,875 mg/ml.

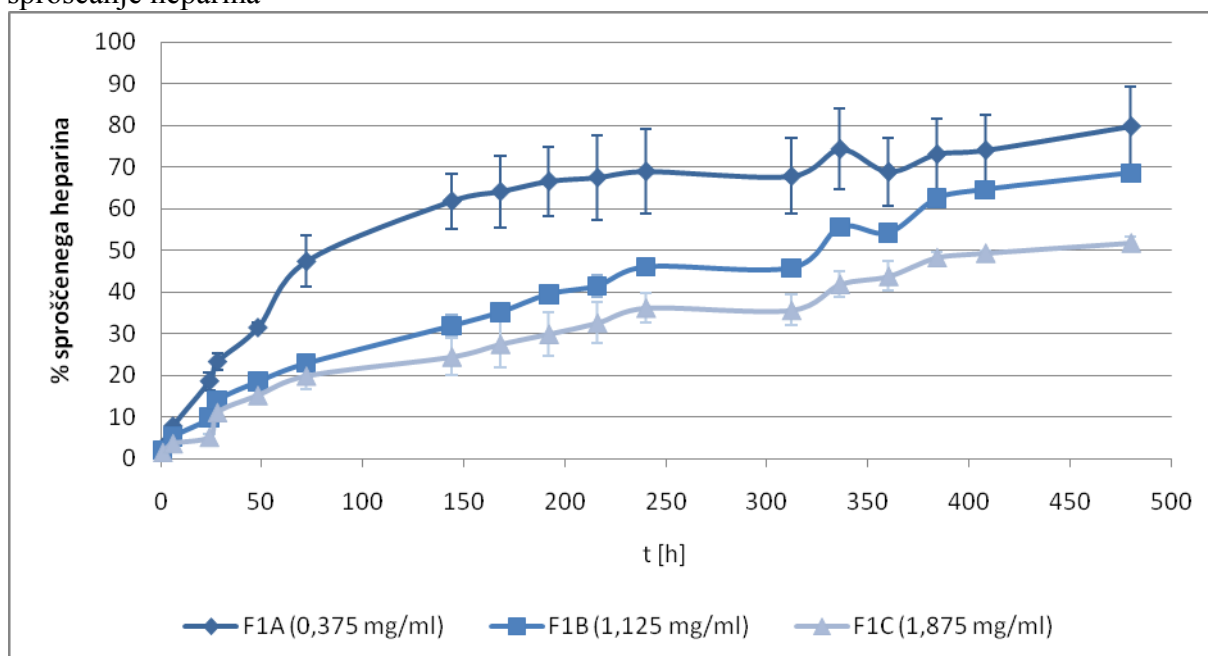
Primerjava grafov raztapljanja gela pri vseh treh koncentracijah (slike 16, 18 in 20) kaže, da je raztapljanje gela hitrejše v primeru prisotnosti P188. P188 vpliva na hitrost nabrekanja in erozije gela. Iz primerjave strukture P188 (MM = 7680-9510 kDa) in P407 (MM = 9840-14600 kDa) lahko ugotovimo, da je razlika v hitrosti raztapljanja gela lahko posledica nižje molekulske mase poloksamera 188 ter njegove relativno bolj hidrofilne narave. S slike 21 je razvidno, da je odstotek oksietilenskih enot pri poloksameru 188 višji (79,9-83,7%) v primerjavi s poloksamerom 407 (71,5-74,9%). Ravno delež teh enot je ključen za dobro hidratacijo polimera, kar povzroči hitrejše nabrekanje in raztapljanje gela. Bolj hidrofilen polimer z nižjo MM se raztaplja hitreje.

