

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MAJA MIKOLIČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MAJA MIKOLIČ

**IZDELAVA IN VREDNOTENJE POLOKSAMERNIH TERMOREVERZIBILNIH
HIDROGELOV Z NANOKOMPLEKSI HITOSANA IN
NIZKOMOLEKULARNEGA HEPARINA**

**FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF THERMOREVERSIBLE
POLOXAMER-BASED HYDROGELS WITH NANOCOMPLEXES BETWEEN
CHITOSAN AND LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN**

Ljubljana, 2015

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

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar za vso pomoč, usmeritve in napotke pri nastanku magistrske naloge. Zahvaliti se želim tudi dr. Maji Radivojša Matanović, ki mi je bila še predvsem pri ekperimentalnem delu magistrske naloge v izredno pomoč.

Posebna zahvala gre mojim staršem in sestri Veroniki za vso podporo, vzpodbudo in razumevanje tekom celotnega študija. Hvala tudi vsem mojim prijateljem, ki so mi ves ta čas stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Ljubljana, 2015

Maja Mikolič

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Darko Černe, mag. farm.

Član magistrske komisije: asist. dr. Nejc Horvat, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1 Nanodelci	1
1.2 Heparini.....	3
1.3 Hitosan	5
1.4 Nanokompleksi pridobljeni s polielektrolitnim kompleksiranjem.....	6
1.5 Hidrogeli.....	9
1.6 Polimeri	9
1.7 Vrednotenje	12
1.7.1 Povprečni premer delcev	12
1.7.2 Polidisperzni indeks	12
1.7.3 Zeta potencial.....	13
1.7.4 pH.....	14
1.7.5 UV-VIS spektroskopija.....	14
1.8 Subkutana aplikacija	15
2. NAMEN IN NAČRT DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI.....	17
3.2 NAPRAVE.....	18
3.3 METODE.....	18
3.3.1 Izdelava nanokompleksov LMWH in hitosana	18
3.3.1.1 Priprava raztopin LMWH	18
3.3.1.2 Priprava raztopin hitosana.....	19

3.3.1.3	Izdelava nanokompleksov.....	19
3.3.2	Priprava termoreverzibilnih hidrogelov	20
3.3.3	Vrednotenje disperzij nanokompleksov.....	21
3.3.3.1	Določitev povprečnega premera delcev in homogenosti disperzije	21
3.3.3.2	Določitev zeta potenciala delcev	21
3.3.3.3	Določitev pH vrednosti disperzij	22
3.3.3.4	Določitev učinkovitosti vgradnje LMWH	22
3.3.4	Vrednotenje termoreverzibilnih hidrogelov.....	23
3.3.4.1	Raztapljanje hidrogelov	23
3.3.4.2	Sproščanje LMWH iz hidrogelov	23
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	25
4.1	VREDNOTENJE NANOKOMPLEKSOV HITOSANA IN NIZKOMOLEKULARNEGA HEPARINA	25
4.1.1	Vpliv masnega razmerja LMWH/hitosan na velikost in PDI delcev.....	25
4.1.2	Vpliv masnega razmerja LMWH/hitosan na zeta potencial delcev.....	28
4.1.3	Vpliv masnega razmerja LMWH/hitosan na pH disperzije.....	29
4.1.4	Učinkovitost vgradnje LMWH v delce.....	30
4.1.5	Fizikalna stabilnost disperzij nanokompleksov v času shranjevanja.....	31
4.1.6	Fizikalne lastnosti delcev pri uporabljenem masnem razmerju LMWH/hitosan 1:1,375.....	32
4.1.7	Fizikalne lastnosti delcev pri uporabljenem masnem razmerju LMWH/hitosan 1:2,0.....	34
4.2	VREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV	36
4.2.1	Izbor disperzij za vgradnjo v termoreverzibilne hidrokele	36
4.2.2	Izbor sestave termoreverzibilnih hidrogelov	36
4.2.3	Priprava umeritvene krivulje	38
4.2.4	Sproščanje LMWH iz termoreverzibilnih hidrogelov	39

4.2.4.1	Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov na sproščanje LMWH ...	40
4.2.5	Raztapljanje termoreverzibilnih hidrogelov	42
4.2.5.1	Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov na njihovo raztapljanje ..	43
4.2.6	Odvisnost sproščanja LMWH od časa raztapljanja hidrogela	45
5.	SKLEP	47
6.	LITERATURA	49

