

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARINA FICKO PRISTOV (FICKO)

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARINA FICKO PRISTOV (FICKO)

**FIZIKALNO-KEMIJSKO VREDNOTENJE POLIMERNIH
NANODELCEV S HEPARINOM, IZDELANIH Z DVOJNO
EMULZIJSKO METODO**

PHYSICOCHEMICAL EVALUATION OF HEPARIN-LOADED
POLYMERIC NANOPARTICLES PREPARED BY DOUBLE EMULSION
METHOD

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo 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. Zahvaljujem se tudi dr. Maji Radivojša, mag. farm., za usmeritve in nasvete pri delu v laboratoriju.

Velika zahvala gre bratrancu Boštjanu za nasvete in pomoč pri urejanju diplomske naloge. Še posebej pa se zahvaljujem svoji družini za vso podporo v času celotnega študija.

Izjava

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

Marina Ficko Pristov

Ljubljana, september 2015

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

Član diplomske komisije: asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD	1
1.1 Nanodelci	1
1.2 Fizikalno vrednotenje nanodelcev	3
1.2.1 Velikost delcev	3
1.2.2 Zeta potencial	4
1.3 Polimeri za izdelavo nanodelcev	5
1.3.1 PLGA – poli(mlečna glikolna) kislina.....	6
1.4 Antikoagulant	8
1.4.1 Heparin	8
1.5 UV-VIS spektrofotometrija in določanje heparina	10
1.5.1 Azur A kolorimetrična metoda	11
1.6 Izdelava nanodelcev z dvojno emulzijsko metodo	11
1.7 Polimerni nanodelci s heparinom	14
2 NAMEN DELA	16
3 EKSPERIMENTALNI DEL	17
3.1 Materiali	17
3.2 Naprave	18
3.3 Postopki in metode	19
3.3.1 Priprava raztopin.....	19
3.3.1.1 Priprava raztopine PVA.....	19
3.3.1.2 Priprava raztopine poloksamera.....	19
3.3.1.3 Priprava raztopin polimerov.....	20
3.3.2 Postopek izdelave praznih nanodelcev	20
3.3.3 Izdelava praznih nanodelcev s stabilizatorjem PVA	20
3.3.3.1 Vpliv koncentracije stabilizatorja PVA na fizikalne lastnosti nanodelcev	21
3.3.3.2 Vpliv časa sonikacije na fizikalne lastnosti nanodelcev.....	21
3.3.3.3 Vpliv koncentracije polimera PLGA na fizikalne lastnosti nanodelcev.	21
3.3.3.4 Ponovljivost postopka izdelave nanodelcev pri izbranih pogojih.....	21
3.3.3.5 Spremljanje fizikalne stabilnosti disperzij nanodelcev	22
3.3.4 Izdelava praznih nanodelcev s stabilizatorjem poloksamer 188	22
3.3.4.1 Vpliv časa sonikacije na fizikalne lastnosti nanodelcev.....	22

3.3.4.2	<i>Vpliv koncentracije poloksamera na fizikalne lastnosti nanodelcev.....</i>	22
3.3.4.3	<i>Vpliv koncentracije polimera PLGA na fizikalne lastnosti nanodelcev.</i>	23
3.3.5	<i>Izdelava praznih nanodelcev iz različnih polimerov</i>	23
3.3.6	<i>Izdelava nanodelcev s heparinom.....</i>	23
3.3.6.1	<i>Nanodelci s heparinom iz različnih polimerov</i>	24
3.3.6.2	<i>Vpliv koncentracije polimera na učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce</i>	24
3.3.6.3	<i>Odkvisnost učinkovitosti vgradnje heparina v nanodelce iz Eudragita od koncentracije heparina v disperziji</i>	24
3.3.6.4	<i>Vpliv koncentracije heparina na njegovo učinkovitost vgradnje v nanodelce</i>	25
3.3.6.5	<i>Vgradnja nanokompleksov heparina in hitosana v nanodelce.....</i>	25
3.3.7	<i>Fizikalno-kemijsko vrednotenje disperzij nanodelcev</i>	26
3.3.7.1	<i>Merjenje velikosti delcev in polidisperznega indeksa.....</i>	26
3.3.7.2	<i>Merjenje zeta potenciala</i>	26
3.3.7.3	<i>Določanje učinkovitosti vgradnje heparina</i>	27
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	29
4.1	Prazni nanodelci s stabilizatorjem PVA	29
4.1.1	<i>Vpliv koncentracije stabilizatorja PVA na fizikalne lastnosti nanodelcev.....</i>	29
4.1.2	<i>Vpliv časa sonikacije na fizikalne lastnosti nanodelcev.....</i>	31
4.1.3	<i>Vpliv koncentracije polimera PLGA na fizikalne lastnosti nanodelcev.....</i>	32
4.1.4	<i>Ponovljivost postopka izdelave nanodelcev pri izbranih pogojih</i>	33
4.1.5	<i>Spremljanje fizikalne stabilnosti disperzij nanodelcev</i>	35
4.2	Prazni nanodelci s stabilizatorjem poloksamer 188	36
4.2.1	<i>Vpliv časa sonikacije na fizikalne lastnosti nanodelcev.....</i>	36
4.2.2	<i>Vpliv koncentracije poloksamera na fizikalne lastnosti nanodelcev.....</i>	37
4.2.3	<i>Vpliv koncentracije polimera PLGA na fizikalne lastnosti nanodelcev.....</i>	39
4.3	Prazni nanodelci iz različnih polimerov	40
4.4	Nanodelci s heparinom	42
4.4.1	<i>Nanodelci s heparinom iz različnih polimerov.....</i>	42
4.4.1.1	<i>Primerjava fizikalnih lastnosti praznih nanodelcev in nanodelcev s heparinom.....</i>	42
4.4.1.2	<i>Učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce iz različnih polimerov.....</i>	44
4.4.2	<i>Vpliv koncentracije polimera na učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce</i>	45
4.4.3	<i>Odkvisnost učinkovitosti vgradnje heparina v nanodelce iz Eudragita od koncentracije heparina v disperziji</i>	47
4.4.4	<i>Vpliv koncentracije heparina na njegovo učinkovitost vgradnje v nanodelce</i>	48
4.4.5	<i>Vgradnja nanokompleksov heparina in hitosana v nanodelce.....</i>	49

5	SKLEP.....	51
6	LITERATURA.....	55

POVZETEK

Heparin je antikoagulant s kratkim razpolovnim časom, ki se zaradi svoje velikosti in negativnega naboja slabo absorbira iz prebavnega trakta, zato ga je potrebno aplicirati parenteralno. Za izboljšanje terapije s heparinom se raziskujejo novi dostavni sistemi. Nanodelci predstavljajo zelo privlačen dostavni sistem, ki odpira nove terapevtske možnosti za učinkovine z majhno biološko uporabnostjo ter omogoča ciljano dostavo in podaljšano sproščanje učinkovin. Za vgrajevanje hidrofilnih učinkovin v polimerne nanodelce je med najbolj primernimi dvojna emulzijska metoda.

Naš cilj je bil z dvojno emulzijsko metodo izdelati polimerne nanodelce z vgrajenim heparinom in ustreznimi fizikalnimi lastnostmi. Najprej smo z izbrano metodo pripravili prazne nanodelce in ovrednotili vpliv različnih parametrov na njihovo velikost, polidisperzni indeks in zeta potencial. Nato smo pri izbranih pogojih izdelali nanodelce s heparinom in poskušali doseči čim večjo učinkovitost vgradnje heparina. Nanodelce smo izdelali iz različnih kopolimerov polimlečne in poliglikolne kisline (PLGA) ter iz akrilatnega polimera Eudragit RS PO. Kot stabilizator smo uporabili polivinil alkohol (PVA) ali poloksamer 188.

Ugotovili smo, da na fizikalne lastnosti nanodelcev pomembno vplivajo vrsta in koncentracija stabilizatorja in polimera ter čas sonikacije pri izdelavi dvojne emulzije. Z uporabo stabilizatorja poloksamer 188 smo dobili veliko manjše nanodelce kot s stabilizatorjem PVA. Prazni nanodelci iz Eudragita so imeli najmanjši povprečni premer in pozitivni zeta potencial. Pri vgrajevanju heparina se je njihova velikost znatno povečala, zeta potencial pa znižal. Ugotovili smo, da se heparin tudi adsorbira na ogrodje iz pozitivno nabitega polimera, kar je razlog za visoko učinkovitost vgradnje v nanodelce iz Eudragita. Ugotovili smo tudi, da sta učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce iz PLGA in njihova velikost odvisni od molekulske mase in polarnosti polimera. Pri uporabi PLGA z višjo molekulsko maso in z zaestrenimi terminalnimi karboksilnimi skupinami smo dobili boljšo učinkovitost vgradnje in večje nanodelce. Zeta potencial nanodelcev iz PLGA je bil negativen.

Dvojna emulzijska metoda se je izkazala kot obetavna za izdelavo polimernih nanodelcev s heparinom, saj lahko z izbiro polimera in stabilizatorja ter pogojev izdelave v veliki meri vplivamo na fizikalne lastnosti nanodelcev in na vgradnjo heparina.

Ključne besede: polimerni nanodelci, heparin, dvojna emulzijska metoda

ABSTRACT

Heparin is an anticoagulant with a short half-life that is poorly absorbed in the gastrointestinal tract due to its size and negative charge; therefore it has to be administered by the parenteral route. To improve the therapy with heparin, new delivery systems are being researched. Nanoparticles are a very attractive delivery system that opens new therapeutic possibilities for drugs with low bioavailability and enables targeted delivery and prolonged release of drugs. One of the most appropriate methods for the encapsulation of hydrophilic drugs into polymeric nanoparticles is the double emulsion method.

Our goal was to prepare polymeric nanoparticles with encapsulated heparin and suitable physical properties by double emulsion method. Using this method, we first prepared blank nanoparticles and evaluated the influence of different parameters on their size, polydispersity index and zeta potential. Using selected parameters, we then prepared heparin-loaded nanoparticles while trying to achieve the highest heparin encapsulation efficiency possible. Nanoparticles were prepared from different copolymers of poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) and from acrylic polymer Eudragit RS PO. We used polyvinyl alcohol (PVA) or poloxamer 188 as a stabilizer.

We found that the type and concentration of the stabilizer and polymer as well as the sonication time of double emulsion significantly influence physical properties of nanoparticles. The use of poloxamer 188 as a stabilizer resulted in much smaller nanoparticles than the use of PVA. Unloaded Eudragit nanoparticles were the smallest and their zeta potential was positive. When encapsulating heparin, their size increased considerably while their zeta potential value decreased. We found that heparin is also adsorbed on the positively charged polymeric matrix, resulting in high entrapment efficiency into Eudragit nanoparticles. We also found that the encapsulation efficiency of heparin into PLGA nanoparticles and their size depend on molecular weight and polarity of the polymer. The use of PLGA with higher molecular weight and esterified carboxyl end groups resulted in higher encapsulation efficiency and larger nanoparticles. Zeta potential of PLGA nanoparticles was negative.

Double emulsion method showed promise for the preparation of heparin-loaded polymeric nanoparticles because we can significantly influence physical properties of nanoparticles and heparin encapsulation by selecting a polymer, a stabilizer and preparation parameters.

Keywords: *polymeric nanoparticles, heparin, double emulsion method*

SEZNAM OKRAJŠAV

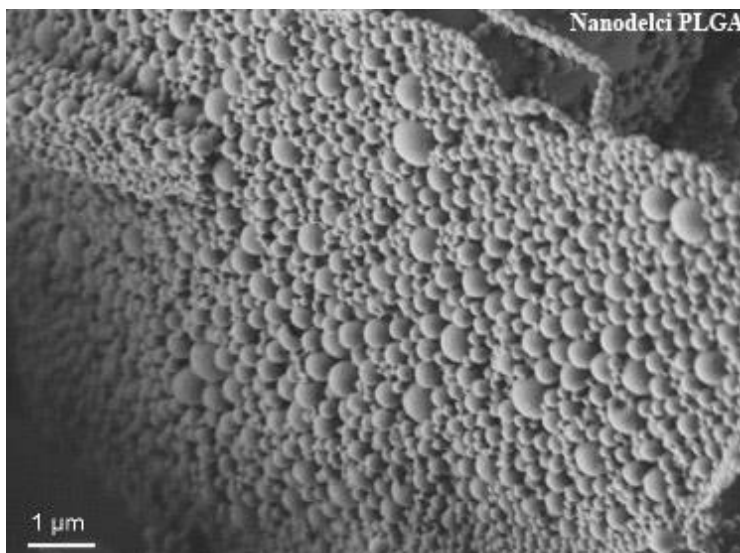
AT III	antitrombin III
D	dilucijska faza
DLS	dinamično sipanje laserske svetlobe
MM	molekulska masa
ND	nanodelci
O	organska faza
obr/min	obratov v minuti
PCL	polikaprolakton
PDI	polidisperzni indeks
PDLA	poli-D-mlečna kislina
PGA	poliglikolna kislina
PLA	polimlečna kislina
PLGA	poli(mlečna glikolna) kislina
PLLA	poli-L-mlečna kislina
PVA	polivinil alkohol
P188	poloksamer 188
Tg	temperatura steklastega prehoda
UV	ultravijolično
V1	notranja vodna faza
V2	zunanja vodna faza
VIS	vidno
ZP	zeta potencial

1 UVOD

1.1 Nanodelci

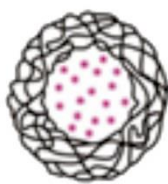
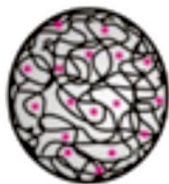
Vpliv nanotehnologije na oblikovanje dostavnih sistemov strmo narašča. Znane so različne vrste nanodelcev, ki so v fazi razvoja ali se že uporabljajo za zdravljenje. Nanodelci odpirajo nove terapevtske možnosti za učinkovine, ki jih sicer zaradi nestabilnosti in majhne biološke uporabnosti ne bi mogli učinkovito uporabiti v konvencionalnih farmacevtskih oblikah. Z varnim in ciljanim dostavljanjem se lahko izboljša tudi prihodnost nekaterih že znanih učinkovin na trgu (1).

Izmed številnih znanih dostavnih sistemov nanometrskih velikosti predstavljajo nanodelci zelo privlačne nosilce. So trdni koloidni delci velikosti 10–1000 nm (slika 1), ki so sposobni dostaviti širok spekter učinkovin na različna področja človeškega telesa. Zaradi svoje majhnosti imajo drugačne lastnosti in interakcije z biološkim okoljem kot mikro- ali makrosistemi. So bolj prodorni in potujejo globlje v tkiva, prehajajo skozi epitelij ali vstopajo v celice. Imajo še številne prednosti: lahko izboljšajo topnost učinkovin, jih zaščitijo pred razgradnjo, zagotovijo podaljšano sproščanje, spremenijo njihovo porazdeljevanje v organizmu, jih usmerijo do želenih celic in tkiv, povečajo biološko uporabnost učinkovin ter zmanjšajo njihov toksični vpliv (1,2,3,4).



Slika 1: Nanodelci PLGA, posneti z vrstično elektronsko mikroskopijo (5).

Polimerne nanodelce sestavlja nosilno ogrodje iz naravnih ali sinteznih polimerov, v katerem je učinkovina lahko raztopljena, dispergirana ali pa je adsorbirana na njegovo površino. Glede na razporeditev nosilnega ogrodja ločimo nanosfere in nanokapsule (slika 2). Nanosfere so nanodelci ogrodnega tipa in imajo ogrodje razporejeno po celotnem volumnu, nanokapsule pa predstavljajo filmsko obliko nanodelcev, kjer trdno ali tekočo notranjo sredico obdaja polimerna obloga (4,6).



NANOSFERA

NANOKAPSULA

Legenda:  polimer  zdravilna učinkovina

Slika 2: Zgradba nanosfere in nanokapsule (7).

Vgradnja učinkovine v ogrodje nanodelcev poteka med samo izdelavo ali pa učinkovino adsorbiramo na že oblikovane nanodelce. Učinkovitost vgrajevanja je odvisna od lastnosti uporabljenega polimera (kemizma, molekulske mase, funkcionalnih skupin) in učinkovine ter interakcij med njima, od postopka izdelave nanodelcev in uporabljenih tehnoloških parametrov, pomožnih snovi, koncentracij... V nanodelce iz hidrofobnih polimerov lažje vgrajujemo lipofilne učinkovine, vgradnja hidrofilnih učinkovin pa še vedno predstavlja izziv (2,3,8).

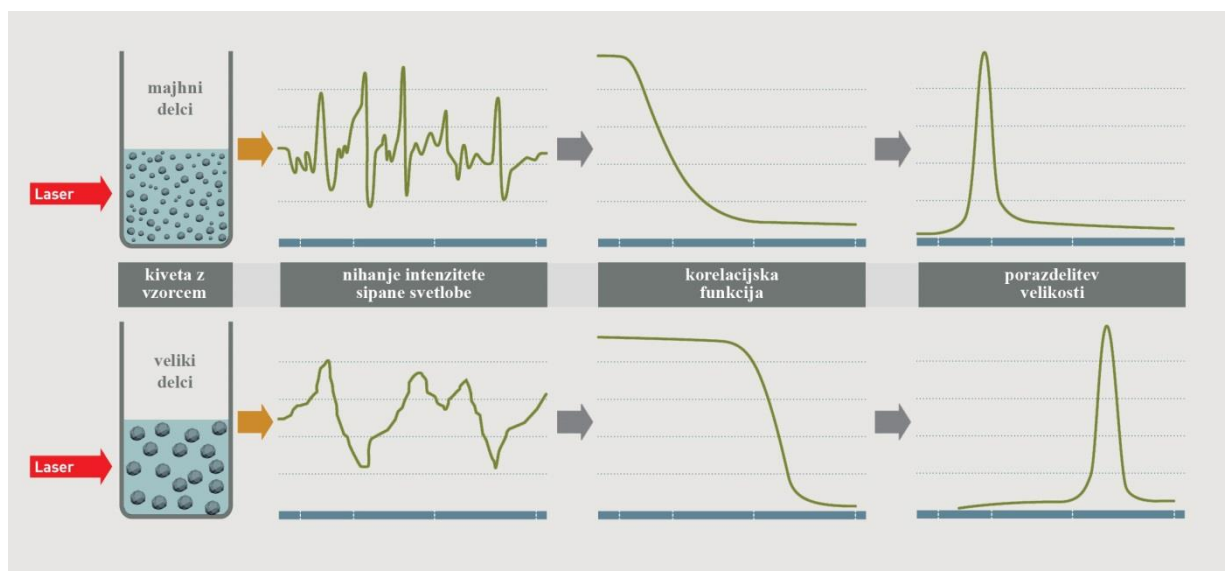
Za izdelavo polimernih nanodelcev se ponavadi uporabljata dva pristopa: polimerizacija monomernih enot ali dispergiranje obstoječih polimerov, kamor spadajo tudi različne obarjalne metode. Pri naravnih polimerih se najpogosteje uporablja metoda premreženja makromolekul, izdelava nosilnih sistemov iz sinteznih polimerov pa največkrat poteka z emulzijskimi metodami. Večina teh metod zahteva ostre pogoje in vključuje uporabo organskih topil. Vse to vpliva na lastnosti farmacevtske oblike, predvsem pa lahko škodi učinkovini, ki jo vgrajujemo, in njeni biološki aktivnosti. Zaradi tega je potrebno izbor metode in pogojev izdelave prilagoditi posamezni učinkovini. Za vgrajevanje proteinov in drugih hidrofilnih učinkovin v nanodelce se pogosto uporablja emulzijska oz. dvojna emulzijska metoda z difuzijo organskega topila (4,8,9,10).

1.2 Fizikalno vrednotenje nanodelcev

1.2.1 Velikost delcev

Pravilna določitev velikosti delcev je pri razvoju nanometrskih dostavnih sistemov zelo pomembna, saj lahko prav velikost odločilno vpliva na njihove lastnosti in obnašanje v telesu. Poznamo različne principe, na podlagi katerih lahko nanodelcem določimo velikost. Najpogosteje se uporabljajo metode, ki temeljijo na sipanju svetlobe, in elektronska mikroskopija (11).