Poloksamer	a	b	Vsebnost oksietilenskih enot (%)
124	12	20	44,8-48,6
188	80	27	79,9-83,7
237	64	37	70,5-74,3
338	141	44	81,4-84,9
407	101	56	71,5-74,9



Slika 21: Strukturna formula poloksamerov in odstotek hidrofilnih enot (13)

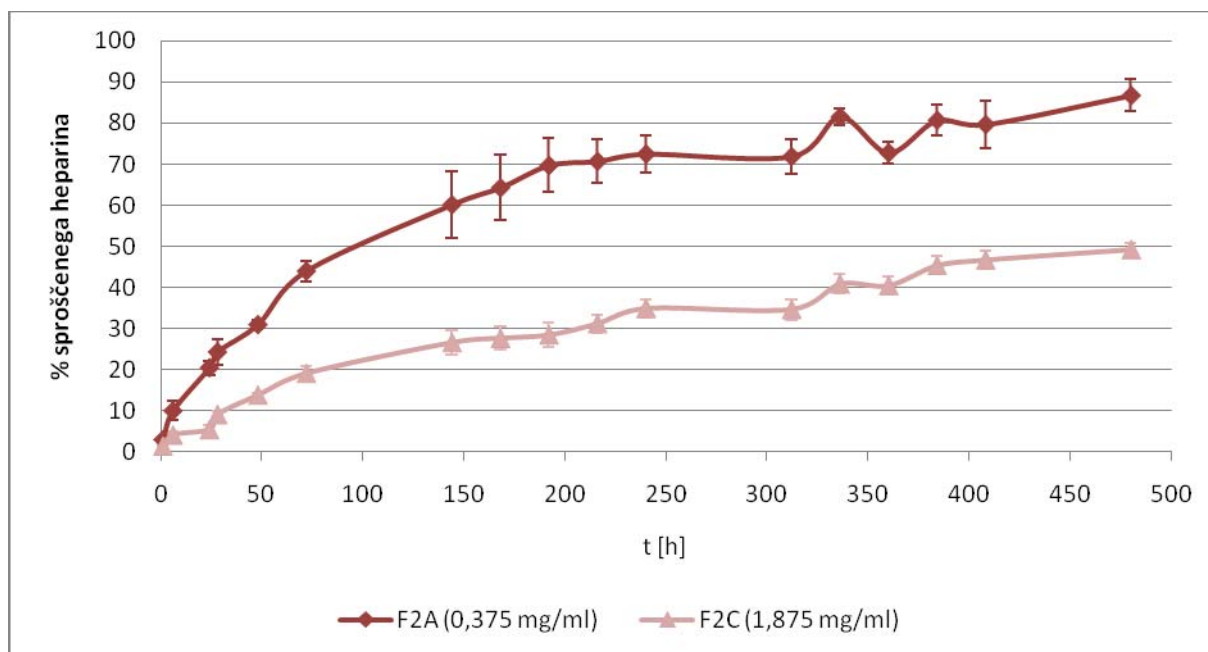
4.2.4.2. Vpliv koncentracije nanokompleksov v različnih formulacijah hidrogelov na sproščanje heparina



Slika 22: Vpliv koncentracije nanokompleksov heparina in hitosana, izražena kot koncentracija nanokompleksiranega heparina v termoreverzibilnem hidrogelu (18% P407) na hitrost sproščanja heparina.