KAZALO SLIK

Slika 1:	Primeri nanozdravil (prirejeno po viru 4).	1
Slika 2:	Ponavljajoče se disaharidne enote heparina (prirejeno po viru 12).	3
Slika 3:	Shematska predstavitev koagulacije (prirejeno po viru 15).	4
Slika 4:	Kemijska struktura hitosana; n=število sladkornih enot (22).	6
Slika 5:	Struktura poloksamera, a – etilen oksidni del, b – propilen oksidni del (31).	9
Slika 6:	Strukturna formula HPMC; n=število monomernih enot (prirejeno po viru 37). ..	11
Slika 7:	Prikaz zeta potenciala na primeru negativno nabitega delca (prirejeno po viru 44).	13
Slika 8:	Kemijska struktura barvila Azure A (52). Slika 9: Spremembe barve Azure A. ...	15
Slika 10:	Proces priprave termoreverzibilnih hidrogelov.	21
Slika 11:	Naprava Zetasizer Nano ZS.	22
Slika 12:	Graduirane epruvete v katerih smo določali hitrost raztapljanja in hitrost sproščanja LMWH iz hidrogelov. Temperaturo 37 °C smo vzdrževali s pomočjo vodne kopeli.	24
Slika 13:	Povprečni premer delcev (d) v odvisnosti od masnega razmerja LMWH/hitosan in končne koncentracije LMWH v disperziji.	27
Slika 14:	Polidisperzni indeks (PDI) v odvisnosti od masnega razmerja LMWH/hitosan in končne koncentracije LMWH v disperziji.	27
Slika 15:	Zeta potencial (ZP) v odvisnosti od masnega razmerja LMWH/hitosan in končne koncentracije LMWH v disperziji.	28
Slika 16:	pH v odvisnosti od masnega razmerja LMWH/hitosan in končne koncentracije LMWH v disperziji.	30
Slika 17:	Povprečni premer delcev v odvisnosti od časa shranjevanja	32

Slika 18: Zeta potencial v odvisnosti od časa shranjevanja	33
Slika 19: pH v odvisnosti od časa shranjevanja	33
Slika 20: Premer delcev v odvisnosti od časa shranjevanja	34
Slika 21: Zeta potencial v odvisnosti od časa shranjevanja	35
Slika 22: pH v odvisnosti od časa shranjevanja	35
Slika 23: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije LMWH.....	38
Slika 24: Odstotek sproščenega LMWH iz nanokompleksov z masnim razmerjem LMWH/hitosan 1:1,375, vgrajenih v formulacije različnih termoreverzibilnih hidrogelov, v odvisnosti od časa.....	41
Slika 25: Odstotek sproščenega LMWH iz nanokompleksov z masnim razmerjem LMWH/hitosan 1:2, vgrajenih v formulacije različnih termoreverzibilnih hidrogelov, v odvisnosti od časa.....	41
Slika 26: Odstotek sproščenega LMWH iz raztopine učinkovine, vgrajene v formulacije različnih termoreverzibilnih hidrogelov, v odvisnosti od časa.....	42
Slika 27: Raztapljanje formulacij termoreverzibilnih hidrogelov z nanokompleksi z masnim razmerjem LMWH/hitosan 1:1,375, v odvisnosti od časa.....	44
Slika 28: Raztapljanje formulacij termoreverzibilnih hidrogelov z nanokompleksi z masnim razmerjem LMWH/hitosan 1:2,0, v odvisnosti od časa.....	44
Slika 29: Raztapljanje formulacij termoreverzibilnih hidrogelov z raztopinami LMWH v koncentraciji 1,125 mg/ml, v odvisnosti od časa.....	45
Slika 30: Odstotek sproščenega LMWH iz hidrogelov z nanokompleksi v odvisnosti od odstotka raztopljenega hidrogela.....	46
Slika 31: Odstotek sproščenega LMWH iz hidrogelov z raztopino LMWH v odvisnosti od odstotka raztopljenega hidrogela.....	46