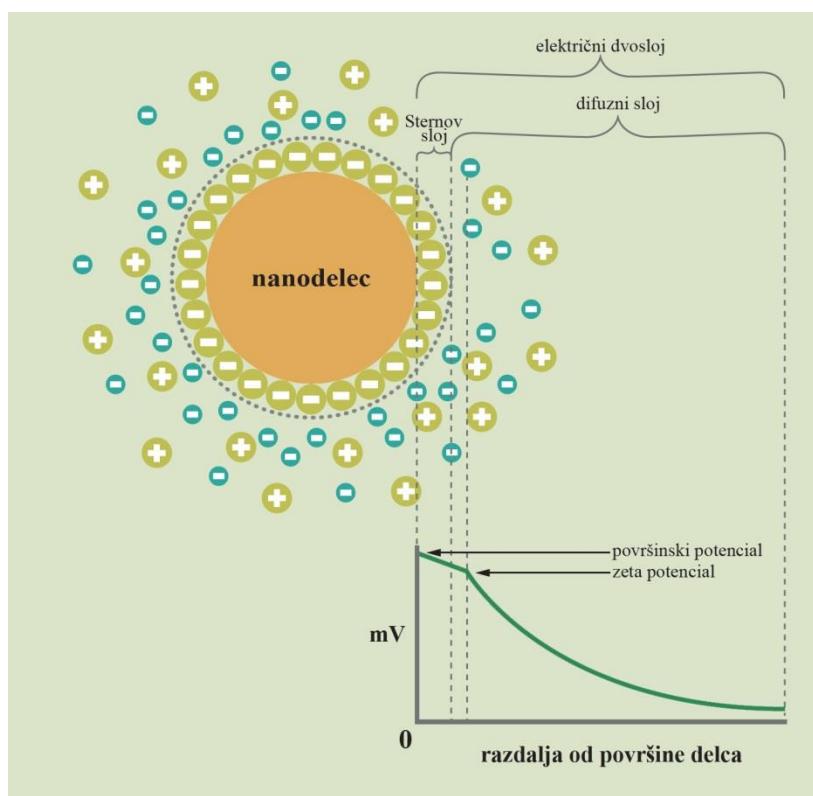
Naprava Zetasizer Nano ZS meri velikost delcev na podlagi dinamičnega sipanja laserske svetlobe (DLS), znanega tudi kot fotonska korelacijska spektroskopija (PCS). Osnova za to metodo je Brownovo gibanje, pri čemer gre za nenehno gibanje delcev, dispergiranih v tekočini, ki je posledica naključnih trkov z molekulami topila. Svetloba se pri prehodu skozi vzorec na delcih sipa. Zetasizer meri hitrost nihanja intenzitete sipane svetlobe in na osnovi teh meritev izračuna povprečni premer ter porazdelitev velikosti delcev. Ker se majhni delci gibajo hitreje kot veliki, je hitrost nihanja intenzitete sipane svetlobe pri manjših delcih večja (slika 3) (12,13).



Slika 3: Določanje velikosti delcev na podlagi DLS z napravo Zetasizer Nano (13).

1.2.2 Zeta potencial

Delci, dispergirani v vodnem mediju, imajo površinski naboj predvsem zaradi ionizacije funkcionalnih skupin na njihovi površini ali pa adsorpcije nabitih molekul. Površinski naboj delca vpliva na porazdelitev ionov okoli njega. Nabit delec privlači ione z nasprotnim nabojem in tako se okrog vsakega delca oblikuje električni dvosloj. Tega sestavljata Sternov in difuzni sloj. V Sternovem sloju so predvsem nasprotno nabiti ioni, ki so relativno trdno vezani na površino delca. Sledi mu difuzni sloj, v katerem so pozitivni in negativni ioni v neravnovesju zaradi vpliva površinskega naboja delca. To zaznamo kot električni potencial. Protiioni nevtralizirajo površinski naboj delca in večja kot je njihova koncentracija v raztopini, večje je tudi zmanjšanje površinskega potenciala. Na določeni razdalji od delca se naboji v tekočini prisotnih anionov in kationov izenačijo in površinski naboj več nima vpliva. Ta razdalja predstavlja zunanji rob difuznega sloja. Znotraj tega sloja obstaja meja, do katere se ioni, ki obdajajo delec, premikajo z delcem ob njegovem gibanju, ostali ioni za mejo pa ne sledijo temu gibanju. Potencial na tej meji se imenuje zeta potencial (slika 4) (14,15).



Slika 4: Shematski prikaz električne dvojne plasti (15).

Pri merjenju zeta potenciala izkoriščamo pojav elektroforeze. Nabiti delci v disperziji, izpostavljeni električnemu polju, zaradi svojega električnega potenciala potujejo k elektrodi z nasprotnim nabojem. Temu gibanju delcev nasprotujejo viskozne sile. Ko je doseženo ravnotežje med tema nasprotujočima si silama, delci potujejo s konstantno hitrostjo. Ta je odvisna od jakosti električnega polja, dielektrične konstante in viskoznosti medija ter od zeta potenciala (Henryjeva enačba). Zetasizer Nano, s tehniko imenovano laserska Dopplerjeva elektroforeza, meri hitrost gibanja delcev v električnem polju (njihovo elektroforezno mobilnost) in na podlagi teh meritev izračuna zeta potencial (14,15).

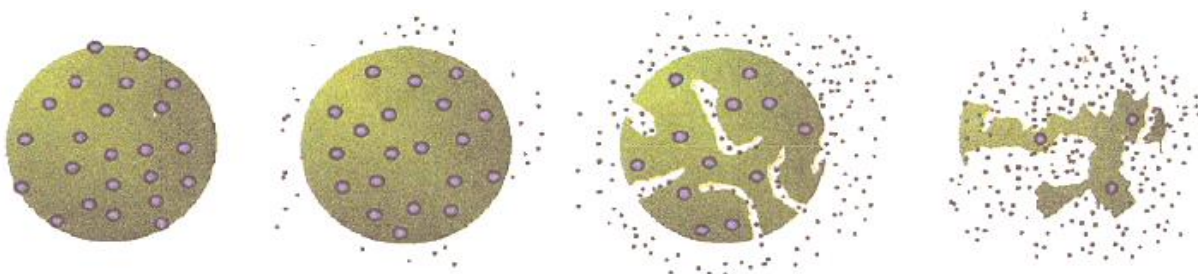
Vrednost zeta potenciala je dober pokazatelj fizikalne stabilnosti koloidnih disperzij. Če je ta vrednost večja od +30 mV ali manjša od -30 mV velja, da je disperzija fizikalno stabilna, saj se delci z močnim istovetnim nabojem med seboj odbijajo in ne težijo k flokulaciji. V primeru, da imajo delci v disperziji nizko absolutno vrednost zeta potenciala, pa ni prisotnih sil, ki bi preprečevale združevanje delcev. Ko se zeta potencial približuje vrednosti 0 mV, nagnjenost delcev k agregaciji vse bolj narašča. Pomemben dejavnik, ki vpliva na zeta potencial, je pH. Delci so v kislem pozitivno nabiti, v bazičnem pa negativno. Najmanj stabilen je sistem pri tisti vrednosti pH, kjer je zeta potencial enak 0 (14,15). Na stabilnost koloidnih disperzij vpliva tudi koncentracija in tip ionov v disperziji ter dodatek različnih stabilizatorjev (13).

1.3 Polimeri za izdelavo nanodelcev

Za izdelavo nanodelcev so na voljo številni sintezni in naravni polimeri. Izmed slednjih se uporabljajo naravne makromolekule – proteini (npr. kolagen, albumin, želatina) in polisaharidi (hitosan, škrob, alginat, hialuronska kislina, celuloza, dekstran idr.). Zaradi prednosti, kot sta večja čistota in znana sestava, pa se vse bolj uporabljajo sintezni polimeri. Spreminjamo lahko njihovo molekulsko maso, stereokemijo monomerov, razmerje monomerov in obliko polimernih verig ter tako dobimo širok spekter polimerov z različnimi tehnološkimi lastnostmi in obnašanjem (9,10).

Pri uporabi polimerov v dostavnih sistemih je potrebno opredeliti njihovo primernost z vidika toksičnosti in razgradnje (biokompatibilnosti in biorazgradljivosti), zmožnosti oblikovanja v ustrezni nosilni sistem, mehanizma sproščanja učinkovine in načina vnosa v telo ter sprejemljivosti s strani bolnika. Nerazgradljivi polimeri se v telesu nalagajo, zato imajo lahko tudi toksične učinke. Učinkovina se iz njih sprošča z difuzijo, ki je odvisna od

prepustnosti polimernega ogrodja in lastnosti učinkovine. Taki nebiorazgradljivi polimeri so npr. celulozni derivati, silikoni in akrilatni polimeri. Zaradi njihovih pomanjkljivosti je razvoj vedno bolj usmerjen v uporabo biorazgradljivih polimerov, ki se v organizmu razgradijo na biokompatibilne oz. netoksične metabolite, ti pa se po naravni poti izločijo iz telesa. Učinkovina se iz takih materialov poleg z difuzijo sprošča tudi zaradi njihove kemijske razgradnje (hidrolize, encimolize) (slika 5) in/ali predhodne aktivacije polimernega ogrodja s topilom, ki vstopa v sistem (nabrekanja, osmoznega učinka) (4). Od sinteznih biorazgradljivih polimerov se najpogosteje uporabljajo poliestri (polilaktidi (PLA), poliglikolidi (PGA), polikaprolaktini) ter polianhidridi, poliortoestri, polifosfazeni in poliaminokislina (10).



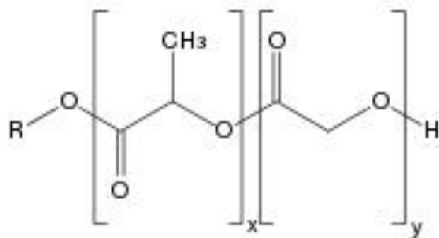
Slika 5: Postopna razgradnja polimernega ogrodja nanodelcev PLGA in sproščanje učinkovine (5).

1.3.1 PLGA – poli(mlečna glikolna) kislina

PLGA (angl. poly lactic-co-glycolic acid) je zadnji dve desetletji med najbolj privlačnimi polimeri pri razvoju in izdelavi dostavnih sistemov za učinkovine. Gre za družino biorazgradljivih in biokompatibilnih polimerov, ki je odobrena tudi s strani FDA. Številne raziskave proučujejo uporabo PLGA kot vehikel za nadzorovano dostavo različnih učinkovin, proteinov in drugih makromolekul. Pred ostalimi biorazgradljivimi polimeri ima prednost zaradi dobre raziskanosti in ugodnih fizikalno-kemijskih lastnosti, katere lahko glede na potrebe prilagodimo posameznemu sistemu. Ima velik potencial kot nosilec pri dostavi učinkovin in tudi za uporabo v tkivnem inženirstvu (16).

Kemijsko je PLGA kopolimer polimlečne (PLA) in poliglikolne kisline (PGA) ter spada med poliestre (slika 6). Polimer PLA ima dve enantiomerni obliki: poli-D-mlečno kislino

(PDLA) in poli-L-mlečno kislino (PLLA). Ponavadi PLGA predstavlja poli(D,L-laktid-ko-glikolid) z enakim deležem D- in L- oblike mlečne kisline.

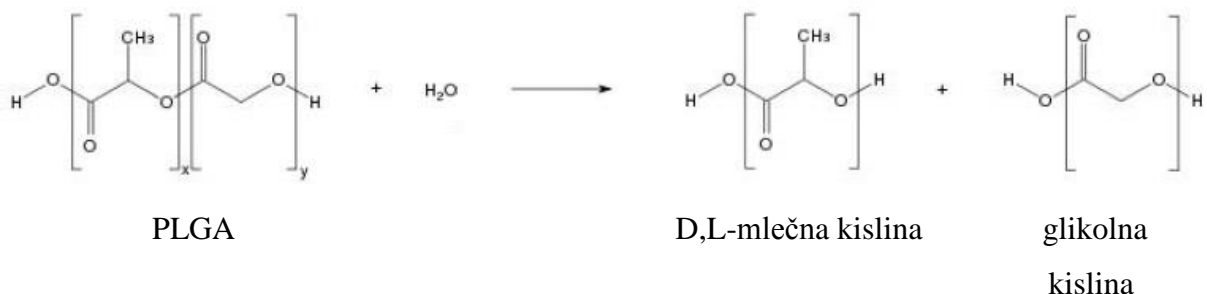


Slika 6: Zgradba PLGA (16).

(x = število enot mlečne kisline, y = število enot glikolne kisline)

Fizikalno-kemijske lastnosti optično aktivnih PDLA in PLLA so zelo podobne, s tem da ima PLLA kristalinično strukturo, PDLA pa je zaradi razvejane polimerne verige povsem amorfna. PGA nima stranske metilne skupine in v nasprotju s PLA izkazuje visoko stopnjo kristaliničnosti.

Iz PLGA lahko naredimo delce poljubnih oblik in velikosti ter v njih vgradimo različno velike molekule. Topna je v številnih topilih, kot so npr. diklorometan, metilen klorid, tetrahidrofuran, aceton in etilacetat. V vodi se PLGA razgrajuje, saj poteka hidroliza estrskih vezi (slika 7). Kopolimeri PLGA, ki vsebujejo veliko mlečne kisline, so manj hidrofilni, absorbirajo manj vode in se posledično tudi razgrajujejo bolj počasi, saj je PLA zaradi prisotnosti stranskih metilnih skupin v njeni strukturi bolj hidrofobna od PGA.



Slika 7: Hidroliza PLGA (16).

Sestava oz. molarno razmerje posameznih monomernih komponent v verigi PLGA pomembno vpliva na lastnosti, stopnjo kristaliničnosti in razgradnjo polimera. Večja vsebnost kristalinične PGA poveča stopnjo hidratacije in hidrolize kopolimera, kar vodi do hitrejših razgradnje PLGA. Tako se PLGA z razmerjem PLA/PGA 50:50 razgrajuje najhitreje, tista s 65:35 se razgrajuje hitreje od PLGA z razmerjem 75:25 in ta hitreje od 85:15 PLGA zaradi večjega deleža glikolne kisline ter posledično večje hidrofilnosti. Na hitrost razgradnje vpliva tudi molekulska masa polimera. Polimeri z večjo molekulsko maso imajo daljšo polimerno verigo, ki se razgrajuje dlje časa kot krajša veriga polimerov z nižjo molekulsko maso. Z molekulsko maso sta neposredno povezana tudi stopnja kristaliničnosti in tališče polimera. Temperature steklastega prehoda (T_g) kopolimerov PLGA so višje od fiziološke temperature 37 °C. T_g je nižja pri kopolimerih z manjšo vsebnostjo mlečne kisline v strukturi in pri tistih z manjšo molekulsko maso.

Poleg biokompatibilnosti, ustrezne kinetike biorazgradnje in mehanskih lastnosti, se PLGA tudi zlahka oblikuje v nosilne sisteme različnih oblik in velikosti. Za izdelavo PLGA dostavnih sistemov lahko uporabimo različne metode in z njimi vgradimo raznovrstne učinkovine, peptide ali proteine. Dostava s temi sistemi lahko poteka skozi različna časovna obdobja in preko različnih poti (16).

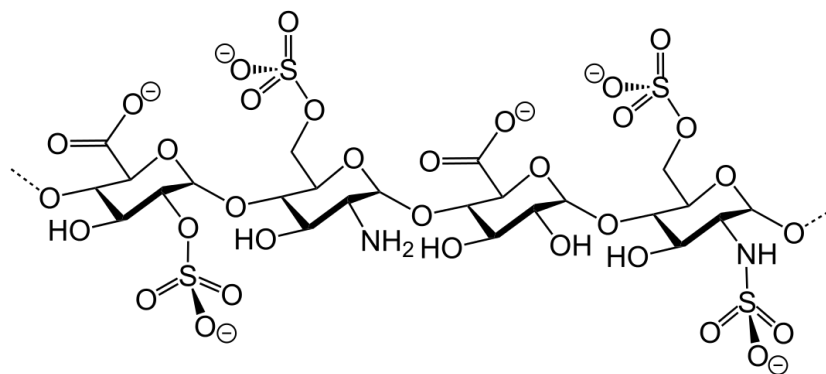
1.4 Antikoagulanti

Antikoagulanti spadajo med antitrombotične učinkovine, ki se uporabljajo za preprečevanje in zdravljenje tromboze ter tromboemboličnih zapletov kot so možganska kap, infarkt miokarda, globoka venska tromboza in pljučna embolija. Delujejo tako, da preprečijo pretvorbo topnega fibrinogena v netopni fibrin in s tem preprečujejo strjevanje krvi. Poznamo indirektne antikoagulate, ki zavirajo biosintezo koagulacijskih faktorjev (peroralni antikoagulanti – varfarin in ostali kumarini), in direktne antikoagulate, ki zavirajo encimsko delovanje koagulacijskih faktorjev (heparin in novejši inhibitorji trombina) (17,18).

1.4.1 Heparin

Heparin štejemo k telesu lastnim direktnim antikoagulantom, saj je skupaj s histaminom prisoten v granulah mastocitov. Pri nefrakcioniranem heparinu gre za skupino sulfatiranih glikozaminoglikanov (mukopolisaharidov) z molekulsko maso 6000–30000, ki zaradi

številnih sulfatnih in karboksilnih skupin v molekuli predstavlja eno najmočnejših kislin v človeškem organizmu (slika 8). Za farmacevtsko industrijo ga pridobivajo z ekstrakcijo iz govejih pljuč ali sluznice svinjskega črevesa. Namesto naravnega heparina se zmeraj bolj uporabljajo t.i. nizkomolekularni heparini, ki jih dobijo s hidrolizo nefrakcioniranega heparina in imajo molekulsko maso 4000–6000 (17,18).



Slika 8: Strukturna formula heparina (19).

Heparin preprečuje koagulacijo krvi *in vivo* ter *in vitro*, tako da aktivira antitrombin III (AT III), ki je inhibitor faktorjev strjevanja krvi. AT III se potem veže v aktivno mesto trombina in drugih serinskih proteinaz ter inhibira njihovo encimsko aktivnost. Da pride do inhibicije trombina, mora heparin tvoriti kompleks z encimom in AT III, za inhibicijo faktorja Xa pa zadostuje sama vezava heparina z AT III. Molekule nizkomolekularnih heparinov so premajhne, da bi se lahko hkrati vezale z encimom in inhibitorjem, zato ti heparini povečajo inhibično delovanje AT III samo na faktor Xa, ne pa tudi na trombin. Zaradi svoje velikosti in negativnega naboja se heparin ne absorbira iz prebavnega trakta in ga je potrebno aplicirati intravensko ali subkutano. V primeru intravenske aplikacije njegov učinek nastopi takoj, po podkožni aplikaciji pa v roku ene ure. Razpolovni čas heparina je 40–90 min (17,18).

Kot antikoagulant se heparin uporablja za profilakso tromboembolije, pri zdravljenju akutne venske in arterijske tromboembolije (tudi pri zgodnjem zdravljenju miokardnega infarkta in nestabilne angine pectoris) ter za preprečevanje nastajanja strdkov med zdravljenjem ali kirurškimi posegi, pri katerih se uporablja zunajtelesni obtok (hemodializa, aparat srce-pljuča) (20).

Zaradi tveganja za povzročanje krvavitve je potrebno zdravljenje s heparinom spremljati s koagulacijskimi testi, kot je npr. merjenje aktiviranega parcialnega tromboplastinskega

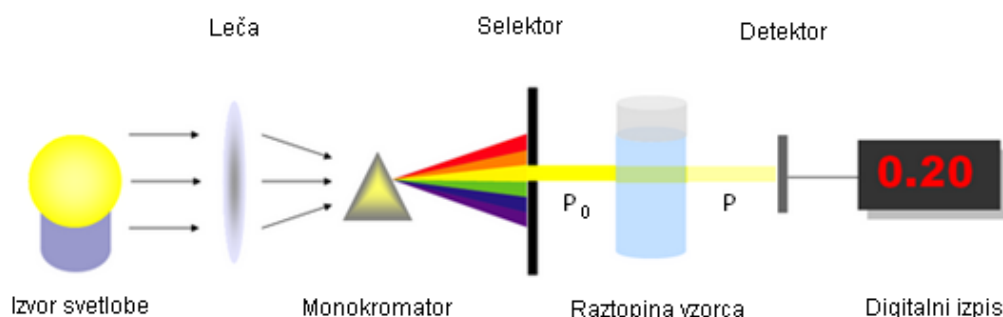
časa. Blago krvavitev lahko ustavimo z zmanjšanjem odmerka, pri večjih krvavitvah pa se prekine zdravljenje in bolniku po potrebi aplicira protaminijev sulfat, ki izniči učinek heparina. Drugi resni neželeni učinek heparinov je trombocitopenija, ki lahko preko tvorbe protiteles in poškodbe žilne stene vodi do tromboze (17,18,20). Med zdravljenjem lahko pride tudi do prehodnega zvišanja serumskih koncentracij določenih jetrnih encimov. Pri dolgotrajni uporabi visokih odmerkov heparina se lahko pri dovezetnih bolnikih razvije osteoporoza (20).

1.5 UV-VIS spektrofotometrija in določanje heparina

Molekulska absorpcijska spektrometrija v ultravijoličnem in vidnem spektralnem območju je instrumentalna metoda, ki se zelo pogosto uporablja za kvantitativno analizo različnih vzorcev. Temelji na merjenju absorpcije oz. zmanjšanja intenzitete svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. Številne organske in anorganske komponente absorbirajo UV ali vidno svetlobo in so tako primerne za spektrofotometrično analizo. Tudi molekule, ki ne absorbirajo, lahko z dodatkom različnih reagentov pretvorimo v absorbirajoče (obarvane) produkte in jih na ta način kvantitativno določimo (21,22).

Do absorpcije svetlobe v UV-VIS območju (valovne dolžine 190–800 nm) pride zaradi vzbujanja elektronov v molekulah. Gre za prehode neveznih elektronov (n) in elektronov v nenasičenih vezeh (π), zato molekule z dvojnimi vezmi ter še posebej aromatske molekule s konjugiranimi dvojnimi vezmi močno absorbirajo (22,23). Valovna dolžina, pri kateri organska molekula absorbira, je odvisna od tega, kako močno ima vezane elektrone (22).

Naprava, ki se uporablja za spektrofotometrično analizo, se imenuje spektrofotometer (slika 9).



Slika 9: Sestava spektrofotometra (24).