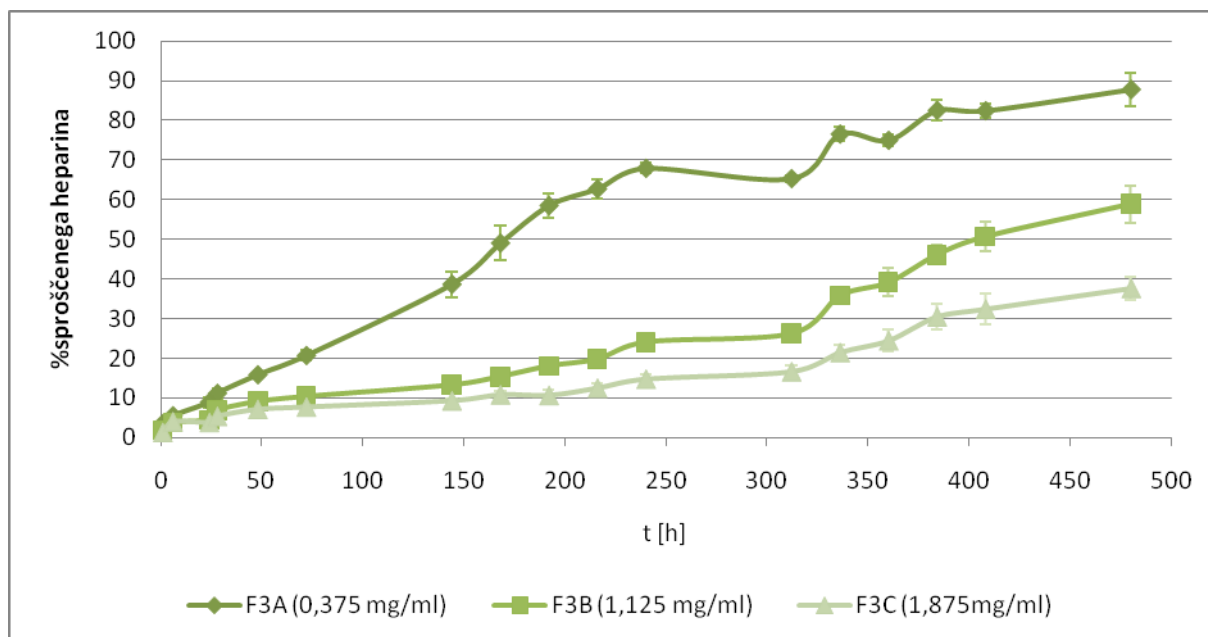
V prvem primeru smo za tvorbo termoreverzibilnega gela uporabili 18% m/m poloksamera 407. Kot je razvidno s slike 22, je profil sproščanja odvisen od koncentracije nanokompleksov v gelu. V primeru začetne koncentracije heparina 0,375 mg/ml (F1A) opazimo, da se odstotek sproščene heparina v prvih 144 urah naglo poveča. To dejstvo bi lahko pripisali popolnemu razpadu gela, ki se je zgodil po 150 urah. Razlika med profili sproščanja heparina iz gelov z različnimi koncentracijami nanokompleksov je lahko posledica različnega pH disperzij nanokompleksov. Pri višji koncentraciji nanokompleksov je pH disperzije nižji.

Predvidevamo, da ravno to dejstvo zmanjša hitrost obarjanja hitosana, ki se dogaja pri povišani vrednosti pH, ki je posledica stika disperzije z medijem za sproščanje. Zato kasneje pride do destabilizacije nanokompleksov, kar izmerimo kot nižji odstotek sproščenega heparina.



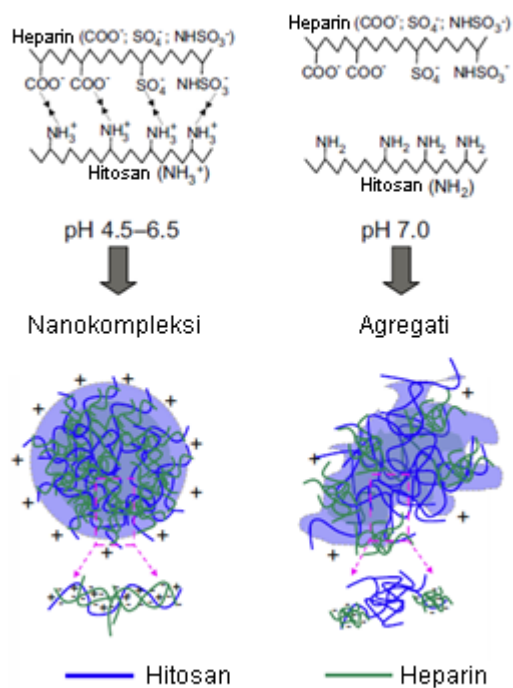
Slika 23: Vpliv koncentracije nanokompleksov heparina in hitosana, izražena kot koncentracija nanokompleksiranega heparina v termoreverzibilnem hidrogelu (18% P407 + 1% P188) na hitrost sproščanja heparina.