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Izračunane koncentracije LMWH potrebne za izdelavo.....	18
Preglednica II: Izračunane koncentracije hitosana za ustrezno disperzijo.....	19
Preglednica III: Masni deleži polimerov v posameznih formulacijah.....	20
Preglednica IV: Mase polimerov v posameznih formulacijah (masa vodne komponente znaša 10 g).....	20
Preglednica V: Redčenje vzorcev medija za sproščanje LMWH iz hidrogelov v posameznih časovnih točkah.....	24
Preglednica VI: Naboj funkcionalnih skupin heparina in hitosana pri različnih pH vrednostih.....	29
Preglednica VII: Učinkovitost vgradnje LMWH v nanokomplekse v odvisnosti od masnega razmerja LMWH/hitosan in končne koncentracije LMWH v disperziji.....	30
Preglednica VIII: Fizikalni parametri štirih izbranih disperzij, takoj po izdelavi.....	31
Preglednica IX: Sestava termoreverzibilnih hidrogelov z nanokompleksi LMWH in hitosana (ND1-ND3) in raztopinami LMWH (R1-R3).....	38

POVZETEK

Nizkomolekularni heparin (LMWH) je eden izmed antikoagulantov, ki se uporablja tako za profilakso, kot tudi za zdravljenje različnih tromboemboličnih dogodkov. Zaradi visoke varnosti je v zadnjem času zamenjal nefrakcionirani heparin. Vendar pa njegove lastnosti še vedno predstavljajo težave pri dostavi. Potrebno je pogosto subkutano (SC) apliciranje, kar lahko vodi v zmanjšano complianco bolnika. Potencialno primeren dostavni sistem, ki bi to težavo lahko zmanjšal, je termoreverzibilni hidrogel. V splošnem so hidrogeli premrežene strukture iz hidrofilnih polimerov, ki so široko uporabne zaradi biokompatibilnosti. Termoreverzibilni hidrogeli spadajo med inteligentne dostavne sisteme, saj so sposobni ob spremembi temperature spremeniti svoje lastnosti. To lahko s pridom uporabimo ob SC aplikaciji učinkovin, saj s primerno polimerno sestavo lahko dosežemo, da je dostavni sistem pred aplikacijo v sol stanju, pod kožo pa preide v gel in tako se *in vivo* tvori depo z zdravilno učinkovino (ZU). Na tak način se učinkovina sprošča počasneje, kar privede do možnosti manj pogostega apliciranja. Z namenom, da bi zagotovili podaljšano sproščanje LMWH, smo z metodo polielektrolitnega kompleksiranja izdelali hitosanske nanokomplekse z LMWH. Da bi našli optimalno masno razmerje, smo preizkusili trinajst masnih razmerij LMWH/hitosan v območju od 1:0,5 do 1:4,0. Končni koncentraciji učinkovine v disperzijah nanodelcev sta pri tem znašali 0,375 mg/ml in 1,125 mg/ml. Z napravama Zetasizer Nano ZS in pH metrom smo spremljali fizikalno-kemijske lastnosti nastalih nanodisperzij in sicer velikost, PDI, zeta potencial in vrednost pH. Ugotovili smo, da z uporabo masnih razmerij 1:1,375 in 1:2,0 v obeh koncentracijah dobimo nanodelce z najustrežnejšimi lastnostmi. Le-te nanodisperzije s koncentracijo ZU 1,125 mg/ml in raztopino LMWH v isti koncentraciji smo nato vgradili v 3 različne formulacije termoreverzibilnih hidrogelov. Osnovni polimer formulacij je predstavljal 18 % P407, ki sta mu bila v 1 % dodana še P188 in/ali HPMC. Izvedli smo *in vitro* poskus sproščanja in raztapljanja, pri čemer smo poskušali čim bolj posnemati fiziološke pogoje. Dosegli smo podaljšano sproščanje in ob tem potrdili pomembnost predhodnega kompleksiranja, saj je dodatek nanokompleksov sproščanje podaljšal tudi na 15 dni (8 dni več v primerjavi z raztopino), pri tem pa je bila hitrost sproščanja ves čas enakomerna. Iz rezultatov smo tako zaljučili, da so termoreverzibilni hidrogeli s hitosanskimi nanokompleksi potencialno primeren dostavni sistem za podaljšano sproščanje LMWH.