Spektrofotometer meri intenziteto oz. moč svetlobe ob prehodu skozi vzorec, kar lahko zapišemo kot transmitanco (T):

$$T = P / P_0$$

kjer P_0 predstavlja moč izvorne svetlobe, P pa moč svetlobe, ki je prešla skozi vzorec.

Iz tega lahko potem izračunamo absorbanco (A):

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

Med absorbanco in koncentracijo absorbirajočega analita v vzorčni raztopini obstaja linearna povezava. Definira jo Beer-Lambertov zakon, ki velja pri nizkih koncentracijah analita:

$$A = \epsilon lc$$

V tem izrazu ϵ predstavlja molarno absorptivnost, l je dolžina poti žarka skozi vzorec in c koncentracija preiskovanega analita. Absorptivnost oz. molarni ekstinkcijski koeficient je karakteristika posamezne snovi in je, tako kot absorbanca, odvisna od izbrane valovne dolžine (21,23,25).

Merjenje absorbance običajno poteka pri valovni dolžini, ki ustreza absorpcijskemu maksimumu molekule, saj sta občutljivost in natančnost metode tukaj največji (21,22,25). Meje detekcije so pri absorpcijski spektrofotometriji v območju med 10^{-4} in 10^{-5} M, relativna napaka določanja koncentracije pa je od 1 % do 5 % (22).

1.5.1 Azur A kolorimetrična metoda

Spektrofotometrično določanje heparina temelji na spremembi barve raztopine ob interakcijah heparina z barvilom. Barvilo Azur A se s pozitivnim nabojem veže na površino negativno nabite molekule heparina, kjer agregira (26,27). To povzroči metakromatski premik absorpcijskega maksimuma barvila iz 620 nm k nižjim valovnim dolžinam in spremembo barve iz modre v vijolično (28). Kompleksu heparin-Azur A izmerimo absorbanco pri 512 nm (26).

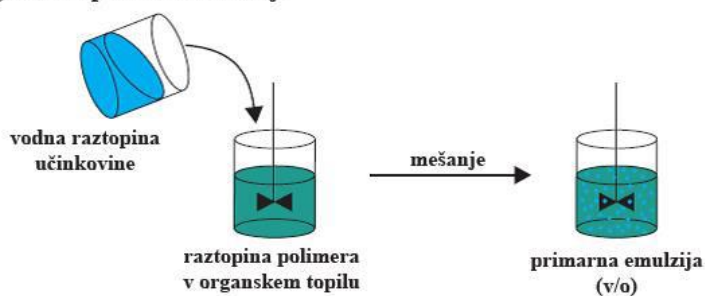
1.6 Izdelava nanodelcev z dvojno emulzijsko metodo

Izdelava nosilnih sistemov iz sinteznih polimerov poteka največkrat z emulzijskimi metodami. Za vgrajevanje hidrofilnih učinkovin v nanodelce se pogosto uporablja dvojna emulzijska metoda (slika 10). Pri tej metodi najprej hidrofilno učinkovino raztopimo v vodni fazi in jo emulgiramo v organsko fazo s polimerom, da nastane primarna emulzija

(V/O). V naslednji stopnji dodamo zunanjo vodno fazo s stabilizatorjem in emulgiramo do nastanka dvojne emulzije (V/O/V). Z velikostjo vnosa fizikalnih obremenitev med emulgiranjem definiramo sistem, bodisi mikrosfere ali nanodelce. V končni stopnji se odstrani organsko topilo, in sicer z odparevanjem pod znižanim tlakom ali z dodatkom zunanje vodne faze, ki povzroči difuzijo organskega topila iz nastalih delcev. Tako dobimo disperzijo polimernih (nano)delcev z vgrajeno učinkovino (10).

Izdelava nanodelcev z dvojno emulzijsko metodo

a) tvorba primarne emulzije



b) tvorba dvojne emulzije



Slika 10: Izdelava nanodelcev z dvojno emulzijsko metodo (10). V – vodna faza, O – organska faza

Glavni omejitvi dvojne emulzijske metode sta velikost izdelanih nanodelcev in uhajanje hidrofilne učinkovine iz notranje v zunanjo vodno fazo, ki je tudi glavni razlog za majhno učinkovitost vgrajevanja učinkovine. Pomembna mehanizma, ki destabilizirata kapljice dvojne emulzije, sta koalescenca in Ostwaldova rast. Raziskovalci in avtorji so se teh težav lotili na različne načine. Ključni parametri, ki vplivajo na lastnosti nanodelcev in jih je potrebno upoštevati pri njihovi izdelavi, so: vrsta in koncentracija polimera, izbira topila, izbira stabilizatorja in njegove koncentracije, način in pogoji emulgiranja, način odstranjevanja organskega topila ter razmerje med vodno in organsko fazo (9).

Pri dvojni emulzijski metodi se kot organsko topilo najpogosteje uporabljata metilen klorid in etilacetat. Slednji v primerjavi z bolj hidrofobnim metilen kloridom ponavadi manj vpliva na bioaktivnost vgrajevane učinkovine. Kljub temu veliko raziskovalcev na tem področju še vedno izbere metilen klorid, saj ima ugodne fizikalne lastnosti, kot so sposobnost raztapljanja velike količine biorazgradljivih polimerov, majhna topnost v vodi (2,0 %, m/V) in nizko vrelišče (39,8 °C), ki je ugodno za odstranjevanje topila z odparevanjem. Etilacetat pa ima relativno veliko topnost v vodi (8,7 %, m/V) in visoko vrelišče (76,7 °C), kar nekoliko omejuje njegovo uporabo pri dvojni emulzijski metodi. Zaradi hitre difuzije etilacetata iz organske v zunanjo vodno fazo lahko pride do obarjanja polimera namesto do tvorbe nanodelcev. Po drugi strani pa hitra difuzija topila povzroči hitrejši nastanek trdnih delcev, kar izboljša učinkovitost vgradnje učinkovine in koristi njeni stabilnosti, zmanjša pa se tudi koalescenca kapljic emulzije (29).

Odstranjevanje organskega topila z dodatkom zunanje vodne faze, ki povzroči difuzijo topila iz emulzijskih kapljic, je možno le v primeru, ko je organsko topilo delno topno v vodi in njegova topnost hitro narašča z večanjem deleža vodne faze (10). Cegnar in sodelavci so pri izdelavi nanodelcev z dvojno emulzijsko metodo uporabili etilacetat ter zmes diklorometana in acetona (1:1). 1 ml topila so iz dvojne emulzije (V/O/V) odstranili z dodatkom večje količine vodne faze (100 ml 0,1 % (m/V) vodne raztopine stabilizatorja PVA) in 5 min mešanjem s homogenizatorjem pri 5000 obr/min. Nanodelci, izdelani z etilacetatom, so bili v povprečju nekoliko večji od tistih, izdelanih s topilom diklorometan/acetona (pri emulgiranju z uporabo homogenizatorja (5000 obr/min) v kombinaciji z ultrazvočno kadičko za tvorbo dvojne emulzije je bila njihova velikost 331 ± 25 nm z etilacetatom in 314 ± 28 nm s topilom diklorometan/acetona) (30). Blanco in Alonso sta za odstranitev 1 ml etilacetata dvojni emulziji najprej dodala 100 ml 0,3 % (m/V) vodne raztopine PVA, nato pa topilo odparevala pod znižanim tlakom ali ga ekstrahirala s 100 ml vodne raztopine izopropanola (2 % V/V). Pri obeh načinih odstranjevanja sta dobila nanodelce podobnih velikosti (ND iz Resomera RG 502 so bili v povprečju veliki 335 nm, ND iz Resomera RG 503 pa 510 nm) (31). Bilati in sodelavci so kot organsko topilo uporabili etilacetat in metilen klorid. Dvojno emulzijo so dali na magnetno mešalo in jo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi, da je topilo popolnoma izhlapelo. Z etilacetatom so dobili manjše nanodelce (288 ± 10 nm) kot z metilen kloridom (824 ± 33 nm) in nekoliko manjšo učinkovitost vgradnje proteina (etilacetat: 68 ± 7 %, metilen klorid: 87 ± 4 %) (32).

1.7 Polimerni nanodelci s heparinom

Heparin je v vodi topna makromolekularna učinkovina, ki zaradi slabe absorpcije po peroralni poti ni učinkovita, zato se aplicira intravensko ali subkutano. Ker ima kratek razpolovni čas, je potrebna pogosta aplikacija, kar pa ni ugodno za pacienta.

Raziskave so usmerjene v razvoj novih dostavnih sistemov, ki bi izboljšali terapijo s heparinom. Za dostavo heparina preko različnih poti se raziskujejo tudi polimerni nanodelci.

Jogala in sodelavci so nizkomolekularni heparin (enoksaparin) vgrajevali v polimerne nanodelce, da bi podaljšali njegovo sproščanje pri subkutani aplikaciji. Nanodelce so pripravili z dvojno emulzijsko metodo, pri kateri so organsko topilo odstranili z odparevanjem. Za njihovo izdelavo so uporabili polimer PLGA z razmerjem PLA/PGA 50:50 oz. 85:15, kot stabilizator pa vodno raztopino PVA s koncentracijo 0,1 %, 0,5 % ali 1 %. 2 ml vodne raztopine enoksaparina so dodali 10 ml raztopine PLGA v metilen kloridu in emulgirali s sonikatorjem 30 s pri 60 W. Nastalo emulzijo V/O so zlili v 40 ml vodne raztopine PVA in sonicirali 60 s pri 60 W do nastanka dvojne emulzije V/O/V. To emulzijo so potem 10 min mešali na magnetnem mešalu pri 15 obr/min, da je metilen klorid izhlapel. Nastale nanodelce so izolirali s centrifugiranjem disperzije pri 18000 obr/min, 15 min. S spektrofotometrično analizo supernatanta so določili količino nevgrajene učinkovine in izračunali učinkovitost vgradnje enoksaparina v nanodelce. Z napravo Zetasizer Nano ZS so nanodelcem izmerili povprečni premer in zeta potencial.

Velikost pripravljenih nanodelcev je bila med 195 nm in 251 nm. Pri zvišanju koncentracije stabilizatorja se je njihova velikost zmanjšala, pri zvišanju koncentracije polimera pa povečala. Vrednosti zeta potenciala PLGA nanodelcev so se gibale med -22,1 mV in -35,2 mV, učinkovitost vgradnje enoksaparina v nanodelce pa je bila med 46 % in 70 %. Pri višji koncentraciji polimera je bila učinkovitost vgradnje večja (33).

Jiao je s sodelavci raziskoval polimerne nanodelce kot nov dostavni sistem za peroralni vnos heparina. Zaradi visoke hidrofilitnosti heparina so tudi oni izbrali dvojno emulzijsko metodo kot najprimernejšo tehniko za pripravo nanodelcev. Izdelali so jih z uporabo dveh biorazgradljivih polimerov, polikaprolaktona (PCL) in PLGA (50/50), ter dveh pozitivno nabitih polimetakrilatnih polimerov (Eudragit RS in RL), ki nista biorazgradljiva. 1 ml vodne raztopine heparina (5000 i.e.) so najprej emulgirali v 10 ml raztopine polimera (0,25

g) v metilen kloridu s sonikacijo pri 60 W, 1 min. Nastalo emulzijo V/O so nato zlili v 200 ml vodne raztopine PVA (0,1 %) in 3 min emulgirali s homogenizatorjem do nastanka dvojne emulzije V/O/V. Z odparevanjem pod znižanim tlakom so odstranili metilen klorid in nastale nanodelce izolirali s centrifugiranjem. Pri njihovi izdelavi so spreminjali koncentracijo heparina (2500, 3500, 5000 in 7500 i.e./ml) v notranji vodni fazi in vrsto polimera, ki so ga uporabili samostojno ali v kombinaciji (v razmerju 1:1). Nato so ovrednotili vpliv teh parametrov na lastnosti nanodelcev in na učinkovitost vgradnje heparina.

Nanodelci s heparinom, pripravljene iz posameznega polimera ali iz kombinacije polimerov, so imeli povprečni premer od 260 do 300 nm in med njimi ni bilo pomembnih razlik v velikosti. Z višanjem koncentracije heparina v notranji vodni fazi se je velikost ND iz Eudragita povečala, zeta potencial pa znižal, velikost in zeta potencial ND iz PLGA pa sta ostala enaka. Ti rezultati so pokazali, da je pri ND iz PLGA šlo predvsem za vgradnjo heparina, pri ND iz Eudragita pa se je heparin zaradi elektrostatskih interakcij s polimerom verjetno tudi adsorbiral na ogrodje nanodelcev.

Učinkovitost vgradnje je bila optimalna, ko so vgrajevali 5000 i.e./ml heparina in se je s povečanjem vgrajevane koncentracije zmanjšala. Pri nanodelcih iz Eudragita RS in RL je bila učinkovitost vgradnje heparina veliko večja (60 % oz. 98 %) kot pri nanodelcih iz biorazgradljivih polimerov PLGA in PCL (<14 %). Ko so slednjima dodali enega od Eudragitov, se je učinkovitost vgradnje povečala (34).

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge bo izdelati polimerne nanodelce s heparinom z dvojno emulzijsko metodo ter jih fizikalno-kemijsko ovrednotiti.

V prvem delu diplomske naloge bomo z dvojno emulzijsko metodo izdelali polimerne nanodelce brez učinkovine – prazne nanodelce. Uporabili bomo dva različna stabilizatorja, polivinil alkohol (PVA) in poloksamer 188. Organsko topilo za polimer bo predstavljal etilacetat, ki ga bomo iz dvojne emulzije odstranili z dodatkom večje količine vodne faze in mešanjem na magnetnem mešalu čez noč, da poteče difuzija in da topilo izhlapi iz disperzije. Spreminjali bomo pogoje izdelave, kot so koncentracija stabilizatorja, čas emulgiranja, koncentracija in vrsta polimera, ter opazovali njihov vpliv na fizikalne lastnosti nanodelcev. S pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS bomo nanodelcem v disperzijah izmerili povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial. Preverili bomo tudi ponovljivost postopka izdelave in spremljali fizikalno stabilnost disperzij. Na podlagi rezultatov bomo izbrali optimalne pogoje za izdelavo nanodelcev.

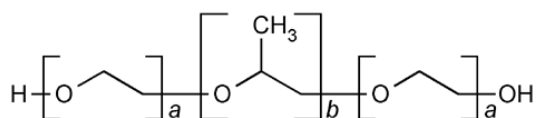
V drugem delu bomo z dvojno emulzijsko metodo pri izbranih pogojih izdelali polimerne nanodelce s heparinom in jih fizikalno-kemijsko ovrednotili. Njihove fizikalne lastnosti bomo primerjali z lastnostmi praznih nanodelcev. S pomočjo spektrofotometra bomo določili, koliko heparina se je vgradilo v različne nanodelce. Spreminjali bomo določene parametre pri izdelavi (vrsto in koncentracijo polimera, koncentracijo heparina) in poskušali doseči čim večjo učinkovitost vgradnje heparina.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Materiali

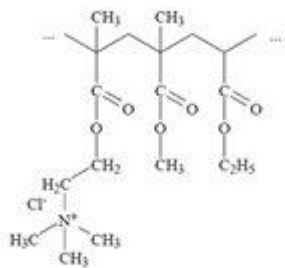
Materiali za pripravo nanodelcev

- prečiščena voda
- heparin, 5000 i.e./ml raztopina za injiciranje, Krka, Novo mesto, Slovenija
- etilacetat
- polivinil alkohol (PVA): Mowiol® 4-98 (Sigma-Aldrich, USA), MM 27 000 g/mol, stopnja hidrolize 98 %, stopnja polimerizacije 600
- poloksamer 188: Lutrol® F68 (BASF, Nemčija), kopolimer etilenoksida in propilenoksida, a = 80 (etilenoksid), b = 27 (propilenoksid)



Slika 11: Strukturna formula poloksamerov (35).

- poli(mlečna glikolna) kislina (PLGA):
 - **Resomer® RG 502H** (Boehringer Ingelheim, Nemčija), razmerje PLA/PGA = 50/50, MM 7000–17000 g/mol, prosta karboksilna skupina
 - **Resomer® RG 502** (Boehringer Ingelheim, Nemčija), razmerje PLA/PGA = 50/50, MM 7000–17000 g/mol, zaestrena terminalna skupina
 - **Resomer® RG 503** (Boehringer Ingelheim, Nemčija), razmerje PLA/PGA = 50/50, MM 24000–38000, zaestrena terminalna skupina
- akrilatni polimer **Eudragit® RS PO** (Degussa, Evonik Industries, Nemčija), kopolimer etil akrilata, metil metakrilata in nizke vsebnosti estra metakrilne kisline s kvarternimi amonijevimi skupinami, povprečna MM ~32000 g/mol, alkalno število 15,2 mg KOH/g polimera, temperatura steklastega prehoda (T_g) ~65 °C



Slika 12: Kemijska struktura Eudragita RS PO (36).

- hitosanijev klorid, Kraeber & Co GmbH, Nemčija, MM 30–400 kDa, stopnja deacetilacije 87,2 %

Reagenti za kvantitativno določanje heparina

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

3.2 Naprave

- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- avtomatska pipeta, 20–200 μ l, Biohit, Finska
- avtomatska pipeta, 100–1000 μ l, Biohit, Finska
- avtomatska pipeta, 1000–5000 μ l, Biohit, Finska
- centrifuga, Eppendorf Centrifuge 5415 R, Hamburg, Nemčija
- plastične centrifugirke 1,5 ml, Sarstedt
- magnetno mešalo, IKA-WERKE Ro 15 power, Nemčija
- sonikator, CPX500 Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, USA
- spektrofotometer, Agilent 8453 UV-visible spectroscopy system, Hewlett-Packard, Waltbronn, Nemčija
- steklene centrifugirke (10 ml)
- Zetasizer Nano ZS, Malvern, Velika Britanija

3.3 Postopki in metode

3.3.1 Priprava raztopin

3.3.1.1 Priprava raztopine PVA

Za izdelavo praznih ND

Pripravili smo raztopino PVA v vodi z osnovno koncentracijo 10 % (m/V).

Točno zatehtano količino PVA (5 g) smo postopno, ob neprestanem mešanju z magnetnim mešalom, dodajali v na 90 °C segreto prečiščeno vodo. Ko se je PVA popolnoma raztopil, smo z mešanjem nadaljevali do ohladitve raztopine na sobno temperaturo. Raztopino smo nato kvantitativno prenesli v 50 ml bučko in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Shranili smo jo v hladilniku. Pred uporabo smo jo dali na sobno temperaturo in premešali na magnetnem mešalu.

Iz te osnovne raztopine smo (za vsak poskus sproti) z redčenjem pripravljali raztopine PVA z nižjo koncentracijo.

Za izdelavo ND s heparinom

Pripravili smo 5 % (m/V) raztopino PVA v vodi, in sicer po enakem postopku kot 10 % raztopino PVA, s tem da smo za pripravo 50 ml raztopine uporabili 2,5 g PVA. Shranjevali smo jo v hladilniku.

3.3.1.2 Priprava raztopine poloksamera

Pripravili smo raztopino poloksamera 188 v vodi z osnovno koncentracijo 5 % (m/V).

Točno zatehtano količino poloksamera (2,5 g) smo kvantitativno prenesli v 50 ml bučko in dodali prečiščeno vodo. Z rahlim stresanjem smo poskušali raztopiti čim več poloksamera, nato pa smo bučko dali na hladno in počakali, da se je poloksamer popolnoma raztopil. Raztopini smo dodali prečiščeno vodo do oznake, jo premešali in shranili v hladilniku. Pred uporabo smo jo dali na sobno temperaturo in premešali na magnetnem mešalu.

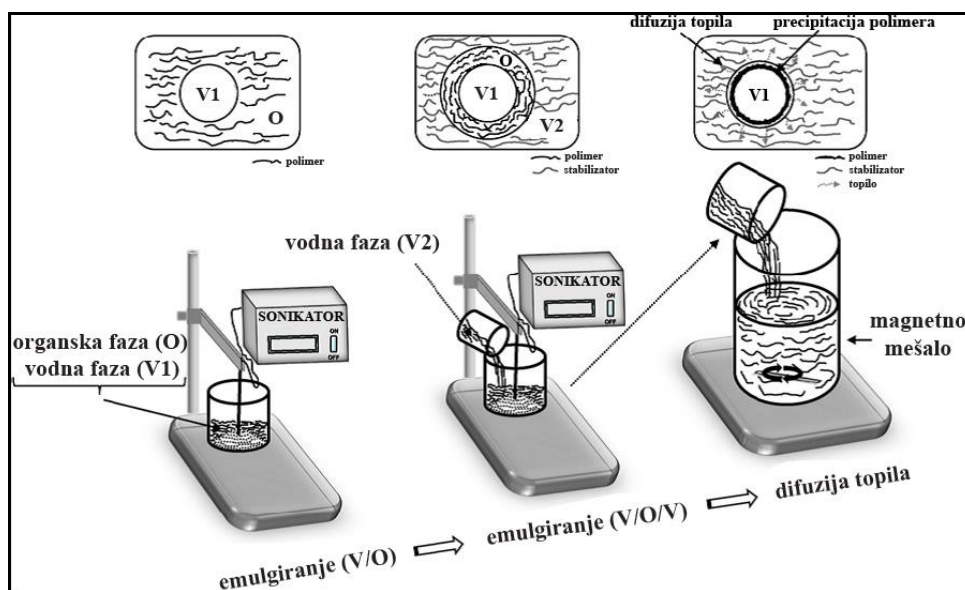
Iz te osnovne raztopine smo potem pripravljali tudi raztopine poloksamera z nižjo koncentracijo.