V drugem primeru smo za tvorbo termoreverzibilnega gela uporabili 18% poloksamera 407 ter 1% poloksamera 188. Tudi v tem primeru (slika 23) je profil sproščanja heparina odvisen od koncentracije nanokompleksov v gelu, in sicer je sproščanje hitrejše pri nižji koncentraciji.



Slika 24: Vpliv koncentracije nanokompleksov heparina in hitosana izražena kot koncentracija nanokompleksiranega heparina v termoreverzibilnem hidrogelu (18% P407 + 1% P188 + 1% HPMC) na hitrost sproščanja heparina.

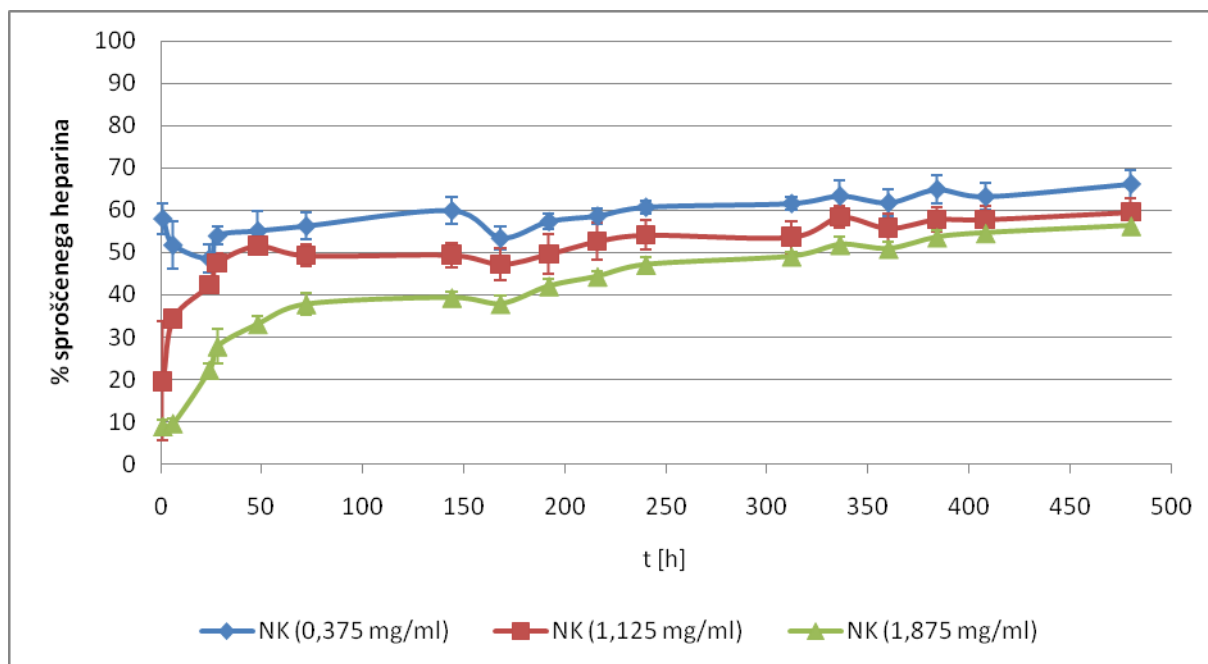
V tretjem primeru smo za tvorbo termoreverzibilnega hidrogela uporabili 18% poloksamera 407, 1% poloksamera 188 in 1% HPMC. Kot vidimo na sliki 24, poteka sproščanje heparina pri koncentraciji 0,375 mg/ml najhitreje in doseže najvišji odstotek po 480 urah. Tudi tukaj predvidevamo, da je to posledica nizke pH vrednosti disperzij, kar povzroči destabilizacijo manjšega števila nanokompleksov kot v primeru višjega pH. Yu-HsinLin in sodelavci so ugotovili, da so nanokompleksi v območju pH 4,5-6,5 stabilni zaradi večjega števila interakcij med negativno nabitimi skupinami heparina in pozitivno nabitimi amino skupinami hitosana (Slika 25). Pri pH 7,0 pa je hitosan deprotoniran, kar vodi do razpada nanokompleksov. (12) Vrednost pH disperzij nanokompleksov pred pripravo termoreverzibilnih hidrogelov je znašala 5,1 pri koncentraciji heparina 0,375 mg/ml in 4,1 pri koncentraciji 1,875 mg/ml. S periodično menjavo medija za sproščanje (fosfatni pufer pH 7,4) pri vzorčenju smo povzročili vsakokratno povečanje pH vrednosti. Torej se je pH raztopine pri višji koncentraciji nanokompleksov kasneje dvignila nad vrednost 7,0, pri kateri so dokazali, da nanokompleksi razpadejo. Posledično je razpadlo relativno manj nanokompleksov in izmerili smo nižji odstotek sproščene heparina.