ABSTRACT

Low molecular weight heparin (LMWH) is one of the anticoagulants, which is used for both the prophylaxis and the treatment of various thromboembolic events. Due to LMWH safety, it recently replaced unfractionated heparin. However, its properties still present a problem in drug delivery. There is often a need for subcutaneous (SC) administration, which may lead to reduced drug compliance of patients. A potentially suitable delivery system, that can reduce this problem, is the delivery through thermoreversible hydrogel. In general, hydrogels are cross-linked structures of hydrophilic polymers, which are widely useful because of their biocompatibility. Thermoreversible hydrogels are one of the most intelligent delivery systems because they are able to change their properties if the temperature of their surroundings changes. We can take advantage of this by SC administering an active substance with an appropriate polymer design. The drug is administered SC in a sol state, it transforms into a gel under the skin and thus *in vivo* forms a depot of the active substance. In this way, the drug substance is released slowly, which leads to the possibility of less frequent administration. We produced chitosan nanocomplexes with LMWH using the method of polyelectrolyte complexation to ensure a sustained release of LMWH. In order to find the optimal weight ratio we tested thirteen different weight ratios of LMWH/chitosan in the range from 1:0.5 up to 1:4.0. The final concentrations of the active ingredient (API) in the dispersion of nanoparticles were 0.375 mg/ml and 1.125 mg/ml. We monitored the following physical-chemical properties of the resulting nanodispersions with the Zetasizer Nano ZS device and a pH meter: size, PDI, zeta potential and pH. We have found that with the use of the weight ratios of 1:1.375 and 1:2.0, we obtained the most suitable properties in both concentrations of nanoparticles. These nanodispersions (API concentration 1.125 mg/mL), and for comparison, a solution of LMWH in the same concentration, were incorporated in three different formulations of thermoreversible hydrogels. The basic polymer formulations was 18 % P407, to which we added 1 % of P188 and/or HPMC. We performed an *in vitro* dissolution test, whereby we tried to imitate the physiological conditions as precisely as possible. We have reached an extended release and thereby confirmed the importance of complexation. The addition of nanocomplexes extended the release to 15 days (8 days more in comparison with the solution), while the rate of release remain the same. We concluded the thermoreversible hydrogels with chitosan nanocomplexes are a potentially suitable delivery system for the prolonged release of LMWH.

Ključne besede/keywords: Termoreverzibilni hidrogeli/thermoreversible hydrogels, nizkomolekularni heparin/low molecular weight heparin, hitosanski nanokompleksi/chitosan nanocomplexes, podaljšano sproščanje/prolonged release, subkutana aplikacija/subcutaneous drug delivery.

SEZNAM OKRAJŠAV

BU	biološka uporabnost
CMC	<i>angl. Critical Micelle Concentration;</i> kritična micelarna koncentracija
DIK	diseminirana intravaskularna koagulacija
DLS	dinamično sipanje laserske svetlobe
FDA	<i>angl. Food and Drug Administration;</i> ameriška zvezna agencija za hrano in zdravila
GRAS	<i>angl. Generally Recognized As Safe;</i> splošno priznано kot varno
HPMC	hidroksipropilmetilceluloza
IM	intramuskularna aplikacija
IV	intravenska aplikacija
LD₅₀	srednji letalni odmerek
LMWH	<i>angl. Low Molecular Weight Heparin;</i> nizkomolekularni heparin
ND	nanodelci
NS	nanodostavni sistem
P188	Poloksamer 188
P407	Poloksamer 407
PAS	površinsko aktivna snov
PBS	fosfatni pufer
PCS	<i>angl. Photon Correlation Spectroscopy;</i> fotonska korelacijska spektroskopija
PDI	polidisperzni indeks
PEK	polielektrolitni kompleks
PEO	Polioksietilen
PPO	Polioksiopipilen
SC	subkutana aplikacija
USP	<i>angl. United States Pharmacopoeia;</i> ameriška farmakopeja
ZP	zeta potencial
ZU	zdravilna učinkovina