3.3.1.3 Priprava raztopin polimerov

Raztopine polimerov v etilacetatu smo pripravljali za vsak poskus sproti. Glede na koncentracijo raztopine (% m/V) smo preračunali in točno zatehtali količino polimera, ki smo ga nato kvantitativno prenesli v bučko, raztopili v etilacetatu in dopolnili do oznake.

3.3.2 Postopek izdelave praznih nanodelcev

V stekleno centrifugirko smo odpipetirali 1 ml raztopine polimera v etilacetatu in 100 μ l prečiščene vode ter zmes emulgirali s sonikatorjem pri amplitudi 30 %. Nastala je emulzija V/O, v katero smo nato dodali 2 ml vodne raztopine stabilizatorja (PVA oz. poloksamer 188) in ponovno sonicirali pri amplitudi 30 %. Nastalo dvojno emulzijo V/O/V smo nato počasi zlili v 100 ml vode oz. 0,1 % vodne raztopine stabilizatorja ob mešanju z magnetnim mešalom pri 350 obr/min in pustili mešati čez noč (na sobni temperaturi), da je etilacetat izhlapel. Tako smo dobili disperzijo polimernih nanodelcev v vodi.



Slika 13: Shema postopka in postavitve aparature za izdelavo nanodelcev z dvojno emulzijsko – difuzijsko metodo (37).

3.3.3 Izdelava praznih nanodelcev s stabilizatorjem PVA

Prazne nanodelce s stabilizatorjem PVA smo izdelovali po postopku, opisanem v točki 3.3.2. Notranjo vodno fazo (V1) dvojne emulzije je predstavljala prečiščena voda (100 μ l), organsko fazo (O) raztopina polimera PLGA (Resomer RG 502H) v etilacetatu (1 ml),

zunanjjo vodno fazo (V2) pa raztopina stabilizatorja PVA v vodi (2 ml). Kot dilucijsko fazo (D) smo uporabili 0,1 % vodno raztopino PVA oz. prečiščeno vodo (100 ml).

3.3.3.1 Vpliv koncentracije stabilizatorja PVA na fizikalne lastnosti nanodelcev

Pri poskusu smo za izdelavo nanodelcev uporabili 5 % raztopino PLGA v etilacetatu. Čas sonikacije za nastanek primarne emulzije je bil 15 s, za sekundarno emulzijo pa 30 s. Dilucijsko fazo je predstavljala 0,1 % vodna raztopina PVA.

Pri izdelavi vzorcev smo spreminjali koncentracijo stabilizatorja PVA v zunanji vodni fazi dvojne emulzije (uporabili smo 1 %, 2 %, 5 % in 10 % PVA) ter nastalim nanodelcem merili povprečni premer, PDI in zeta potencial.

3.3.3.2 Vpliv časa sonikacije na fizikalne lastnosti nanodelcev

Nanodelce smo poskusili izdelati pri različnih časih sonikacije primarne (1.) in sekundarne (2.) emulzije: 5 s + 10 s, 10 s + 15s, 15 s + 30 s ter 30 s + 60 s (čas (1.) + čas (2.)). Sonicirali smo pri amplitudi 30 %. Opazovali smo vpliv časa sonikacije na povprečni premer, PDI in zeta potencial nastalih nanodelcev. Za izdelavo dvojne emulzije smo uporabili 5 % raztopino PLGA v etilacetatu in 5 % vodno raztopino PVA, za dilucijo pa 0,1 % raztopino PVA v vodi.

3.3.3.3 Vpliv koncentracije polimera PLGA na fizikalne lastnosti nanodelcev

Za izdelavo nanodelcev smo uporabili različne koncentracije raztopin PLGA v etilacetatu (2,5 %, 5 %, 10 %) ter 5 % vodno raztopino PVA, čas sonikacije 15 in 30 sekund, kot dilucijsko fazo pa 0,1 % raztopino PVA v vodi. Vzorcem smo izmerili povprečni premer delcev, PDI in zeta potencial.

3.3.3.4 Ponovljivost postopka izdelave nanodelcev pri izbranih pogojih

Izdelali smo šest disperzij nanodelcev. Pri vseh smo uporabili 5 % raztopino PLGA v etilacetatu (O), 5 % vodno raztopino PVA (V2) ter čas sonikacije 15 in 30 sekund. Za prve tri vzorce smo kot dilucijsko fazo (D) uporabili 0,1 % raztopino PVA v vodi, za druge tri vzorce pa samo prečiščeno vodo. Vsem vzorcem smo izmerili povprečni premer delcev, PDI in zeta potencial.

3.3.3.5 Spremljanje fizikalne stabilnosti disperzij nanodelcev

Spremljali smo fizikalno stabilnost dveh disperzij, izdelanih (v prejšnjem poskusu) z uporabo 5 % raztopine PLGA v etilacetatu (O), 5 % vodne raztopine PVA (V2) ter časa sonikacije 15 in 30 sekund. Pri prvi je bila kot dilucijska faza (D) za izdelavo uporabljena 0,1 % vodna raztopina PVA, pri drugi pa samo prečiščena voda. Vzorcema smo izmerili velikost delcev, PDI in zeta potencial prvi dan, ko smo ju izdelali, nato pa še 4. in 8. dan po izdelavi. Shranjevali smo ju v hladilniku in pred meritvami premešali na magnetnem mešalu.

3.3.4 Izdelava praznih nanodelcev s stabilizatorjem poloksamer 188

Prazne nanodelce s stabilizatorjem poloksamer 188 smo izdelovali po postopku, opisanem v točki 3.3.2. Notranjo vodno fazo (V1) dvojne emulzije je predstavljala prečiščena voda (100 µl), organsko fazo (O) raztopina polimera PLGA (Resomer RG 502H) v etilacetatu (1 ml), zunanjo vodno fazo (V2) pa raztopina stabilizatorja poloksamer 188 v vodi (2 ml). Kot dilucijsko fazo (D) smo uporabili prečiščeno vodo oz. 0,1 % vodno raztopino poloksamera 188 (100 ml).

3.3.4.1 Vpliv časa sonikacije na fizikalne lastnosti nanodelcev

Nanodelce smo izdelali pri času sonikacije primarne emulzije 15 s in različnih časih sonikacije sekundarne emulzije (30 s, 40 s, 60 s) ter opazovali njihove fizikalne lastnosti. Za izdelavo smo uporabili 5 % raztopino PLGA v etilacetatu in 5 % vodno raztopino poloksamera, za dilucijo pa prečiščeno vodo.

3.3.4.2 Vpliv koncentracije poloksamera na fizikalne lastnosti nanodelcev

Pri izdelavi vzorcev smo spreminjali koncentracijo stabilizatorja poloksamer 188 v zunanji vodni fazi dvojne emulzije (od 1 %, 2,5 % do 5 %) ter nastalim nanodelcem merili velikost, PDI in zeta potencial. Organsko fazo je predstavljala 5 % raztopina PLGA v etilacetatu. Poskus smo izvedli pri času sonikacije 15 + 40 s in pri različnih pogojih dilucije:

1. dilucija z 0,1 % raztopino poloksamera
2. dilucija s prečiščeno vodo

3.3.4.3 Vpliv koncentracije polimera PLGA na fizikalne lastnosti nanodelcev

Za izdelavo nanodelcev smo uporabili različne koncentracije raztopin PLGA v etilacetatu (2,5 %, 5 %, 10 %) ter 5 % vodno raztopino poloksamera, čas sonikacije 15 in 40 sekund, kot dilucijsko fazo pa prečiščeno vodo. Vzorcem smo izmerili velikost delcev, PDI in zeta potencial.

3.3.5 Izdelava praznih nanodelcev iz različnih polimerov

Nanodelce smo izdelali po postopku, opisanem v točki 3.3.2, in sicer s stabilizatorjem PVA (5 % vodna raztopina PVA) pri času sonikacije 15 + 30 s ter s stabilizatorjem poloksamer 188 (5 % vodna raztopina poloksamera) pri času sonikacije 15 + 40 s. Za izdelavo smo uporabili tri različne polimere – Resomer RG 502, Resomer RG 503 in Eudragit RS PO (5 % raztopine polimera v etilacetatu). Dilucijsko fazo je pri vseh vzorcih predstavljala prečiščena voda. Nastalim nanodelcem smo izmerili velikost in zeta potencial.

3.3.6 Izdelava nanodelcev s heparinom

Nanodelce s heparinom smo izdelovali po postopku, opisanem spodaj. Notranjo fazo (V1) dvojne emulzije je predstavljala vodna raztopina heparina (100 µl), organsko fazo (O) raztopina ustreznega polimera v etilacetatu (1 ml), zunanjo fazo (V2) pa raztopina stabilizatorja (PVA oz. poloksamer 188) v vodi (2 ml). Kot dilucijsko fazo (D) smo uporabili prečiščeno vodo (100 ml). Primarno emulzijo smo sonicirali 15 s, sekundarno pa 30 s pri nanodelcih s PVA in 40 s pri ND s poloksamerom.

Postopek izdelave nanodelcev s heparinom

V stekleno centrifugirko smo odpipetirali 1 ml raztopine polimera v etilacetatu in 100 µl vodne raztopine heparina ter zmes emulgirali s sonikatorjem 15 s pri amplitudi 30 %. Nastala je emulzija V/O, v katero smo nato dodali 2 ml vodne raztopine stabilizatorja (PVA oz. poloksamer 188) in ponovno sonicirali pri amplitudi 30 % (30 s ali 40 s, odvisno od uporabljenega stabilizatorja). Nastalo dvojno emulzijo V/O/V smo nato počasi zilili v 100 ml vode ob mešanju z magnetnim mešalom pri 350 obr/min in pustili mešati čez noč (na sobni temperaturi), da je etilacetat izhlapel. Tako smo dobili polimerne nanodelce s heparinom, dispergirane v vodi.

3.3.6.1 Nanodelci s heparinom iz različnih polimerov

Nanodelce smo izdelali iz štirih različnih polimerov: Resomer RG 502H, Resomer RG 502, Resomer RG 503 in Eudragit RS PO (5 % raztopine polimera v etilacetatu). Kot stabilizator smo uporabili 5 % raztopino PVA oz. poloksamera. Vgrajevali smo raztopino heparina s koncentracijo 50 mg/ml. Nanodelcem smo izmerili velikost in zeta potencial ter določili učinkovitost vgradnje heparina.

3.3.6.2 Vpliv koncentracije polimera na učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce

Pri poskusu smo izdelali nanodelce iz treh različnih polimerov: Resomer RG 502H, Resomer RG 502 in Eudragit RS PO. Za izdelavo vzorcev smo uporabili raztopine posameznih polimerov v etilacetatu s koncentracijo 5 %, 7,5 % in 10 %, kot stabilizator pa 5 % raztopino PVA oz. poloksamera. Koncentracija raztopine heparina, ki smo ga vgrajevali, je bila 50 mg/ml. Vzorcem smo spektrofotometrično določili učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce.

3.3.6.3 Odvisnost učinkovitosti vgradnje heparina v nanodelce iz Eudragita od koncentracije heparina v disperziji

Najprej smo po enakem postopku, kot smo izdelovali nanodelce s heparinom, izdelali prazne nanodelce brez vgrajene učinkovine. Uporabili smo 5 % raztopino Eudragita RS PO v etilacetatu in 5 % vodno raztopino stabilizatorja PVA oz. poloksamera 188. Potem smo od posamezne disperzije nanodelcev, izdelane s PVA ali s poloksamerom, odpipetirali tri vzorce po 20 ml. Tem vzorcem smo nato postopoma, med mešanjem na magnetnem mešalu, dodali različne količine heparina (kot je prikazano v tabeli I) in jih potem pustili še 30 min mešati na mešalu. Po centrifugiranju smo jih pripravili za določanje koncentracije heparina v supernatantu (enak postopek kot pri določanju učinkovitosti vgradnje heparina, opisan v poglavju 3.3.7.3). Na podlagi spektrofotometričnih meritev smo potem izračunali, kolikšen delež heparina se je adsorbiral na ogrodje ND iz Eudragita (enačba I).

Enačba I:

adsorpcija heparina (%) = masa adsorbiranega heparina / masa celotnega (v disperzijo dodanega) heparina x 100

Tabela I: Dodani volumen (V) raztopine heparina s koncentracijo 50 mg/ml in koncentracija heparina (c) v 20 ml disperzije po tem dodatku pri vzorcih praznih nanodelcev iz Eudragita, izdelanih s stabilizatorjem PVA oz. s poloksamerom.

<i>vzorec</i>	<i>V (μl)</i>	<i>c (mg/ml)</i>
1	5	0,0125
2	10	0,0250
3	20	0,0500

3.3.6.4 Vpliv koncentracije heparina na njegovo učinkovitost vgradnje v nanodelce

Za vgradnjo v nanodelce smo uporabili dve različni koncentraciji raztopin heparina kot notranjo vodno fazo: 50 mg/ml in 25 mg/ml. Nanodelce smo izdelali iz Resomera RG 502 oz. iz Resomera RG 503 v koncentraciji 5 % ter z uporabo 5 % raztopine stabilizatorja PVA ali poloksamera. Za vsak vzorec smo na podlagi spektrofotometričnih meritev izračunali delež v nanodelce vgrajenega heparina.

3.3.6.5 Vgradnja nanokompleksov heparina in hitosana v nanodelce

Pri tem poskusu smo namesto raztopine heparina kot notranjo vodno fazo uporabili 100 μ l disperzije nanokompleksov heparina in hitosana (koncentracija heparina v tej disperziji je bila 1,125 mg/ml). Nanodelce smo izdelali iz treh različnih Resomerov: RG 502H, RG 503H in RG 503. Uporabili smo 5 % raztopino posameznega polimera, kot stabilizator pa raztopino PVA ali poloksamera s koncentracijo 5 %. Vzorce smo fizikalno-kemijsko ovrednotili z določitvijo velikosti delcev, PDI, zeta potenciala ter učinkovitosti vgradnje heparina v nanodelce.

Priprava nanokompleksov

V čašo smo odpipetirali 6,667 ml raztopine hitosana s koncentracijo 1,8 mg/ml ter ji po kapljicah s pipeto dodali 4 ml raztopine heparina s koncentracijo 3 mg/ml (med mešanjem na magnetnem mešalu). Po dodatku heparina smo pustili disperzijo še eno uro mešati na magnetnem mešalu, da je kompleksiranje poteklo do konca. Koncentracija heparina v disperziji nanokompleksov heparina in hitosana je bila tako 1,125 mg/ml.

3.3.7 Fizikalno-kemijsko vrednotenje disperzij nanodelcev

Disperzije nanodelcev smo najprej ovrednotili z merjenjem povprečnega premera delcev, polidisperznega indeksa in zeta potenciala s pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS. Pri vzorcih s heparinom smo nato še spektrofotometrično določili učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce.

Pred meritvami smo vse vzorce vizualno pregledali, ali vsebujejo vidne delce oz. oborino. V primeru spremljanja fizikalne stabilnosti disperzij nanodelcev smo vzorce med posameznimi meritvami shranjevali v hladilniku.

3.3.7.1 Merjenje velikosti delcev in polidisperznega indeksa

Velikost delcev v disperziji smo določali z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (Zetasizer Nano ZS). Merilo za velikost nanodelcev je povprečni premer, polidisperzni indeks (PDI) pa je merilo za širino porazdelitve velikosti delcev. PDI lahko zavzame vrednosti od 0 do 1. Vrednost 0 pomeni, da gre za monodisperzni sistem (delci so enakih velikosti), vrednost 1 pa kaže na zelo nehomogeno porazdelitev velikosti delcev.

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

3.3.7.2 Merjenje zeta potenciala

Zeta potencial smo vzorcem določili z metodo laserske Dopplerjeve elektroforeze (Zetasizer Nano ZS). V primeru, da je bil vzorec moten, smo ga pred meritvijo redčili s prečiščeno vodo do transparentnosti.

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): $\epsilon = 78,5$
- model: Smoluchowski
- kapilarna celica: DTS1060C

3.3.7.3 Določanje učinkovitosti vgradnje heparina

Za ugotavljanje učinkovitosti vgradnje heparina v nanodelce smo uporabili UV-VIS spektrofotometrijo – Azur A kolorimetrično metodo.

Disperzije nanodelcev smo po izdelavi najprej dopolnili do skupnega volumna 100 ml s prečiščeno vodo. Nato smo vzorce disperzij centrifugirali in na ta način ločili delce od vodne faze (supernatanta). S pomočjo spektrofotometra smo določili koncentracijo heparina v supernatantu (nevgrajeni heparin) in izračunali, koliko heparina se je vgradilo v nanodelce.

Priprava vzorcev

Disperzije nanodelcev s heparinom smo centrifugirali 60 minut pri temperaturi 4 °C in centrifugalni sili 15000 g. Nato smo pripravili vzorce za spektrofotometrično določanje koncentracije heparina v tekoči fazi disperzije.

Od supernatanta smo v epruveto odpipetirali 1 ml vzorca (po potrebi smo ga predhodno redčili, da smo prišli v območje umeritvene krivulje) in mu dodali 1 ml vodne raztopine barvila Azur A s koncentracijo 0,02 mg/ml ter vsebino epruvete premešali. Tako pripravljenemu vzorcu smo nato izmerili absorbanco.

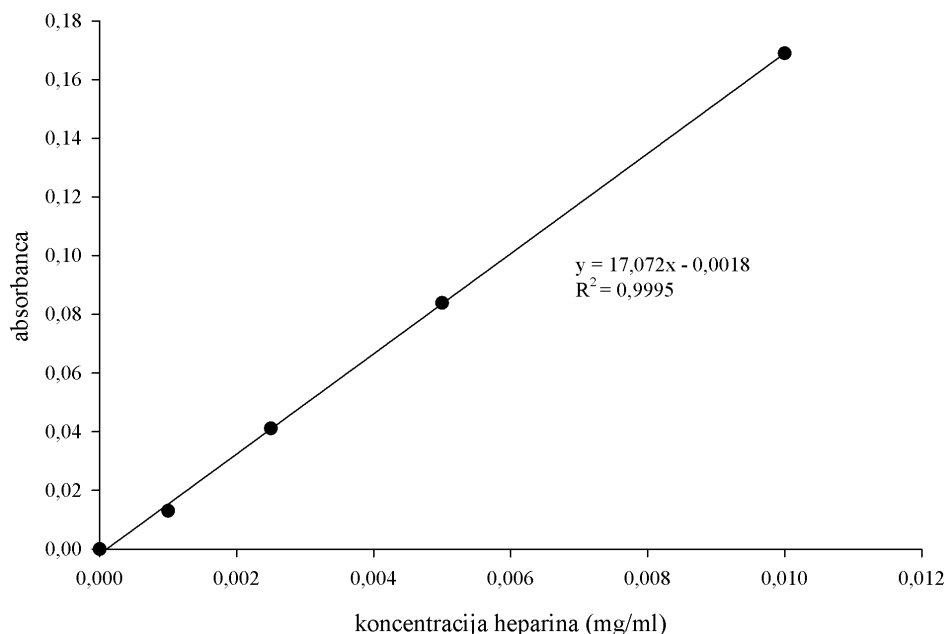
Meritve s spektrofotometrom

Zaradi nastanka kompleksa med barvilom in heparinom je prišlo do spremembe barve raztopin iz modre v vijolično, kar je osnova za spektrofotometrično določanje heparina. Raztopinam smo merili absorbanco pri valovni dolžini 512 nm, ki ustreza absorpcijskemu maksimumu kompleksa heparin-Azur A. Slepri vzorec je vseboval 1 ml prečiščene vode in 1 ml raztopine barvila s koncentracijo 0,02 mg/ml.

Priprava umeritvene krivulje

Za umeritveno krivuljo smo z redčenjem osnovne raztopine heparina s koncentracijo 50 mg/ml s prečiščeno vodo, pripravili standardne raztopine heparina s koncentracijami

0,0010 mg/ml, 0,0025 mg/ml, 0,0050 mg/ml in 0,0100 mg/ml. V epruveto smo nato odpipetirali 1 ml standardne raztopine in ji dodali 1 ml vodne raztopine barvila Azur A (konc. 0,02 mg/ml) ter vsebino epruvete premešali. Raztopinam smo izmerili absorbanco in na podlagi podatkov izračunali umeritveno krivuljo (slika 14).



Slika 14: Umeritvena krivulja za heparin. Posameznim podatkovnim parom je prilagojena linearna krivulja z enačbo $y = 17,072x - 0,0018$ ($R^2 = 0,9995$).

Izračun učinkovitosti vgradnje heparina v nanodelce

Iz absorbance, ki smo jo izmerili vzorcu, smo s pomočjo umeritvene krivulje izračunali koncentracijo heparina v vzorcu. Z upoštevanjem redčitve smo dobili koncentracijo heparina v supernatantu oz. tekoči fazi disperzije, ki smo jo potem množili z volumnom disperzije (100 ml) in tako dobili maso nevgrajenega heparina. To maso smo nato odšteli od celotne mase heparina, ki smo ga uporabili za izdelavo vzorca (disperzije). Iz te razlike smo dobili količino heparina, ki se je vgradil v ND. Učinkovitost vgradnje heparina v ND smo izračunali iz razmerja med vgrajenim in celotnim (za izdelavo disperzije uporabljenim) heparinom ter ga izrazili v odstotkih (enačba 2).