Slika 25: Shematični prikaz interakcij molekul hitosana in heparina pri različnih pH vrednostih (12)

Na podlagi primerjave vseh treh profilov sproščanja heparina lahko zaključimo, da ima na obliko profila koncentracija nanokompleksov večji vpliv kot sestava hidrogelov. Z različnimi formulacijami gelov pa predvsem vplivamo na začetno hitrost sproščanja heparina.

4.2.5 Sproščanje heparina iz hitosanskih nanokompleksov

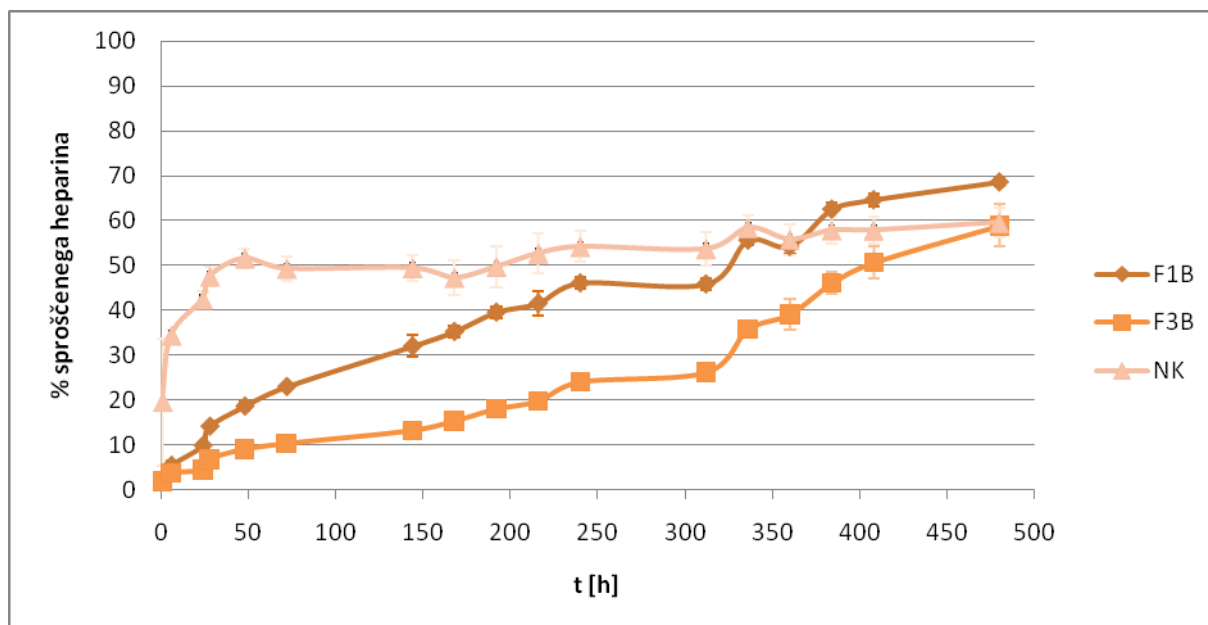


Slika 26: Vpliv koncentracije nanokompleksov heparina in hitosana (izražene kot koncentracija nanokompleksiranega heparina) v disperziji na hitrost sproščanja heparina.