Enačba 2:

učinkovitost vgradnje heparina (%) = masa vgrajenega heparina / masa celotnega heparina
x 100

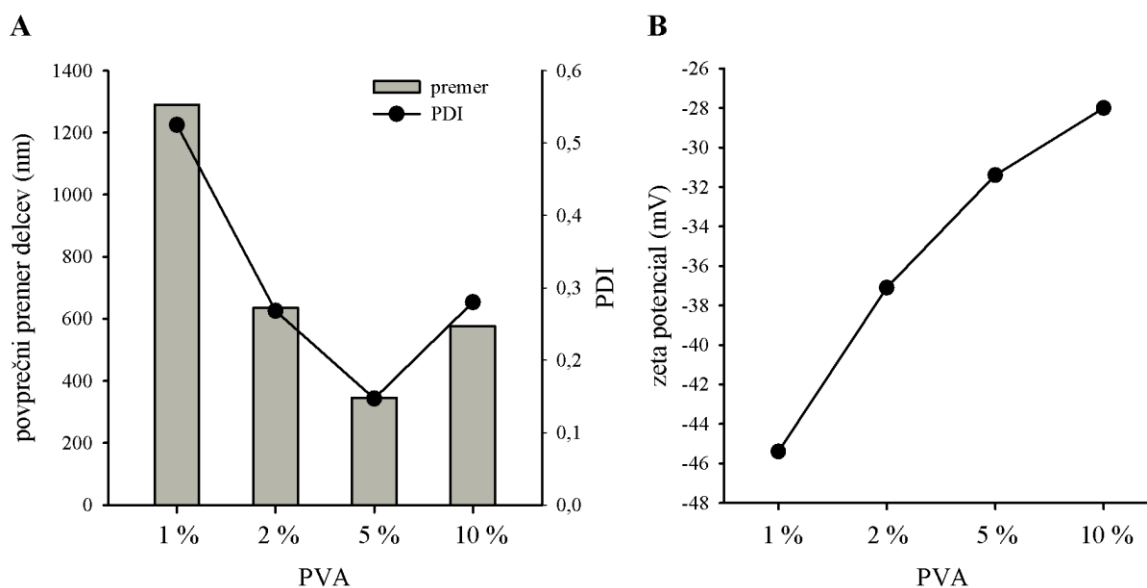
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Prazni nanodelci s stabilizatorjem PVA

Ugotavljali smo vpliv posameznih parametrov pri izdelavi nanodelcev na njihove fizikalne lastnosti. Spreminjali smo koncentracijo stabilizatorja PVA, čas sonikacije in koncentracijo polimera (PLGA) ter vrednotili vpliv teh sprememb na lastnosti nanodelcev v disperziji. Preverili smo tudi ponovljivost postopka izdelave nanodelcev pri izbranih pogojih ter spremljali fizikalno stabilnost disperzij. Na podlagi rezultatov smo izbrali optimalne pogoje za izdelavo nanodelcev s stabilizatorjem PVA.

4.1.1 Vpliv koncentracije stabilizatorja PVA na fizikalne lastnosti nanodelcev

Disperzije nanodelcev, izdelane z uporabo različnih koncentracij stabilizatorja PVA v zunanji vodni fazi, smo fizikalno ovrednotili z določitvijo povprečnega premera delcev, polidisperznega indeksa in zeta potenciala.



Slika 15: Povprečni premer delcev in PDI (A) ter zeta potencial (B) v odvisnosti od koncentracije PVA v zunanji vodni fazi dvojne emulzije.

S slike 15 (A) je razvidno, da so pri koncentraciji 1 % nastali delci mikrometrskih velikosti, ob uporabi višjih koncentracij PVA pa nanodelci. Njihov povprečni premer je bil pri koncentraciji 2 % PVA 636 nm, pri 5 % PVA 346 nm in pri 10 % PVA 576 nm. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da koncentracija PVA v zunanji vodni fazi vpliva na velikost

nastalih delcev in da se s povečevanjem koncentracije PVA do določene meje (do 5 % PVA) velikost nanodelcev zmanjšuje.

Polidisperzni indeks (PDI) je merilo za porazdelitev velikosti delcev in lahko zavzame vrednosti od 0 do 1. Majhna vrednost PDI ($< 0,3$) pomeni, da so delci v disperziji podobne velikosti in to je tudi zaželeno. Vzorec z 1 % PVA je imel visok PDI (0,53), kar kaže na heterogenost disperzije. Pri vzorcih z višjo koncentracijo PVA pa smo dobili vrednosti PDI manjše od 0,3, torej lahko sklepamo, da so bile te disperzije homogene. Najmanjši PDI (0,15) je imela disperzija ND, izdelana s 5 % PVA, kar pomeni, da so si bili delci v njej najbolj podobni po velikosti.

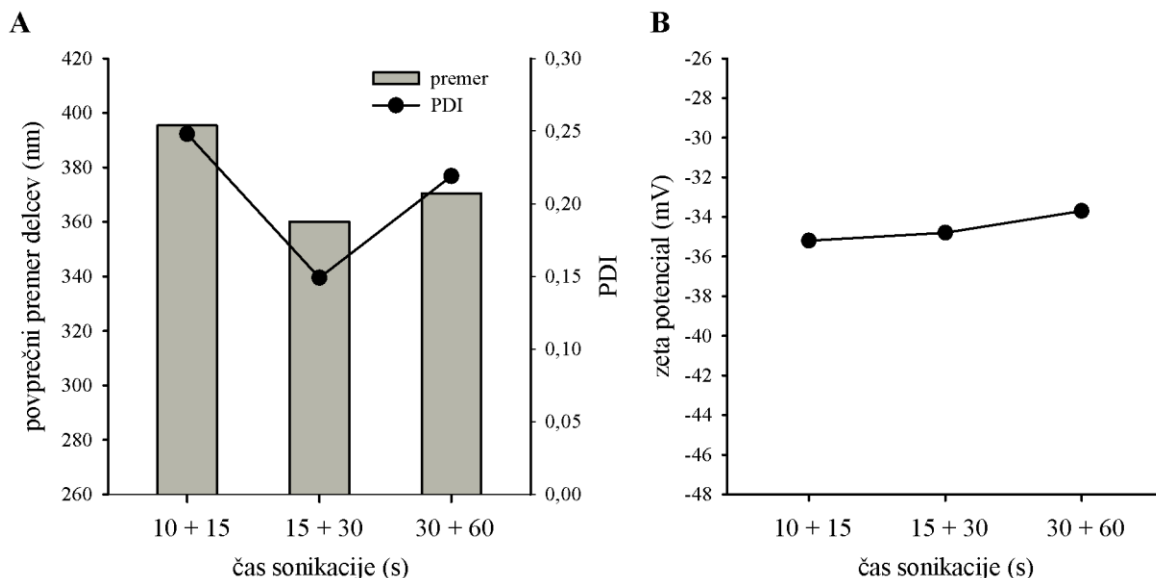
Na sliki 15 (B) je predstavljena odvisnost zeta potenciala (ZP) od koncentracije stabilizatorja PVA. Vrednost ZP je bila pri vseh vzorcih negativna. Za izdelavo praznih ND smo uporabili Resomer RG 502H, ki ima prosto karboksilno skupino na koncu polimerne verige, zato so imeli delci v vodnem mediju zaradi ionizacije te skupine negativni naboj. Z grafa je razvidno, da je z večanjem koncentracije PVA absolutna vrednost zeta potenciala padala. Disperzije z 1 %, 2 % in 5 % PVA so imele ZP manjši od -30 mV, torej so bile fizikalno stabilne, saj je naboj delcev v disperziji bil dovolj močan, da so se ti med seboj odbijali. Vzorcju z 10 % PVA pa smo izmerili ZP -28 mV, kar kaže na slabšo stabilnost disperzije in večjo možnost za agregacijo delcev.

PVA je sintezni hidrofilni polimer, ki se pri dvojni emulzijski metodi pogosto uporablja kot sterični stabilizator. Molekule PVA na medfazi olje-voda ščitijo kapljice emulzije pred koalescenco in pozneje trdne delce pred agregacijo. Več raziskovalcev je proučevalo vpliv koncentracije PVA v zunanji vodni fazi dvojne emulzije na lastnosti ND. Testirali so koncentracije od 0,5 do 5 % (m/V). Podobno kot mi so ugotovili, da se z večanjem koncentracije PVA (do 5 %) zmanjša povprečna velikost delcev, njihova absolutna vrednost zeta potenciala pa pada (9).

Na osnovi dobljenih rezultatov smo izbrali optimalno koncentracijo PVA za izdelavo nanodelcev. Pri 5 % PVA smo dobili fizikalno stabilno disperzijo z najmanjšo velikostjo delcev in nizkim PDI, zato smo to koncentracijo uporabljali tudi za nadaljne poskuse. Za uporabo 5 % (m/V) vodne raztopine PVA pri izdelavi polimernih (PLGA) nanodelcev z dvojno emulzijsko metodo so se odločili tudi Cegnar in sodelavci (30).

4.1.2 Vpliv časa sonikacije na fizikalne lastnosti nanodelcev

V disperzijah, ki so bile izdelane pri različnih časih sonikacije primarne in sekundarne emulzije, smo izmerili velikost delcev, PDI in zeta potencial.



Slika 16: Povprečni premer delcev in PDI (A) ter zeta potencial (B) v odvisnosti od časa sonikacije primarne (1.) in sekundarne (2.) emulzije. Čas sonikacije (s): (1.) + (2.).

Slika 16 prikazuje odvisnost povprečnega premera delcev, polidisperznega indeksa in zeta potenciala od časa sonikacije primarne emulzije (V/O) in sekundarne (dvojne) emulzije (V/O/V). Pri daljših časih sonikacije so nastali nekoliko manjši ND. Njihov povprečni premer je bil pri času 10 s + 15 s 395 nm, pri 15 s + 30 s pa se je zmanjšal na 360 nm. Z nadaljnim podaljšanjem časa na 30 s + 60 s se povprečni premer delcev ni bistveno spremenil. Tudi Bilati in sodelavci so proučevali vpliv časa sonikacije na velikost nastalih PLGA nanodelcev, izdelanih s stabilizatorjem PVA. Podobno kot mi so pri daljših časih sonikacije dobili ND z manjšim povprečnim premerom (32).

Disperzije, izdelane pri časih sonikacije, prikazanih na sliki 16, so bile homogene, z vrednostmi PDI pod 0,3. Najbolj enotno velikost ND smo dosegli s časom sonikacije 15 s + 30 s, kjer je bil PDI najmanjši (0,15).

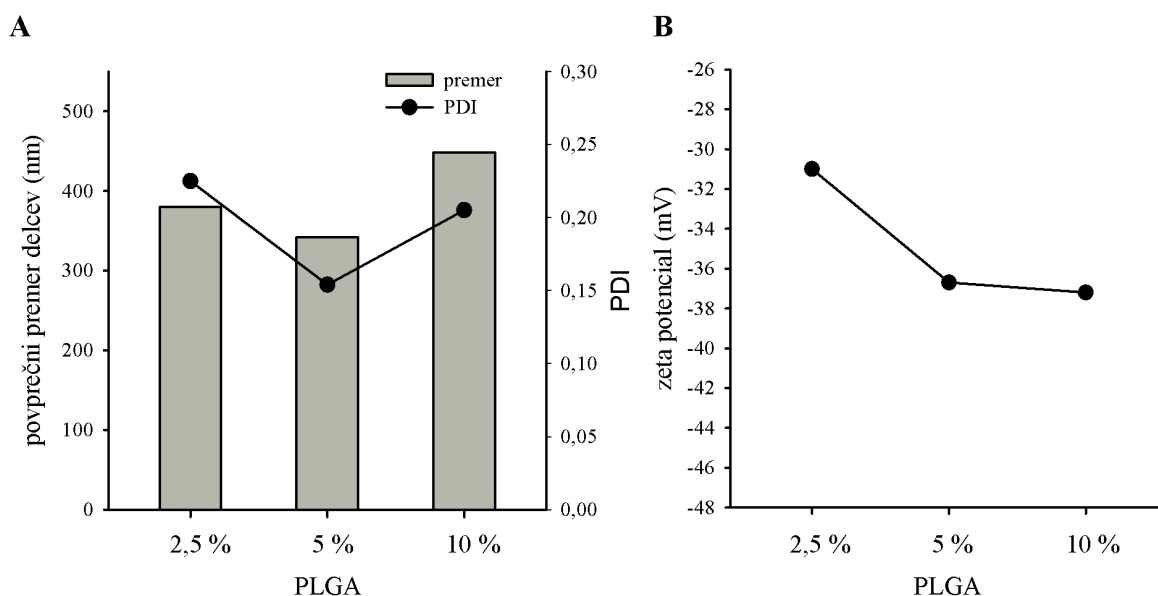
V vzorcu, izdelanem pri času sonikacije 5 s + 10 s, je nastala oborina, kar lahko pomeni, da je bil ta čas pri danih pogojih prekratek za nastanek stabilnih nanodelcev. Teh podatkov zaradi boljše preglednosti nismo vključili v sliko 16. Pri ostalih, daljših časih sonikacije,

smo dobili stabilne disperzije, ki niso težile k agregaciji. Vsem smo izmerili podobno vrednost zeta potenciala, ki je bila manjša od -30 mV.

Za izdelavo nanodelcev s stabilizatorjem PVA smo izbrali čas sonikacije 15 s + 30 s, saj smo pri tem času dobili ND z najmanjšo velikostjo in PDI-jem ter dobro fizikalno stabilnostjo.

4.1.3 Vpliv koncentracije polimera PLGA na fizikalne lastnosti nanodelcev

Disperzije nanodelcev, izdelane z uporabo različnih koncentracij raztopin PLGA v etilacetatu (organska faza), smo ovrednotili in se glede na rezultate odločili za koncentracijo PLGA, pri kateri so nanodelci izkazovali najboljše lastnosti.



Slika 17: Povprečni premer delcev in PDI (A) ter zeta potencial (B) v odvisnosti od koncentracije PLGA v organski fazi dvojne emulzije.

Kot prikazuje slika 17 (A) smo največji povprečni premer delcev izmerili v disperziji, izdelani z 10 % PLGA (448 nm). Ko smo koncentracijo PLGA znižali na 5 %, smo dobili manjše nanodelce s povprečnim premerom 342 nm, z nadaljnim znižanjem koncentracije na 2,5 % pa je njihova velikost spet nekoliko narasla (380 nm). Pričakovali smo, da se bo povprečna velikost pri uporabi 2,5 % PLGA še zmanjšala, saj je pri nižji koncentraciji v raztopini manj polimera za tvorbo delcev. Tudi nekateri raziskovalci poročajo o zmanjšanju velikosti ND ob znižanju koncentracije polimera v organski fazi dvojne emulzije (38). Bilati in sodelavci so pri zvišanju koncentracije polimera iz 20 % na 40 %

opazili znatno povečanje povprečnega premera in široko porazdelitev velikosti delcev v disperziji. Do povečanja velikosti delcev ob zvišanju koncentracije polimera bi lahko prišlo zaradi večje viskoznosti organske faze in posledično manj učinkovitega emulgiranja, poveča pa se tudi možnost za trke med delci in njihovo združevanje (32).

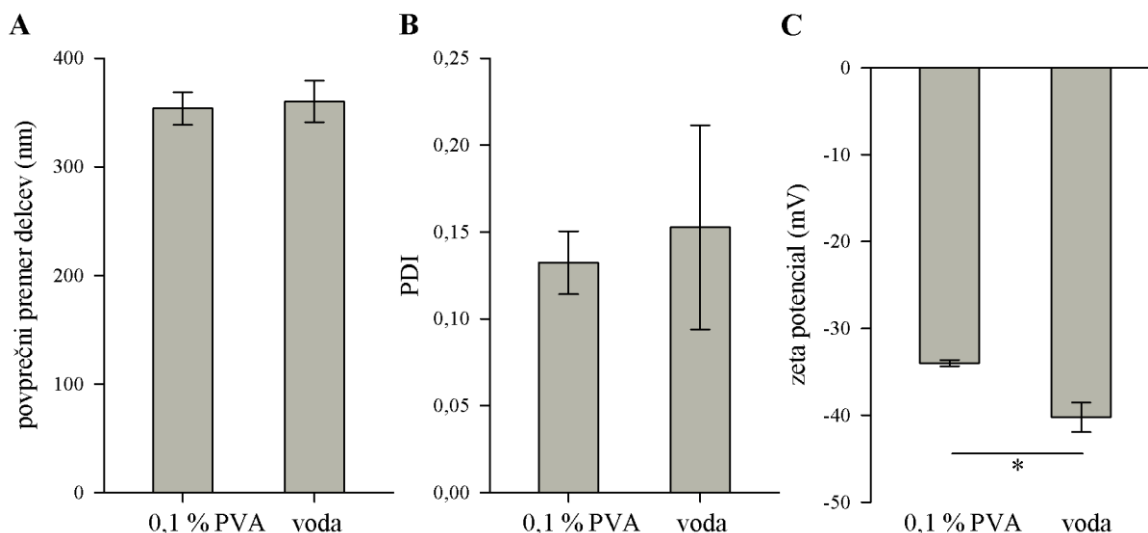
Polidisperzni indeks je bil pri vseh vzorcih manjši od 0,3. Najmanjšo vrednost PDI smo izmerili pri ND, izdelanih s 5 % PLGA (slika 17 (A)).

Vse disperzije so bile fizikalno stabilne, njihov zeta potencial je bil manjši od -30 mV. Izdelane so bile z Resomerom RG 502H in zaradi prostih karboksilnih skupin tega polimera je bila vrednost ZP pri vseh koncentracijah Resomera negativna. Pri najnižji koncentraciji (2,5 %) je bil ZP najmanj negativen (slika 17 (B)).

Nanodelcem, izdelanim s 5 % PLGA, smo izmerili najmanjšo velikost in PDI ter nizek zeta potencial, zato smo to koncentracijo polimera izbrali tudi za nadaljne poskuse. 5 % (m/V) raztopino PLGA v organski fazi so za izdelavo nanodelcev z dvojno emulzijsko metodo uporabili tudi Cegnar in sodelavci (30).

4.1.4 Ponovljivost postopka izdelave nanodelcev pri izbranih pogojih

Preverili smo ponovljivost rezultatov za izbrani postopek izdelave nanodelcev (opisan v poglavju 3.3.2) pri pogojih, ki so se v prejšnjih poskusih izkazali za optimalne (5 % PVA, čas sonikacije 15 s + 30 s, 5 % PLGA). V prvi seriji vzorcev smo kot dilucijsko fazo uporabili 0,1 % raztopino PVA v vodi, v drugi seriji pa smo jo zamenjali s prečiščeno vodo. Opazovali smo fizikalne lastnosti nanodelcev znotraj posamezne serije in primerjali seriji, izdelani z uporabo različnih dilucijskih faz.



Slika 18: Povprečni premer (A), polidisperzni indeks (B) in zeta potencial (C) delcev pri diluciji z 0,1 % vodno raztopino PVA oz. s prečiščeno vodo. Rezultati so predstavljeni kot povprečna vrednost \pm S.D. (n = 3). *p = 0,015, Studentov t-test.

Povprečni premer delcev je bil pri uporabi obeh dilucijskih faz podoben (354 ± 15 nm pri 0,1 % PVA in 360 ± 19 nm pri diluciji z vodo, $p > 0,05$, Studentov t-test). Majhna standardna deviacija kaže na dobro ponovljivost povprečnega premera delcev pri obeh načinih dilucije (slika 18 (A)).

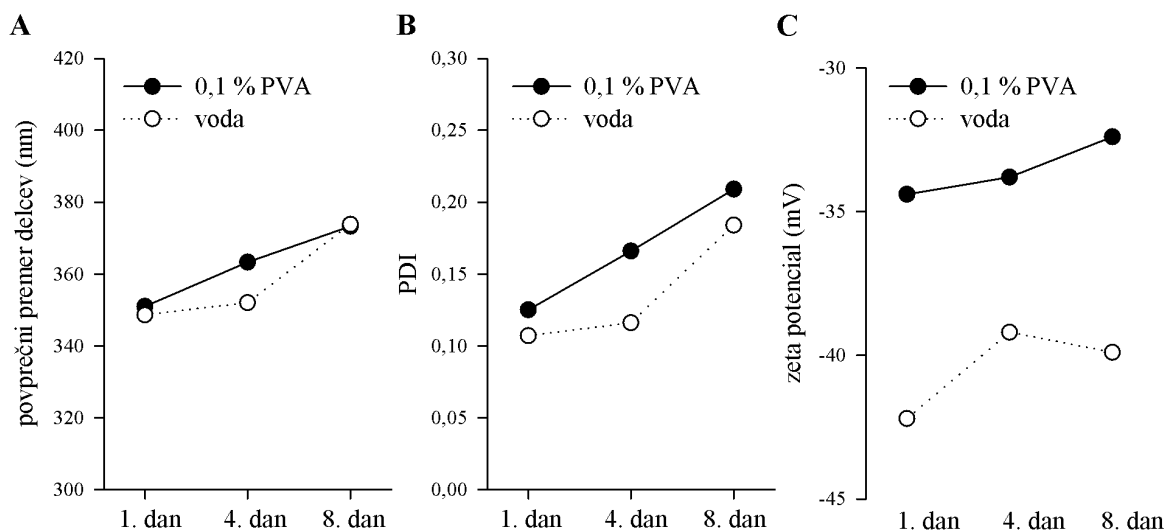
Za dilucijo z 0,1 % PVA smo dobili vrednost PDI $0,13 \pm 0,02$, za dilucijo z vodo pa $0,15 \pm 0,06$. Povprečni PDI je primerljiv (vrednosti nista statistično značilno različni, $p > 0,05$, Studentov t-test), njegova vrednost pa nekoliko bolj variira pri diluciji z vodo. Porazdelitev velikosti delcev v disperzijah je pri obeh načinih dilucije ozka (PDI < 0,3). (slika 18 (B)).

Povprečni zeta potencial pri diluciji z vodo ($-40 \pm 1,7$ mV) je bil statistično značilno bolj negativen kot pri diluciji z 0,1 % PVA, kjer smo dobili povprečno vrednost ZP $-34 \pm 0,3$ mV (slika 18 (C)), *p = 0,015, Studentov t-test). Disperzije so bile fizikalno stabilne pri obeh načinih dilucije (ZP < -30 mV). Nižji ZP kaže na močnejši negativni naboj v disperzijah, kjer je bila kot dilucijska faza uporabljena voda.

Na podlagi rezultatov tega poskusa lahko sklepamo, da je ponovljivost postopka izdelave nanodelcev pri izbranih pogojih dobra ter da pri diluciji z 0,1 % PVA in s prečiščeno vodo dobimo nanodelce s primerljivimi fizikalnimi lastnostmi.

4.1.5 Spremljanje fizikalne stabilnosti disperzij nanodelcev

Spremljali smo fizikalno stabilnost dveh disperzij nanodelcev, izdelanih v prejšnjem poskusu. Prva (D1) je bila izdelana z uporabo 0,1 % vodne raztopine PVA kot dilucijske faze, pri drugi (D2) pa je bila za ta namen uporabljena prečiščena voda. Meritve smo naredili prvi dan, takoj po izdelavi, nato pa še četrty in osmi dan po izdelavi. Njuno fizikalno stabilnost smo ovrednotili in primerjali.



Slika 19: Povprečni premer (A), polidisperzni indeks (B) in zeta potencial (C) delcev v odvisnosti od časa za disperzijo z 0,1 % PVA (●) in disperzijo s prečiščeno vodo (○) kot dilucijsko fazo.

Velikost delcev je pri obeh disperzijah v 8. dneh nekoliko narasla, pri D1 iz začetnih 351 na 373 nm, pri D2 pa iz 349 na 374 nm. Tudi polidisperzni indeks se je pri obeh vzorcih s časom nekoliko povečal, a je po 8. dneh bila njegova vrednost še zmeraj nizka (0,21 (D1) in 0,18 (D2)). Pri vzorcu D2 smo 4. dan po izdelavi izmerili skoraj enako povprečno velikost delcev in PDI kot prvi dan (slika 19 (A) in (B)).

Zeta potencial disperzij se v 8. dneh praktično ni spremenil, njegove vrednosti so pri obeh vzorcih ostale manjše od -30 mV (slika 19 (C)).

Zaključimo lahko, da so disperzije ND, izdelane pri izbranih pogojih (5 % PVA, čas sonikacije 15 s + 30 s, 5 % PLGA) z 0,1 % raztopino PVA oz. s prečiščeno vodo kot dilucijsko fazo, fizikalno stabilne vsaj 8 dni. V opazovanem časovnem obdobju se velikost delcev v disperzijah ni bistveno spremenila, PDI je ostal nizek in zeta potencial manjši od

-30 mV. Tudi vizualno nismo opazili agregacije delcev v vzorcih. Pri obeh načinih dilucije smo dobili primerljive rezultate.

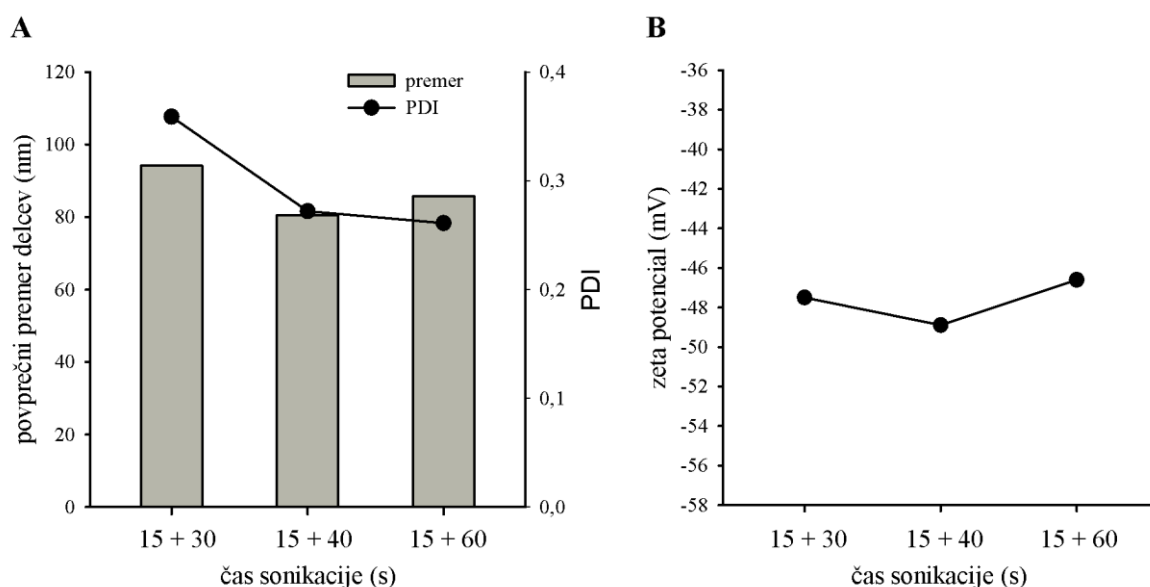
4.2 Prazni nanodelci s stabilizatorjem poloksamer 188

Pri izdelavi nanodelcev smo namesto PVA kot sterični stabilizator uporabili poloksamer 188 (P188). P188 je kopolimer etilenoksida in propilenoksida in je bolj biokompatibilen od PVA.

Opazovali smo, kako menjava stabilizatorja vpliva na fizikalne lastnosti nanodelcev in iskali optimalne pogoje za izdelavo ND s poloksamerom 188. Preverili smo vpliv časa sonikacije in koncentracije polimera PLGA na lastnosti teh nanodelcev ter ugotavljali optimalno koncentracijo stabilizatorja P188 za izdelavo ND pri različnih pogojih dilucije.

4.2.1 Vpliv časa sonikacije na fizikalne lastnosti nanodelcev

V disperzijah, ki so bile izdelane pri različnih časih sonikacije sekundarne emulzije, smo izmerili povprečni premer delcev, PDI in zeta potencial.



Slika 20: Povprečni premer delcev in PDI (A) ter zeta potencial (B) v odvisnosti od časa sonikacije. Čas sonikacije (s): (1.) čas sonikacije primarne emulzije (15 s) + (2.) čas sonikacije sekundarne emulzije (30, 40 oz. 60 s).

Povprečni premer nanodelcev s P188, pripravljenih pri pogojih, ki smo jih izbrali kot optimalne pri izdelavi ND s PVA (5 % raztopina stabilizatorja, 5 % PLGA, dilucija z vodo in čas sonikacije 15 s + 30 s) je bil 94 nm, vrednost PDI 0,36 in zeta potencial -47 mV. Ko smo čas sonikacije sekundarne emulzije podaljšali na 40 s, smo dobili še nekoliko manjše ND (povprečni premer 81 nm) in nižji PDI (0,27), vrednost ZP je ostala podobna (-49 mV). Z nadaljnjim podaljšanjem časa 2. sonikacije na 60 s se velikost, PDI in ZP niso bistveno spremenili – njihove vrednosti so bile podobne kot pri času 15 + 40 s (slika 20 (A) in (B)).

Vpliv časa sonikacije na fizikalne lastnosti ND so proučevali tudi Bilati in sodelavci (39). Ugotovili so, da ima čas sonikacije sekundarne emulzije pomembnejši vpliv na končno velikost delcev kot čas sonikacije primarne emulzije in da se s podaljšanjem časa 2. emulgiranja velikost nastalih nanodelcev do neke meje zmanjša, kar nakazujejo tudi naše ugotovitve.

Iz rezultatov je razvidno, da je bila velikost delcev pri vseh treh vzorcih manjša od 100 nm, kar pomeni, da smo s stabilizatorjem P188 izdelali veliko manjše nanodelce kot s PVA.

Vrednost PDI je pri času sonikacije 15 + 30 s v tem poskusu (za disperzijo s P188) približno dvakrat večja kot je bila pri disperzijah s PVA, kar kaže na širšo porazdelitev velikosti delcev, izdelanih s poloksamerom (pri ND iz Resomera RG 502H). Pri tem vzorcu (z vrednostjo PDI 0,36) smo tudi vizualno opazili nekaj motnosti in oborine, ki je pri ostalih dveh vzorcih z daljšim časom sonikacije 2. emulzije ni bilo. Slednja vzorca sta imela PDI manjši od 0,3 (slika 20 (A)) in sta bila bolj homogena.

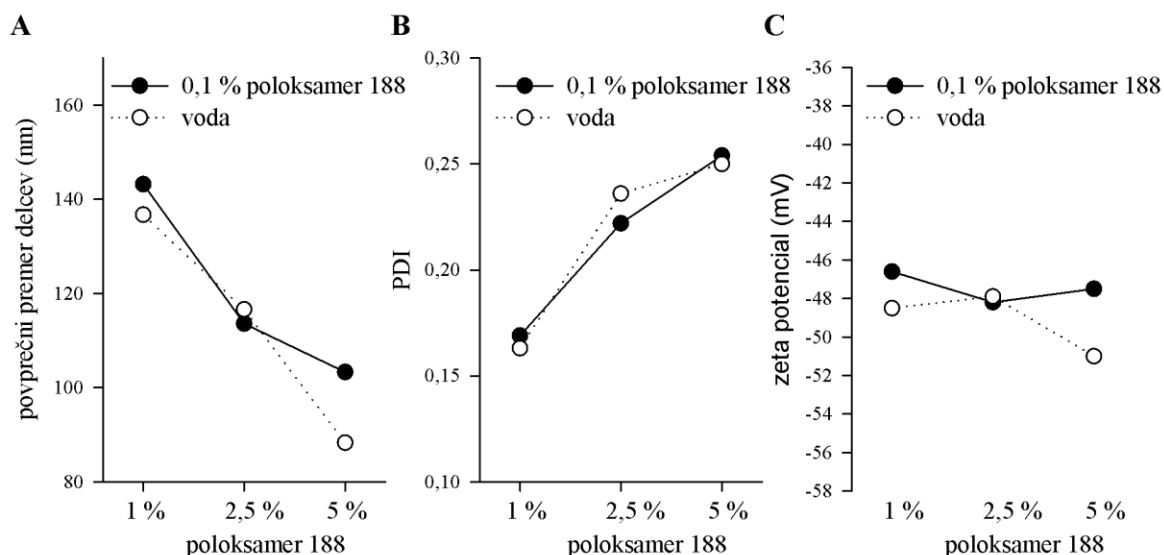
Zeta potencial je bil pri vseh časih sonikacije nižji od -30 mV (slika 20 (B)), torej smo tudi s poloksamerom uspeli izdelati fizikalno stabilne disperzije nanodelcev.

Za izdelavo ND s poloksamerom se je kot optimalen izkazal čas sonikacije 15 + 40 s, saj smo z njim dobili homogeno disperzijo nanodelcev z majhno povprečno velikostjo in dobro fizikalno stabilnostjo.

4.2.2 Vpliv koncentracije poloksamera na fizikalne lastnosti nanodelcev

Disperzije nanodelcev, izdelane z uporabo različnih koncentracij poloksamera 188 v zunanji vodni fazi dvojne emulzije, smo fizikalno ovrednotili z določitvijo povprečnega premera delcev, polidisperznega indeksa in zeta potenciala.

Pri poskusu smo preverili tudi vpliv različnih pogojev dilucije na lastnosti nanodelcev.



Slika 21: Povprečni premer delcev (A), polidisperzni indeks (B) in zeta potencial (C) v odvisnosti od koncentracije poloksamera v zunanji vodni fazi dvojne emulzije (pri diluciji z 0,1 % raztopino poloksamera 188 (●) in pri diluciji s prečiščeno vodo (○)).

S slike 21 (A) je razvidno, da se je velikost delcev z višanjem koncentracije stabilizatorja P188 zmanjšala pri obeh načinih dilucije. Najmanjše nanodelce smo dobili pri koncentraciji poloksamera 5 %, kjer je bil njihov povprečni premer 103 nm pri diluciji z 0,1 % P188 oz. 88 nm pri diluciji z vodo. Kot smo ugotovili že v prejšnjem poskusu so nanodelci, izdelani s P188, veliko manjši od ND, izdelanih s stabilizatorjem PVA, ki so pri koncentraciji 5 % PVA imeli povprečni premer blizu 350 nm. To je lahko posledica razlik v strukturi obeh stabilizatorjev. Poloksamer ima, za razliko od PVA, amfifilno strukturo (hidrofobni polipropilenoksidni del na sredini in hidrofilni polietilenoksid na obeh koncih verige), kar mu omogoča učinkovitejše emulgiranje in stabilizacijo kapljic dvojne emulzije. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi raziskovalci, ki so z uporabo poloksamera kot stabilizatorja pri dvojni emulzijski - difuzijski metodi pravtako dobili manjšo povprečno velikost ND kot s stabilizatorjem PVA (38).

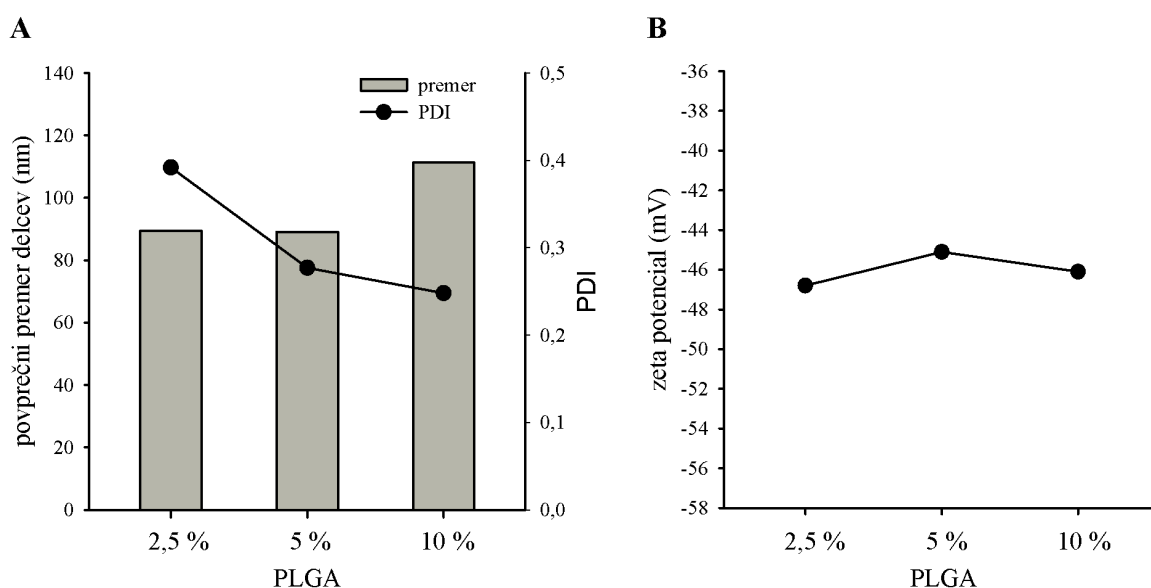
Polidisperzni indeks je s povečanjem koncentracije P188 nekoliko narasel, vendar so bile njegove vrednosti pri vseh vzorcih manjše od 0,3, kar pomeni, da prevelikega nihanja velikosti delcev v disperzijah ni bilo.

Zeta potencial je bil pri vseh vzorcih podoben, neodvisen od koncentracije poloksamera in načina dilucije. Vrednosti ZP so se gibale med -47 in -51 mV, kar kaže na dobro fizikalno stabilnost disperzij.

Za izdelavo nanodelcev smo izbrali koncentracijo poloksamera 5 %, saj so ND pri tej koncentraciji imeli najmanjšo velikost, disperzije pa so bile homogene in fizikalno stabilne. Pri obeh načinih dilucije smo dobili primerljive rezultate, zato smo se odločili za uporabo vode kot dilucijske faze.

4.2.3 Vpliv koncentracije polimera PLGA na fizikalne lastnosti nanodelcev

Disperzije nanodelcev, izdelane z uporabo različnih koncentracij raztopin PLGA v etilacetatu, smo ovrednotili in se glede na rezultate odločili za koncentracijo PLGA, pri kateri so nanodelci izkazovali najboljše lastnosti.



Slika 22: Povprečni premer delcev in PDI (A) ter zeta potencial (B) v odvisnosti od koncentracije PLGA v organski fazi dvojne emulzije.

Kot prikazuje slika 22 (A) smo pri koncentracijah PLGA 2,5 % in 5 % nanodelcem izmerili najmanjši povprečni premer (pri obeh 89 nm), s povišanjem koncentracije na 10 % pa je ta narasel na 111 nm.

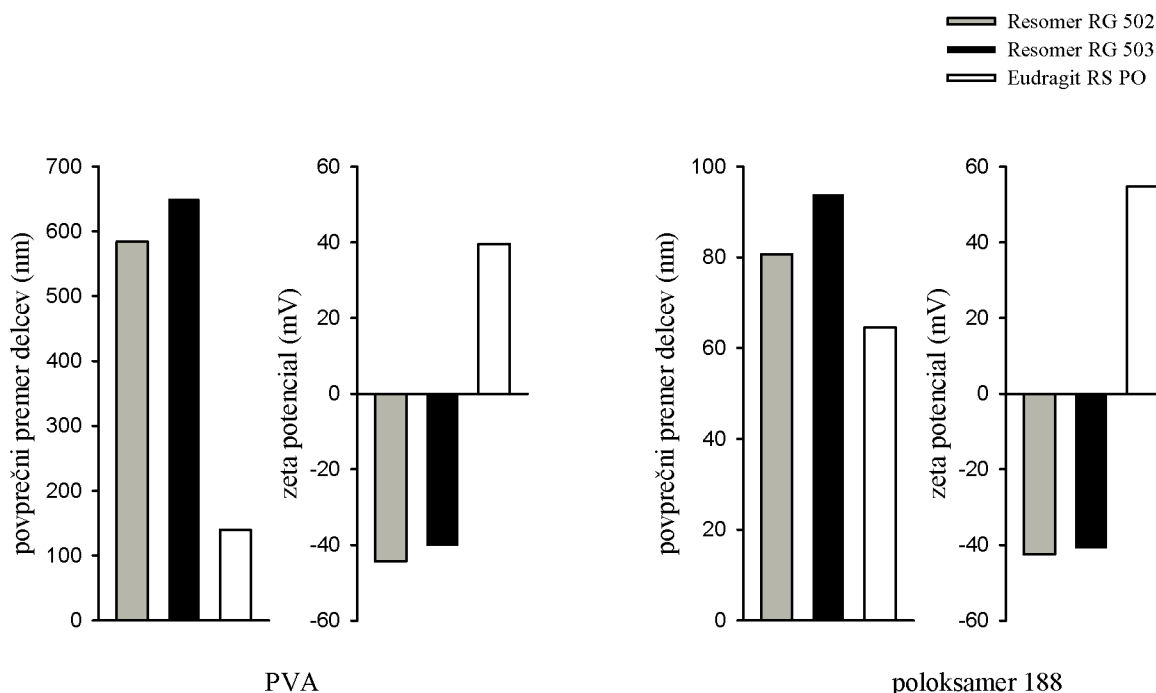
Polidisperzni indeks je bil pri 5 % in 10 % PLGA manjši od 0,3. Pri vzorcu z 2,5 % PLGA je bila vrednost PDI nekoliko višja (0,39), kar kaže na večjo heterogenost disperzije.

S slike 22 (B) je razvidno, da je bil zeta potencial pri vseh treh vzorcih podoben in torej neodvisen od koncentracije PLGA. Njegove vrednosti so bile okrog -46 mV, kar pomeni, da so delci v disperzijah imeli močan negativni naboj, ki je preprečil njihovo združevanje in omogočil stabilnost disperzij.

Tudi za izdelavo nanodelcev s poloksamerom se je kot optimalna izkazala 5 % raztopina PLGA. Pri tej koncentraciji PLGA smo dobili homogeno disperzijo ND z majhnim povprečnim premerom in dobro fizikalno stabilnostjo.

4.3 Prazni nanodelci iz različnih polimerov

Nanodelcem iz treh različnih polimerov, izdelanim z uporabo PVA oz. poloksamera kot stabilizatorja, smo izmerili povprečni premer in zeta potencial ter primerjali rezultate.



Slika 23: Povprečni premer in zeta potencial nanodelcev, izdelanih iz polimerov Resomer RG 502, Resomer RG 503 oz. Eudragit RS PO in s stabilizatorjem PVA (levo) oz. poloksamer 188 (desno).