Kot je razvidno s slike 26, je sproščanje, tako pri uporabi termoreverzibilnih hidrogelov, kot tudi v primeru uporabe samih disperzij nanokompleksov, odvisno od koncentracije nanokompleksov. Pri koncentraciji polielektrolitov 0,375 mg/ml opazimo, da se velik del heparina sprosti že po eni uri (cca 60%). To je posledica povišanja pH ob dodatku pufru in posledične deprotonacije in obarjanja hitosana, kar vodi v razpad nanokompleksov in sprostitve velike količine heparina. Zaporedje hitrosti sproščanja heparina iz disperzij NK je enako kot pri gelih. Presenetljivo skozi celoten čas poskusa odstotek sproščene heparina narašča zelo počasi. Očitno dvig pH ne povzroči razpada manjšega dela nanokompleksov, kar potrjuje tudi odstotek sproščene heparina v zadnji časovni točki vzorčenja (<70%). Predvidevamo, da se to zgodi zaradi nizkega pH disperzij nanokompleksov. Drugo razlago pa bi lahko ponudili F.A. Oyarzun-Ampuero in sodelavci, ki so s proučevanjem vpliva različnih medijev z enakim pH 7,4 (PBS in HBSS raztopina Hankove uravnovežene soli – skupina soli, ki v raztopini ustvarjajo fiziološki pH in osmotski tlak ter so bogate s karbonatnimi ioni) ugotovili, da prisotnost PO_4^{2-} ionov verjetno vpliva na hidratacijski ovoj nasprotno nabitih ionov na površini nanokompleksov. Poleg tega naj bi spremenili strukturo vode v sistemu. Pri uporabi fosfatnega pufru ta efekt povzroča povečanje odbojnih hidratacijskih sil in zato večjo stabilnost nanokompleksov. (35)

4.2.6 Primerjava sproščanja heparina iz hitosanskih nanokompleksov in termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi

Odstotek sproščenega heparina iz nanokompleksov se v primerjavi z odstotkom sproščenega heparina iz formulacij hidrogelov v prvih 50 urah naglo povečuje (slika 27), nato pa se sproščanje upočasni. Na drugi strani odstotek sproščenega heparina iz termoreverzibilnih hidrogelov (F1, F2) v začetku narašča počasneje, po 300 urah pa lahko opazimo hitrejše sproščanje. V obeh primerih je odstotek sproščenega heparina v končni časovni točki na približno enaki ravni (60-70%). Razlike v profilih so posledica prisotnosti poloksamerov in HPMC. Prisotnost hidrogela očitno ščiti nanokomplekse pred destabilizacijo, zato je odstotek sproščenega heparina na začetku nižji. Ko pa se ves gel raztopi, sproščanje heparina postane hitrejše. Pri F3 odstotek narašča najpočasneje, saj HPMC upočasnjuje raztapljanje hidrogela. Podobne razlike v profilih sproščanja heparina iz disperzij nanokompleksov in nanokompleksov v hidrogelih smo opazili tudi pri ostalih dveh koncentracijah polielektrolitov (0,375 mg/ml in 1,875 mg/ml).



Slika 27: Primerjava profilov sproščanja heparina iz hitosanskih nanokompleksov in iz termoreverzibilnih hidrogelov s hitosanskimi nanokompleksi. Koncentraciji heparina in hitosana v disperziji: 1,125 mg/ml.

5 SKLEP

Izdelali smo disperzije nanokompleksov iz osnovnih raztopin z različnimi koncentracijami heparina in hitosana, z različnim časom mešanja in s povečevanjem končne koncentracije polielektrolitov. Uporabili smo hitosan hidroklorid in heparin v masnem razmerju 1:1 in prišli do naslednjih zaključkov:

- Različno volumsko razmerje osnovnih raztopin ne vpliva bistveno na velikost delcev, PDI in zeta potencial.
- Čas mešanja disperzij pomembno vpliva na velikost delcev in PDI. Po 0,5 urnem mešanju je bil povprečni premer nanokompleksov 161 nm (PDI = 0,224), s povečevanjem časa mešanja se je zmanjševal in po 4 urah dosegel 136 nm (PDI = 0,194). Čas mešanja nima signifikantnega vpliva na zeta potencial.
- S povečevanjem koncentracije heparina in hitosana v disperzijah je povprečni premer nanokompleksov naraščal. Pri visokih koncentracijah hitosana in heparina prihaja do interakcij med večjim številom molekul, kar vodi v nastanek večjih delcev. Tudi PDI se povečuje s povečevanjem koncentracije heparina in hitosana. Meja, pri kateri se fizikalne lastnosti disperzije močno poslabšajo, je med koncentracijama polielektrolitov 1,5 in 1,875 mg/ml. ZP nanokompleksov in pH disperzij se s povečevanjem koncentracij heparina in hitosana zmanjšujeta. Vrednosti pH so bile v območju 4,0-5,2, kar je znotraj območja največje stabilnosti nanokompleksov.

V drugem delu smo različno koncentrirane disperzije nanokompleksov vgradili v termoreverzibilne hidrogele različnih sestav (poloksamer 407, poloksamer 188, HPMC). Poskus smo izvedli tudi na samih disperzijah nanokompleksov. Spremljali smo odstotek sproščenega heparina v časovnem obdobju 0-480 ur in prišli do naslednjih ugotovitev:

- Prisotnost HPMC v gelih močno upočasni hitrost sproščanja heparina ne glede na koncentracijo vgrajenih nanokompleksov. Ko se gel popolnoma raztopi, pa je hitrost sproščanja heparina iz nanokompleksov enaka kot pri formulacijah, ki HPMC ne vsebujeta.

- Raztapljanje gela je hitreje, če je v formulaciji poleg P407 prisoten tudi P188, verjetno zaradi bolj hidrofilne narave in nižje molekulske mase.
- V primeru višje koncentracije nanokompleksov v disperziji ($c(\text{hep}) = 1,125 \text{ mg/ml}$) se čas raztapljanja gela v formulaciji, ki vsebuje HPMC, podaljša za 134 ur.
- Zaradi nižje vrednosti pH pri bolj koncentriranih disperzijah pride do razpada nanokompleksov kasneje kot pri manj koncentriranih disperzijah in s tem do počasnejšega sproščanja heparina.
- Z različnimi formulacijami gelov vplivamo predvsem na začetno hitrost sproščanja heparina. Odstotek sproščenega heparina ob koncu poskusa pa je v veliki meri odvisen od koncentracije nanokompleksov v disperziji.
- Enako ugotovitev podpirajo rezultati, pridobljeni pri spremljanju sproščanja heparina iz disperzij nanokompleksov. V začetku se pri vseh koncentracijah zaradi povišanja pH vrednosti sprosti večina heparina, odstotek pa nato počasi narašča, kar kaže na to, da nanokompleksiranje heparina s hitosanom povzroči upočasnjeno sproščanje heparina.

Zaključimo lahko, da se je uporaba hidrogelov iz poloksamerov 407 in 188 ter HPMC kot dostavnih sistemov za disperzije nanokompleksov izkazala za obetaven način doseganja podaljšanega sproščanja heparina. Takšen sistem bi lahko omogočal manj pogosto aplikacijo, s tem pa bi bilo zdravljenje do bolnika prijaznejše.