S slike 23 je razvidno, da je velikost nanodelcev odvisna od vrste polimera, uporabljenega za njihovo izdelavo. Najmanjše ND smo dobili z akrilatnim polimerom Eudragit RS PO. Njihov povprečni premer je bil 139 nm s stabilizatorjem PVA in 65 nm s poloksamerom. Pri uporabi PLGA polimerov so bili ND precej večji. S stabilizatorjem PVA smo dobili za Resomer RG 502 povprečni premer delcev 584 nm in za Resomer RG 503 650 nm, ko smo kot stabilizator uporabili poloksamer, pa za prvega 81 nm in za drugega 94 nm. V obeh primerih smo dobili večje ND z Resomerom RG 503, ki ima večjo molekularno maso od Resomera RG 502. To pomeni, da MM polimera vpliva na velikost nastalih nanodelcev.

Polimeri z večjo MM imajo daljšo polimerno verigo in njihove raztopine večjo viskoznost. Zaradi tega se težje dispergirajo, to pa lahko vodi v nastanek večjih delcev. Tudi drugi raziskovalci so z Resomeri z večjo MM dobili večje nanodelce in prišli do podobnih ugotovitev (31,32).

Resomera RG 502 in RG 503 sta polimera PLGA z zaestreno terminalno karboksilno skupino. V prejšnjih poskusih pa smo za izdelavo ND uporabljali Resomer RG 502H, ki ima enako MM kot RG 502 in se od njega razlikuje samo v prisotnosti prostih karboksilnih skupin. Pri izdelavi ND s stabilizatorjem PVA smo z Resomerom RG 502H dobili precej manjše ND (360 nm) kot z Resomerom RG 502 (584 nm), kar pomeni, da tudi polarnost polimera vpliva na velikost delcev. Resomer RG 502H ima zaradi prostih karboksilnih skupin večji negativni naboj, zato je elektrostatska stabilizacija v disperziji večja in nastanejo manjši ND. Tudi Cegnar in sodelavci so opazili podoben vpliv polarnosti polimera na velikost ND (30).

Kot prikazuje slika 23, je bil zeta potencial ND iz Resomerov RG 502 in RG 503 negativen. Ne glede na uporabljen stabilizator so bile njegove vrednosti pri obeh Resomerih podobne. Gibale so se med -40 in -44 mV, torej so bile disperzije fizikalno stabilne.

Pri ND iz Eudragita pa je bil zeta potencial pozitiven. Polimer Eudragit RS PO je zaradi kvarternih amonijevih skupin v svoji strukturi pozitivno nabit. Vrednost ZP je bila za nanodelce iz Eudragita pri obeh stabilizatorjih večja od 30 mV (+40 mV s PVA in +55 mV s P188), kar pomeni, da so imeli delci v disperziji močno pozitiven naboj. Delci z močnim istovetnim nabojem se med seboj odbijajo, kar preprečuje njihovo agregacijo in omogoči stabilnost disperzije.

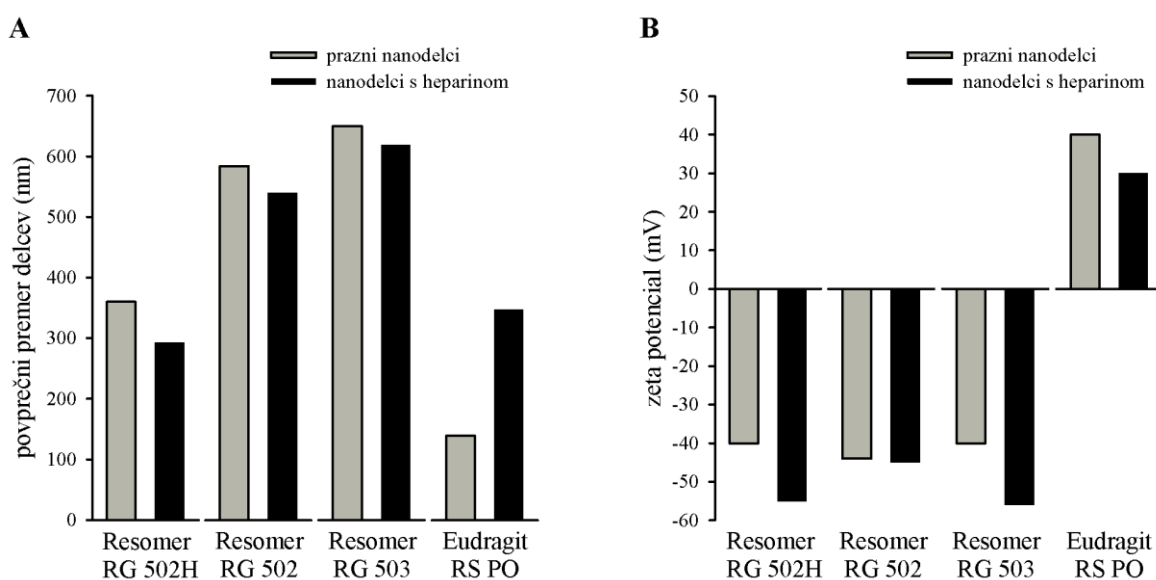
4.4 Nanodelci s heparinom

Naš cilj je bil, da bi z uporabo dvojne emulzijske metode izdelali polimerne nanodelce z vgrajenim heparinom. Pri izdelavi praznih nanodelcev smo iskali pogoje, ki so nam dali disperzije ND z želenimi lastnostmi: čim manjšo velikostjo delcev, nizkim PDI ($< 0,3$) in dobro fizikalno stabilnostjo ($|ZP| > 30$ mV). Iz izbranih optimalnih pogojev smo izhajali tudi pri izdelavi nanodelcev s heparinom. Da bi bila učinkovitost vgradnje čim boljša, smo spreminjali določene parametre in ugotavljali njihov vpliv na delež vgrajenega heparina. Nanodelce smo izdelali z uporabo različnih polimerov in različnih koncentracij raztopin polimerov v etilacetatu, v njih smo vgrajevali različne koncentracije heparina in na koncu še komplekse heparina s hitosanom.

4.4.1 Nanodelci s heparinom iz različnih polimerov

Nanodelcem s heparinom, izdelanim iz štirih različnih polimerov, s stabilizatorjem PVA oz. poloksamer 188, smo izmerili povprečni premer in zeta potencial ter jih primerjali s praznimi nanodelci, izdelanimi pri enakih pogojih. Določili smo tudi, koliko heparina se je vgradilo v polimerne nanodelce in primerjali rezultate za različne vzorce.

4.4.1.1 Primerjava fizikalnih lastnosti praznih nanodelcev in nanodelcev s heparinom



Slika 24: Povprečni premer (A) in zeta potencial (B) praznih nanodelcev in nanodelcev s heparinom, izdelanih iz različnih polimerov s stabilizatorjem PVA.

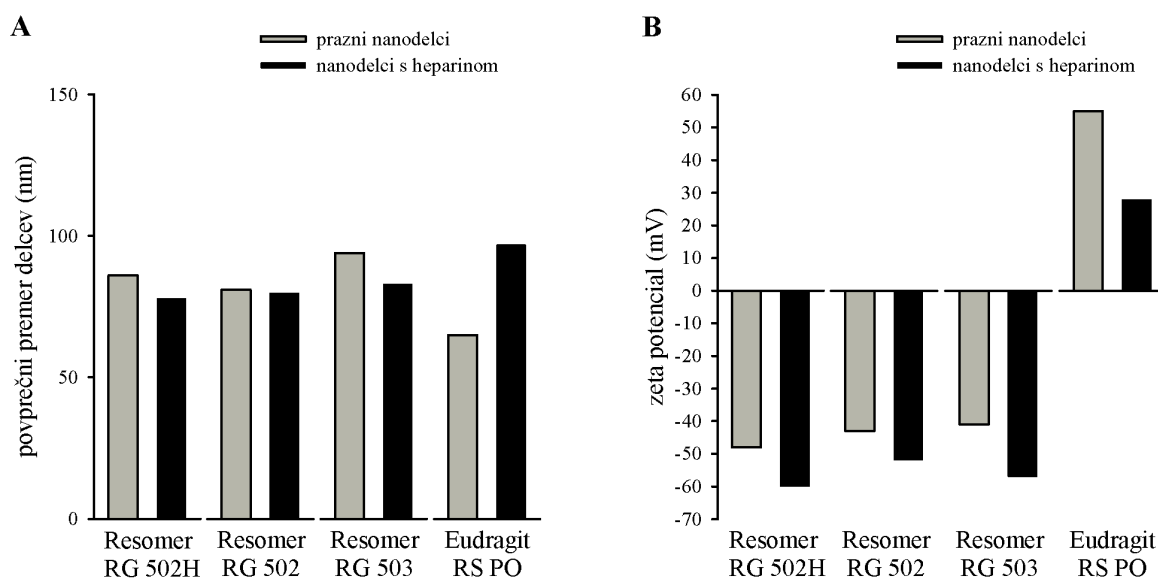
Slika 24 prikazuje fizikalne lastnosti praznih in heparinskih nanodelcev, izdelanih s stabilizatorjem PVA. Pri vzorcih iz PLGA polimerov (Resomeri) smo izmerili ND s heparinom nekoliko manjšo velikost kot praznim ND, pri vzorcih iz Eudragita pa so bili ND s heparinom precej večji od praznih (slika 24 (A)).

Zeta potencial ND s heparinom je bil pri Resomeru RG 502 podoben, pri ostalih polimerih pa so bile vrednosti nižje kot za prazne ND – pri Resomerih bolj negativne, pri Eudragitu pa manj pozitivne (slika 24 (B)).

Tudi Jiao in sodelavci so z dvojno emulzijsko metodo izdelali prazne nanodelce in ND s heparinom iz polimera PLGA in Eudragita (34). Med praznimi nanodelci so najmanjšo povprečno velikost izmerili ND iz Eudragita, med heparinskimi nanodelci iz različnih polimerov pa niso opazili večjih razlik v velikosti. Prazni in heparinski nanodelci iz PLGA so imeli podobno velikost, pri ND iz Eudragita pa so dobili s heparinom večje delce od praznih.

Velikost delcev je v veliki meri odvisna od stabilnosti primarne emulzije. Eudragit ima v svoji strukturi kvarterne amonijeve skupine (pozitivni naboj), ki stabilizirajo primarno emulzijo in preprečujejo koalescenco kapljic, kar je lahko razlog za majhno povprečno velikost ND iz Eudragita. Ko vgrajujemo heparin, pa ta s svojim negativnim nabojem nevtralizira učinek kvarternih amonijevih skupin, kar lahko zmanjša stabilnost primarne emulzije in poveča možnost za koalescenco kapljic, posledično pa nastanejo večji nanodelci. Do razlike v velikosti med praznimi in heparinskimi ND iz Eudragita bi lahko prišlo tudi zaradi adsorpcije heparina z negativno nabitimi sulfatnimi skupinami na površino pozitivno nabitega polimera (34). Ti razlagi se skladata tudi z dejstvom, da so imeli nanodelci s heparinom nižji zeta potencial kot prazni nanodelci iz Eudragita.

Pri nanodelcih iz PLGA (Resomerov) se je zeta potencial z vgradnjo heparina pravtako znižal. Njegove vrednosti so postale še bolj negativne, kar pomeni, da je heparin s svojim negativnim nabojem prispeval k stabilnosti disperzij. Razlog za nekoliko manjšo povprečno velikost heparinskih PLGA nanodelcev v primerjavi s praznimi pa bi lahko bila večja stabilnost primarne emulzije zaradi prisotnosti heparina.



Slika 25: Povprečni premer (A) in zeta potencial (B) praznih nanodelcev in nanodelcev s heparinom, izdelanih iz različnih polimerov s stabilizatorjem **poloksamer 188**.

Slika 25 prikazuje fizikalne lastnosti praznih in heparinskih nanodelcev, izdelanih s stabilizatorjem poloksamer 188. Rezultati kažejo na podoben trend kot smo ga opazili pri nanodelcih s stabilizatorjem PVA. Tudi tukaj so bili pri vzorcih iz PLGA polimerov ND s heparinom nekoliko manjši od praznih nanodelcev (pri Resomeru RG 502 je bila velikost obojih podobna), heparinski ND iz Eudragita pa večji od praznih ND iz istega polimera (slika 25 (A)).

Vrednosti zeta potenciala so bile tudi z uporabo poloksamera kot stabilizatorja pri nanodelcih s heparinom nižje kot pri praznih nanodelcih (slika 25 (B)).

4.4.1.2 Učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce iz različnih polimerov

Tabela II: Učinkovitost vgradnje heparina (%) v nanodelce iz različnih polimerov, izdelane s stabilizatorjem PVA oz. poloksamer 188.

polimer	stabilizator	
	PVA	poloksamer 188
Resomer RG 502H	0	0
Resomer RG 502	1	2
Resomer RG 503	16	8
Eudragit RS PO	97	77

Kot prikazuje tabela II, je učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce odvisna od vrste polimera, iz katerega so bili izdelani, in tudi od uporabljenega stabilizatorja. Najboljšo učinkovitost vgradnje smo dosegli pri ND iz Eudragita (s stabilizatorjem PVA večjo (97 %) kot s poloksamerom (77 %)). Molekule heparina imajo zaradi številnih sulfatnih in karboksilnih skupin negativni naboj, zato se vežejo s pozitivnimi skupinami Eudragita, to pa lahko vpliva na večjo učinkovitost vgradnje heparina. Za nanodelce iz polimerov PLGA smo dobili precej slabše rezultate. Ti kažejo, da se v nanodelce iz Resomera RG 502H heparin ni vgradil. Razlog za to bi lahko bile proste karboksilne skupine tega polimera, ki mu zaradi ionizacije dajejo negativni naboj ter s tem odbijajo enako nabit heparin. Tudi pri ND iz Resomera RG 502, ki ima zaestrene terminalne karboksilne skupine, je bila učinkovitost vgradnje zelo slaba (1 % pri uporabi stabilizatorja PVA in 2 % pri uporabi poloksamera), kar pomeni, da je verjetno zaradi nizke molekulske mase polimera in majhne viskoznosti njegove raztopine, učinkovina med izdelavo ND uhajala iz notranje v zunanjo vodno fazo. Boljšo učinkovitost vgradnje heparina smo dobili pri ND iz polimera Resomer RG 503 (s stabilizatorjem PVA 16 % in s poloksamerom 8 %). Ta ima večjo MM od ostalih dveh Resomerov, zato ima tudi primarna emulzija večjo viskoznost, učinkovina pa manj uhaja v zunanjo vodno fazo.

Jiao in sodelavci, ki so za izdelavo polimernih nanodelcev s heparinom uporabili dvojno emulzijsko metodo z odparevanjem organskega topila, so pri ND iz PLGA določili učinkovitost vgradnje heparina 14 %, pri ND iz Eudragita RS PO pa 59 % (34). Tudi Lian in sodelavci so izdelali PLGA nanodelce s heparinom z dvojno emulzijsko - evaporacijsko metodo. Pri njih je bila učinkovitost vgradnje heparina 5,35 % (40).

4.4.2 Vpliv koncentracije polimera na učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce

Pri poskusu smo opazovali vpliv koncentracije treh različnih polimerov na učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce, izdelane s stabilizatorjem PVA oz. s poloksamerom 188.

Tabela III: Učinkovitost vgradnje heparina (%) v nanodelce, izdelane z različnimi koncentracijami polimerov in s stabilizatorjem PVA.

koncentracija	polimer		
	Resomer RG 502H	Resomer RG 502	Eudragit RS PO
5 %	0	1	97
7,5 %	0	0	89
10 %	0	10	91

Tabela IV: Učinkovitost vgradnje heparina (%) v nanodelce, izdelane z različnimi koncentracijami polimerov in s stabilizatorjem **poloksamer 188**.

koncentracija	polimer		
	Resomer RG 502H	Resomer RG 502	Eudragit RS PO
5 %	0	2	77
7,5 %	0	0	83
10 %	0	0	79

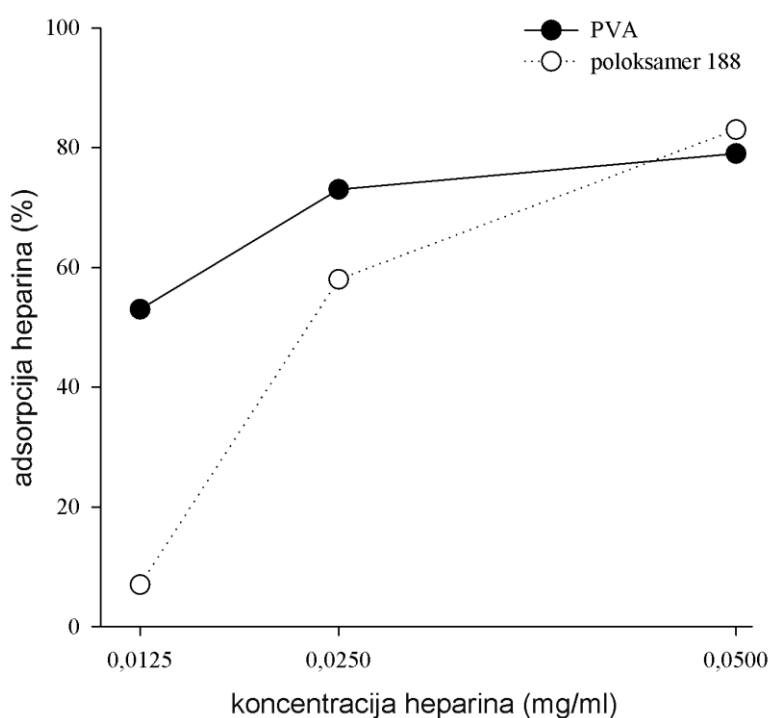
Kot prikazujeta tabela III in IV, pri ND iz Resomera RG 502H tudi z zvišanjem koncentracije polimera ni prišlo do vgradnje heparina. Razlog za to so verjetno odbojne sile med heparinom in polimerom, ki so se z višanjem koncentracije polimera še povečale. Pri ND iz Resomera RG 502 smo dosegli večjo učinkovitost vgradnje (10 %), ko smo koncentracijo polimera povečali na 10 %, vendar samo pri ND, izdelanih s stabilizatorjem PVA. Za ND iz Eudragita smo dobili pri različnih koncentracijah polimera podobne rezultate, kar pomeni, da koncentracija polimera ni bistveno vplivala na vgradnjo heparina oz. da je bila za njegovo vgradnjo zadostna že koncentracija 5 %.

Pri vgrajevanju hidrofilnih učinkovin v nanodelce z dvojno emulzijsko metodo predstavlja največjo težavo uhajanje učinkovine v zunanjo vodno fazo med emulgiranjem. Zaradi tega je lahko vgradnja učinkovine slaba, zato je pomembno, da se že pri prvem emulgiranju hitro vzpostavi polimerna pregrada. Kot poročajo nekateri avtorji, lahko k temu pripomore višja koncentracija polimera, ki poveča viskoznost primarne emulzije in posledično izboljša vgradnjo učinkovine (3). V našem poskusu se je z zvišanjem koncentracije polimera učinkovitost vgradnje heparina povečala le pri ND iz Resomera RG 502, izdelanih s stabilizatorjem PVA. Pri ND iz Resomera RG 502H in pri ND iz Eudragita pa

lahko na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da na vgradnjo heparina bolj kot koncentracija polimera vpliva njegov naboj.

4.4.3 Odvisnost učinkovitosti vgradnje heparina v nanodelce iz Eudragita od koncentracije heparina v disperziji

Zanimalo nas je, koliko heparina se zaradi elektrostatskih interakcij z Eudragitom adsorbira na ogrodje nanodelcev iz tega polimera pri različnih koncentracijah heparina v disperziji in kako to vpliva na učinkovitost vgradnje pri vgrajevanju heparina v nanodelce iz Eudragita z dvojno emulzijsko metodo.



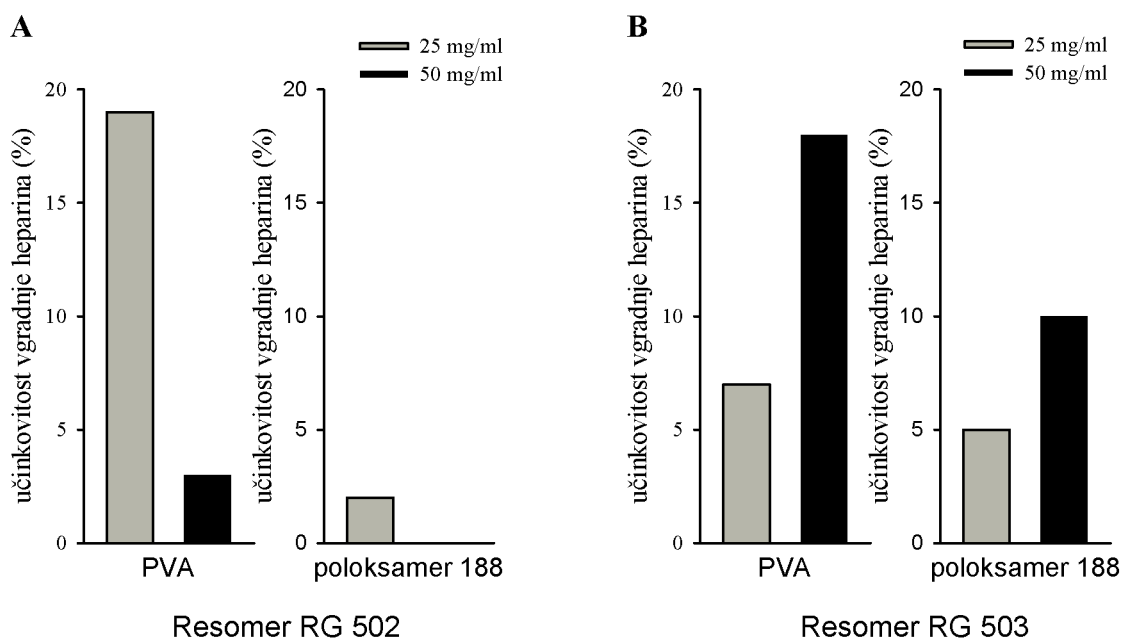
Slika 26: Adsorpcija heparina na polimerno ogrodje nanodelcev iz Eudragita, izdelanih s stabilizatorjem PVA (●) oz. s poloksamerom 188 (○), v odvisnosti od koncentracije heparina v disperziji.

Kot prikazuje slika 26, je adsorpcija heparina na polimerno ogrodje nanodelcev iz Eudragita naraščala z večanjem koncentracije heparina v disperziji. Pri koncentraciji heparina 0,0125 mg/ml se je na ogrodje ND iz Eudragita, izdelanih s stabilizatorjem PVA, adsorbiralo 53 % heparina, na ogrodje ND iz Eudragita, izdelanih s poloksamerom 188, pa 7 %. Pri koncentraciji 0,0250 mg/ml se je na ogrodje prvih ND adsorbiralo 73 % in na ogrodje drugih 58 % heparina, pri 0,0500 mg/ml pa 79 % in 83 %.

Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da se pri vgrajevanju heparina v ND iz Eudragita z dvojno emulzijsko metodo del heparina zaradi elektrostatskih interakcij adsorbira na polimerno ogrodje ND, kar poveča učinkovitost vgradnje heparina. Delež adsorbiranega heparina je večji pri višji koncentraciji heparina v disperziji, tako pri ND, izdelanih s stabilizatorjem PVA, kot tudi pri ND, izdelanih s poloksamerom 188.

4.4.4 Vpliv koncentracije heparina na njegovo učinkovitost vgradnje v nanodelce

Opazovali smo vpliv koncentracije raztopine heparina, ki smo jo vgrajevali, na učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce. Ti so bili izdelani iz dveh različnih polimerov (iz Resomera RG 502 ali Resomera RG 503) in s stabilizatorjem PVA oz. s poloksamerom 188.



Slika 27: Učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce iz Resomera RG 502 (A) in v nanodelce iz Resomera RG 503 (B), izdelane s stabilizatorjem PVA oz. s poloksamerom 188, pri vgrajevanju raztopine heparina s koncentracijo 25 in 50 mg/ml.

S slike 27 (A) je razvidno, da je bila učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce iz Resomera RG 502 pri nižji koncentraciji heparina v notranji vodni fazi večja. Za ND, izdelane s stabilizatorjem PVA, smo dobili pri koncentraciji heparina 25 mg/ml učinkovitost vgradnje 19 % in pri koncentraciji 50 mg/ml 3 %, za ND s poloksamerom pa

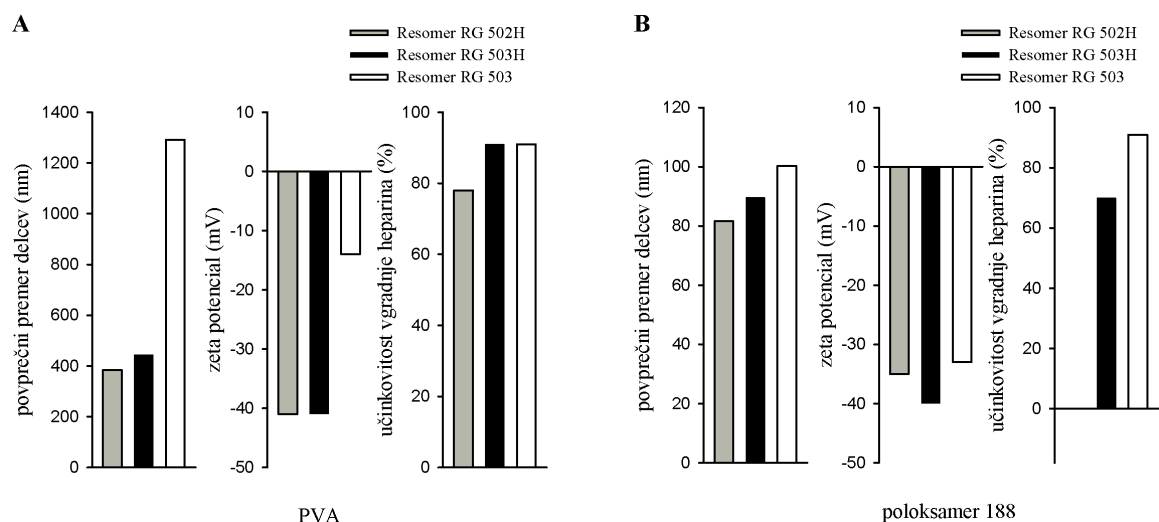
je bila pri nižji koncentraciji učinkovitost vgradnje 2 %, pri koncentraciji 50 mg/ml pa se heparin ni vgradil.

V nanodelce iz Resomera RG 503 (slika 27 (B)) se je več heparina vgradilo pri višji koncentraciji. Pri koncentraciji heparina 25 mg/ml smo določili učinkovitost vgradnje 7 % za ND s PVA in 5 % za ND s poloksamerom, pri koncentraciji 50 mg/ml pa je bila učinkovitost vgradnje heparina 18 % za ND s PVA in 10 % za ND s poloksamerom 188.

Z večanjem koncentracije heparina v notranji fazi dvojne emulzije narašča tudi razlika v osmotskem tlaku med notranjo in zunanjo vodno fazo, zato lahko pride do difuzije učinkovine skozi polimerni sloj in posledično do njenih izgub (34). To bi lahko bil razlog, da je pri višji koncentraciji heparina bila učinkovitost vgradnje v ND iz Resomera RG 502 slabša. Resomer RG 503 pa zaradi večje MM daje organski fazi v emulziji večjo viskoznost, zato učinkovina pri višji koncentraciji ne uhaja skozi polimerni sloj v tolikšni meri kot pri Resomeru RG 502. Naši rezultati kažejo, da lahko z zvišanjem koncentracije heparina (na 50 mg/ml) dosežemo večjo vgradnjo v ND iz tega polimera.

4.4.5 Vgradnja nanokompleksov heparina in hitosana v nanodelce

Preverili smo, kako vgrajevanje heparina v kompleksu s hitosanom vpliva na učinkovitost njegove vgradnje v nanodelce, izdelane iz treh različnih PLGA polimerov, s stabilizatorjem PVA oz. s poloksamerom 188. Disperzije nanodelcev smo fizikalno-kemijsko ovrednotili.



Slika 28: Povprečni premer delcev, zeta potencial in učinkovitost vgradnje heparina za nanodelce, izdelane iz polimerov Resomer RG 502H, Resomer RG 503H oz. Resomer RG 503 in s stabilizatorjem PVA (A) oz. poloksamer 188 (B).

Povprečni premer ND z vgrajenimi nanokompleksi je bil nekoliko večji od premera ND s heparinom iz enakih polimerov, izdelanih v prejšnjih poskusih, zeta potencial pa manj negativen (najbolj sta ta parametra odstopala pri ND iz Resomera RG 503, izdelanih s stabilizatorjem PVA). Učinkovitost vgradnje heparina v ND iz Resomerov je v kompleksu s hitosanom bila večja kot pri vgrajevanju prostega heparina (razen pri ND iz Resomera RG 502H, izdelanih s poloksamerom 188, kjer ni bilo vgradnje) (slika 28).

V kompleksu je hitosan s pozitivnim nabojem nevtraliziral negativni naboj heparinskih molekul (na to kaže tudi manj negativen zeta potencial ND z vgrajenimi nanokompleksi), zato med heparinom in polimeri s prosto (ionizirano) karboksilno skupino več ni bilo prisotnega odboja, kar je vplivalo na večjo vgradnjo heparina. Vezan heparin tudi zaradi velikosti kompleksa težje uhaja skozi polimerno plast, zato se je z vgrajevanjem heparina v kompleksu s hitosanom učinkovitost njegove vgradnje v nanodelce povečala.

5 SKLEP

V prvem delu diplomske naloge smo z dvojno emulzijsko metodo izdelali polimerne nanodelce brez učinkovine oz. prazne nanodelce. Kot stabilizator smo uporabili PVA oz. poloksamer 188. Pri praznih nanodelcih, izdelanih iz polimera PLGA (Resomera RG 502H) in s stabilizatorjem PVA, smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Koncentracija PVA v zunanji vodni fazi dvojne emulzije pomembno vpliva na velikost nastalih delcev, njihov PDI in zeta potencial. S povečevanjem koncentracije PVA se je velikost ND zmanjševala, a le do določene meje (do 5 % PVA). Pri 2 % PVA je bil njihov povprečni premer 636 nm, pri 5 % PVA pa 346 nm. Vrednost PDI je bila pri uporabi 1 % PVA visoka (0,53), pri višjih koncentracijah PVA (2 %, 5 % in 10 %) pa manjša od 0,3. Disperzije z 1 %, 2 % in 5 % PVA so imele ZP manjši od -30 mV. Z večanjem koncentracije PVA je absolutna vrednost zeta potenciala padala.
- Na velikost in PDI nanodelcev vpliva tudi čas sonikacije. Pri času sonikacije primarne in sekundarne emulzije 10 s + 15 s je bil povprečni premer ND 395 nm (PDI = 0,25), s podaljšanjem časa na 15 s + 30 s pa se je zmanjšal na 360 nm (PDI = 0,15). Vrednosti ZP so bile pri različnih časih sonikacije podobne.
- Koncentracija polimera vpliva predvsem na velikost nanodelcev. Pri koncentraciji PLGA 10 % je bil povprečni premer ND večji (448 nm) kot pri koncentraciji PLGA 5 % (342 nm), kar je lahko posledica večje viskoznosti organske faze pri višji koncentraciji polimera.
- Z uporabo 0,1 % vodne raztopine PVA oz. prečiščene vode kot dilucijske faze za odstranjevanje organskega topila dobimo nanodelce s primerljivimi fizikalnimi lastnostmi.
- Pri pogojih izdelave, ki smo jih izbrali kot optimalne (5 % vodna raztopina PVA, čas sonikacije 15 s + 30 s, 5 % raztopina PLGA v etilacetatu, dilucija z vodo) je ponovljivost postopka izdelave nanodelcev dobra. Izdelane disperzije ND imajo želene fizikalne lastnosti (majhen povprečni premer delcev, nizek PDI, visoko absolutno vrednost ZP) in so fizikalno stabilne vsaj 8 dni.

Ko smo za izdelavo praznih nanodelcev iz polimera PLGA (Resomera RG 502H) kot stabilizator uporabili poloksamer 188, smo prišli do sledečih zaključkov:

- Nanodelci, izdelani s stabilizatorjem poloksamer 188, so veliko manjši od ND, izdelanih s stabilizatorjem PVA, njihov PDI je višji, vrednost ZP pa primerljiva. Pri pogojih, ki smo jih izbrali kot optimalne pri izdelavi ND s PVA (zamenjali smo samo stabilizator), je bil njihov povprečni premer 94 nm, PDI 0,36, ZP pa -47 mV.
- S podaljšanjem časa sonikacije sekundarne emulzije smo dosegli še nekoliko manjšo velikost ND in nižji PDI. Pri času sonikacije 15 s + 40 s je bil njihov povprečni premer 81 nm, vrednost PDI pa 0,27.
- Koncentracija poloksamera v zunanji vodni fazi dvojne emulzije ima podoben vpliv na velikost delcev kot koncentracija stabilizatorja PVA. Z višanjem koncentracije poloksamera do 5 % se je velikost ND zmanjševala.
- Pri diluciji z 0,1 % raztopino poloksamera 188 in pri diluciji z vodo imajo nastali nanodelci primerljive fizikalne lastnosti.
- Za izdelavo ND s poloksamerom so se kot optimalni pogoji izkazali 5 % vodna raztopina poloksamera, čas sonikacije 15 s + 40 s, 5 % raztopina PLGA v etilacetatu in dilucija z vodo.

Pri praznih nanodelcih, izdelanih iz različnih polimerov, s stabilizatorjem PVA oz. s poloksamerom 188, smo ugotovili:

- Vrsta polimera vpliva na velikost in zeta potencial nanodelcev.
- Nanodelci iz akrilatnega polimera Eudragit RS PO imajo veliko manjši povprečni premer od ND iz PLGA polimerov (razlika je večja pri ND s PVA) in pozitivno vrednost ZP (> 30 mV).
- Molekulska masa in polarnost polimera PLGA vplivata na velikost delcev. ND iz Resomera RG 502 (PLGA z nižjo MM) so imeli manjši povprečni premer kot nanodelci iz Resomera RG 503, ND iz Resomera RG 502H s prostimi karboksilnimi skupinami pa so bili (pri uporabi stabilizatorja PVA) precej manjši od ND iz Resomera RG 502. Zeta potencial ND iz PLGA polimerov je bil negativen (< 30 mV).

V drugem delu diplomske naloge smo z dvojno emulzijsko metodo izdelali polimerne nanodelce s heparinom. Kot stabilizator smo uporabili PVA oz. poloksamer 188. Prišli smo do naslednjih ugotovitev:

- Heparinski nanodelci iz polimerov PLGA (Resomerov) so nekoliko manjši od praznih nanodelcev, heparinski ND iz Eudragita pa precej večji od praznih ND iz istega polimera.
- Zeta potencial nanodelcev s heparinom je nižji od ZP praznih nanodelcev iz istega polimera – pri ND iz Resomerov bolj negativen, pri ND iz Eudragita pa manj pozitiven.
- Učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce je odvisna od vrste polimera, iz katerega so izdelani, in tudi od uporabljenega stabilizatorja. Največjo učinkovitost vgradnje smo dosegli pri ND iz Eudragita (s PVA 89–97 % in s P188 77–83 %), pri ND iz polimerov PLGA pa je bila veliko manjša (s PVA do 18 % in s P188 do 10 %).
- Heparin se zaradi negativnega naboja tudi adsorbira na ogrodje ND iz pozitivno nabitega Eudragita, kar poveča učinkovitost vgradnje heparina. Delež adsorbiranega heparina je večji pri višji koncentraciji heparina v disperziji.
- Pri ND iz polimerov PLGA na učinkovitost vgradnje heparina vpliva polarnost polimera in njegova MM. Učinkovitost vgradnje je večja pri uporabi polimerov PLGA z zaestrenimi terminalnimi karboksilnimi skupinami in višjo MM.
- Koncentracija polimera (5–10 %) pri ND iz Resomera RG 502H in ND iz Eudragita RS PO ne vpliva na učinkovitost vgradnje heparina. Z zvišanjem koncentracije polimera (na 10 %) se je učinkovitost vgradnje povečala le pri ND iz Resomera RG 502, izdelanih s stabilizatorjem PVA.
- Koncentracija raztopine heparina, ki jo vgrajujemo, vpliva na učinkovitost vgradnje heparina v nanodelce. Pri višji koncentraciji heparina (50 mg/ml) je bila učinkovitost vgradnje v ND iz Resomera RG 502 manjša, v ND iz Resomera RG 503 (PLGA z višjo MM) pa večja kot pri koncentraciji 25 mg/ml.
- Z vgrajevanjem heparina v kompleksu s hitosanom se učinkovitost njegove vgradnje v nanodelce iz PLGA polimerov poveča.

Ficko Pristov M.: Fizikalno-kemijsko vrednotenje polimernih nanodelcev s heparinom, izdelanih z dvojno emulzijsko metodo. Diplomsko delo.

Zaključimo lahko, da je dvojna emulzijska metoda obetavna za izdelavo polimernih nanodelcev s heparinom, saj lahko z izbiro polimera in stabilizatorja ter pogojev izdelave v veliki meri vplivamo na fizikalne lastnosti nanodelcev in na vgradnjo heparina.

6 LITERATURA

1. Kristl J: Vpliv nanotehnologije na razvoj zdravil. *Farm Vestn* 2012; 63: 67–73.
2. Obermajer N, Kos J, Kristl J. Nanodelci: sodobni dostavni sistem za učinkovine in antigene celicam imunskega sistema. *Farm Vestn* 2007; 58: 39–44.
3. Hans M L, Lowman A M: Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2002; 6: 319–327.
4. Štrukelj B, Kos J. *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 210–247.
5. Delo, 14.9.2011, <http://www.delo.si/druzba/znanost/naravnost-v-tumor-in-varno-za-zdrave-celice.html>, dostopano: junij 2014
6. Soppimath K S, Aminabhavi T M, Kulkarni A R, Rudzinski W E: Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 2001; 70: 1–20.
7. Teskač Plajnšek K, Kocbek P, Erdani Kreft M, Kristl J: Mehanizmi vstopa nanodelcev v celice in njihov vpliv na dostavljanje učinkovin. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 225–35.
8. Vrignaud S, Benoit J P, Saulnier P: Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials* 2011; 32: 8593–8604.
9. Astete C E, Sabliov C M: Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J Biomater Sci Polym Ed* 2006; 17(3): 247–289.
10. Cegnar M, Kristl J: Dostavni sistemi nanometrskih velikosti za vnos proteinov in genov. *Med Razgl* 2005; 44: 447–462.
11. Gaumet M, Vargas A, Gurny R et al. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69: 1–9.
12. Malvern Instruments Ltd. Size theory. *Zetasizer Nano Series User Manual*. MAN0317; 2004: 13-1 do 13-6.
13. http://www.instrumat.ch/en/instruments/particle_sizing, Zetasizer Range, dostopano: julij 2014

14. Martin A. *Physical Pharmacy: Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*, 4th Edition, Lipincott Williams & Wilkins, USA, 1993: 387–388, 405–409.
15. Malvern Instruments Ltd. *Zeta Potential theory. Zetasizer Nano Series User Manual*. MAN0317; 2004: 15-1 do 15-11.
16. Makadia H K, Siegel S J: Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* 2011; 3: 1377–1397.
17. Kikelj D: Antitrombotična zdravila pri starostnikih. *Farm Vestn* 2005; 56: 78–82.
18. Rang H P, Dale M M, Ritter J M et al. *Rang and Dale's Pharmacology*, 6th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007: 331–345.
19. <http://de.wikipedia.org/wiki/Heparin>, dostopano: oktober 2014
20. <http://www.cbz.si> (Heparin Braun 5000 i.e./ml raztopina za injiciranje, SmPC); dostopano: oktober 2014
21. Skoog D A, Holler F J, Crouch S J: *Principles of Instrumental Analysis*, 6th Edition, Thomson Brooks/Cole, 2007: 336–399.
22. Skoog D A, West D M et al. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8th Edition, Thomson Brooks/Cole, 2004: 784–825.
23. Brown C W: Ultraviolet, visible, near-infrared spectrophotometers. V: Cazes J. Ewing's *Analytical Instrumentation Handbook*, 3rd Edition, Taylor & Francis Group, 2004: 127–139.
24. http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry, dostopano: december 2014
25. Harris D C: *Quantitative Chemical Analysis*, 8th Edition, W.H. Freeman & Co, USA, 2010: 394–406.
26. 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.
27. Klein M D, Drongowski R A, Linhardt R J, Langer R S: A colorimetric assay for chemical heparin in plasma. *Anal Biochem* 1982; 124: 59–64.
28. Yang V C, Fu Y Y, Teng C L C et al. A method for the quantitation of protamine in plasma. *Thromb Res* 1994; 74: 427–434.

29. Meng F T, Ma G H et al. W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *J Control Release* 2003; 91: 407–416.
30. Cegnar M, Kos J, Kristl J. Cystatin incorporated in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: development and fundamental studies on preservation of its activity. *Eur J Pharm Sci* 2004; 22: 357–364.
31. Blanco M D, Alonso M J: Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glicolide) nanospheres. *Eur J Pharm Biopharm* 1997; 43: 287–294.
32. Bilati U, Allemann E, Doelker E: Poly(D,L-lactide-co-glycolide) protein-loaded nanoparticles prepared by the double emulsion method - processing and formulation issues for enhanced entrapment efficiency. *J Microencapsul* 2005; 22(2): 205–214.
33. Jogala S, Rachamalla S S, Aukunuru J. Development of subcutaneous sustained release nanoparticles encapsulating low molecular weight heparin. *J Adv Pharm Technol Res* 2015; 6: 58–64.
34. Jiao Y Y, Ubrich N et al. Preparation and in vitro evaluation of heparin-loaded polymeric nanoparticles. *Drug Deliv* 2001; 8: 135–141.
35. http://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/USP32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_m66210.html, dostopano: junij 2015
36. <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit-products/sustained-release-formulations/rs-po/Pages/default.aspx>, dostopano: junij 2015
37. Mora-Huertas C E, Fessi H, Elaissari A: Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* 2010; 385: 113–142.
38. Cohen-Sela E, Chorny M: A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J Control Release* 2009; 133: 90–95.
39. Bilati U, Allemann E, Doelker E: Sonication parameters for the preparation of biodegradable nanocapsules of controlled size by the double emulsion method. *Pharm Dev Technol* 2003; 8: 1–9.
40. Lian L, Tang F et al. Therapeutic angiogenesis of PLGA-heparin nanoparticle in mouse ischemic limb. *J Nanomater* 2012; Vol 2012