6 LITERATURA

1. Cegnar M, Obermajer N, Kos J, Kristl J. Nosilni sistemi za dostavo bioloških učinkovin. V: Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, 2007: 210-247.
2. Sun W, Mao S, Wang Y et al. Bioadhesion and oral absorption of enoxaparin nanocomplexes. *Int J Pharm* 2010; 386: 275-281.
3. Liu Z, Jiao Y, Liu F et al. Heparin/chitosan nanoparticle carriers prepared by Polyelectrolyte complexation. *J Biomed Mater Res* 2007; 83: 806-8012.
4. Koetz J, Kosmella S. *Polyelectrolytes and Nanoparticles*. Springer-Verlag, 2007; 5-46.
5. Hamman JH. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar Drugs* 2010; 8: 1305-1322.
6. Kerec Kos M. Uporaba hitosana v farmaciji. *Farm. vestnik* 2006; 57: 287-291.
7. Andreja Erman. Hitosan in možna uporaba v medicini. *Zdrav.vestnik* 2011; 80: 489-498.
8. Rang HP, Dale MM, Ritter JM et al. *Pharmacology*. Churchill Livingstone, 2007: 331-345.
9. <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/McIntosh/Howitworks.html>, dostopano februar 2013.
10. <http://en.wikipedia.org/wiki/Heparin>, dostopano: maj 2012
11. Nader HB, Chavante SF, Santos EA, et al. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 529-538.
12. Lin YH, Chang CH, Wu YS, et al. Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Biomaterials* 2009; 30: 3332-3342.
13. Florence AT, Attwood D. *Physicochemical principles of Pharmacy*. Pharmaceutical press, 2006: 274-275.
14. <http://www.biomaterials.org/week/bio22.cfm>, dostopano: september 2012
15. Hitesh R, Patel MM, Rakesh P. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. *Int J PharmTech Res* 2009; 1: 299-303.
16. Zawar LR in Bhandari GS. Formulation and Evaluation of Sustained Release Ondansetron Poloxamer Based Solid Suppositories, *JAPS* 2012; 2: 186-190.
17. Stratton LP, Dong A, Manning MC, et al. Drug delivery matrix containing native protein precipitates suspended in a poloxamer gel. *J Pharm Sci* 1997; 86: 1006-1010.

18. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hypromellose>, dostopano: september 2012
19. <http://www.pharmtech.com/pharmtech/article/articleDetail.jsp?id=547891>, dostopano: maj 2012
20. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/subcutaneous+injection>, dostopano: september 2012
21. http://www.cc.nih.gov/ccc/patient_education/pepubs/subq.pdf, dostopano: september 2012
22. http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry, dostopano: maj 2012
23. Brown CW. Ultraviolet, visible, near-infrared spectrophotometers. V: Cazes J. Ewing's analytical instrumentation handbook, Marcel Dekker, 2005: 128-134.
24. Harris DC. Quantitative chemical analysis 8th edition, W.H. Freeman & Co, USA 2010: 394-406.
25. Khandpur RS. Handbook of analytical instruments, McGraw-Hill, 2007: 40-65.
26. Baselt R, et al. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, Biomedical Publications 2008; 8: 728-729.
27. Karewicz A, Zasada K, Szczubialka K, Nowakowska M. Composition for prolonged release of heparin and use of the alginate-hydroxypropylcellulose gel for prolonged release of heparin. WO2010/077156 Patent cooperation treaty (PCT) 8. Julij 2010.
28. Sylvan B. Metachromatic Dye-Substrate Interactions. J. Cell Sci. 1954; 3-95: 327-358.
29. Yang VC, Ful YY, Teng CLC, et al. A method for the quantitation of protamine in plasma. Thromb Res 1994; 74: 427-434.
30. Malvern Instruments Ltd. Size and zeta potential theory. Zetasizer Nano User Manual. MANO317; 2008: 14-1 do 14-6 in 16-1 do 16-12.
31. Whittaker AG, Mount AR in Heal MR. Physical chemistry. Taylor & Francis Group, 2000; 120-121.
32. http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm, dostopano: september 2012.
33. Sun W, Mao S, Mei D, et al. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan and enoxaparin. Eur J Pharm Biopharm 2008; 69: 417-425.
34. Hočevár L. Izdelava in fizikalno-kemijsko vrednotenje hitosanskih nanodelcev s heparinom. Diplomsko delo. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 2011.

35. Oyarzun-Ampuero FA, Brea J, et al. Chitosan–hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma. *Int J Pharm* 2009; 381: 122–129.
36. Bermudez JM and Grau R. Thermosensitive poloxamer-based injectables as controlled drug release platforms for veterinary use: Development and in-vitro evaluation. *IRJPP* 2011;1: 109-118.