1. UVOD

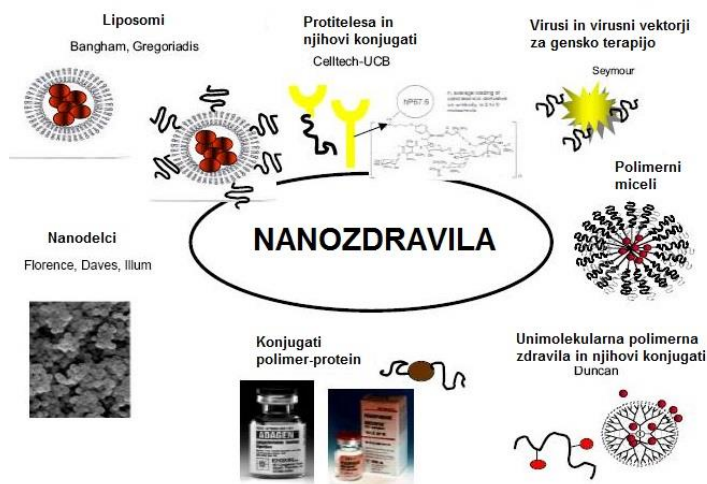
1.1 Nanodelci

Nanotehnologija predstavlja znanost in inženiring v nanometrskem velikostnem razredu (1). Nanodelci (ND) so skupki materiala, ki merijo manj kot 100 nm v vsaj eni dimenziji (2). Strokovni viri k ND, namenjenim za dostavo učinkovin, kljub vsemu prištevajo tudi delce, katerih velikost ne presega 1 μm (1). Zaradi svoje majhnosti ND izkazujejo drugačne lastnosti v primerjavi z delci večjih velikostnih razredov. Imajo povečano razmerje med površino in volumnom, odstotek atomov na površini se z zmanjševanjem delca drastično povečuje, s tem pa narašča njihova kemijska reaktivnost. Tako imajo tudi delci iz manj reaktivnih materialov veliko tendenco po združevanju v večje strukture (2).

Nanotehnologijo delimo na več podskupin. Uporaba nanotehnologije z namenom, da diagnosticiramo, zdravimo in preprečujemo bolezni, se imenuje nanomedicina (3). Ta pojem tako vključuje vse, od izboljšanja stabilnosti, topnosti zdravilnih učinkovin, ciljane dostave do *in vivo* diagnosticiranja (1).

Za dostavo zdravilnih učinkovin (ZU) lahko uporabimo različne vrste nanostruktur, ki se med seboj razlikujejo po zgradbi. Ločimo:

- polimerne nanodelce,
- liposome,
- lipoproteine,
- polimerne micelle,
- nanovlakna,
- dendrimere,
- kvantne pike,
- ogljikove nanocevke.



Slika 1: Primeri nanozdravil (prirejeno po viru 4).

Nekateri primeri nanozdravil so predstavljeni na *sliki 1*.

Zanimanje za ND kot dostavne sisteme ZU se je v zadnjih letih močno povečalo, kar seveda ni naključje, saj imajo kar nekaj prednosti:

- zaščitijo učinkovino pred prezgodnjo razgradnjo,
- nadzorovano sproščajo učinkovino,
- izboljšajo biološko uporabnost (BU) učinkovin,
- ciljano dostavijo učinkovino,
- izboljšajo topnost učinkovine,
- zmanjšajo toksične vplive učinkovin,
- omogočajo uporabo nižjih odmerkov za enak terapevtski učinek, v primerjavi z večjimi delci,
- podaljšajo razpolovni čas ZU in posledično je potrebno manjše število odmerkov,
- primerni so za različno apliciranje ZU (1, 3, 5).

Izmed nanodostavnih sistemov (NS) so najbolj raziskani in najpogosteje uporabljeni polimerni nanodelci. Merijo od 10 nm do 1 μ m. Po sestavi in funkciji se med seboj razlikujejo. Pripravljeni so lahko iz sinteznih ali naravnih polimerov. Zgrajeni so iz nosilnega ogrodja, v katerem je učinkovina raztopljena ali dispergirana, učinkovino pa lahko vežemo tudi na površino z adsorpcijo ali s kovalentnimi vezmi (1, 3, 6). Učinkovina se nadzorovano sprošča z mehanizmom površinske erozije polimernega matriksa ali z difuzijo skozi matriks (1).

Izdelava ND je odvisna tako od polimera oz. nosilnega sistema kot od ZU. Izdelavo lahko glede na nosilni sistem razdelimo v več skupin:

- Prečno premreževanje makromolekul poteka tako, da z vročo denaturacijo ali kemičnim premreževanjem povzročimo agregacijo oz. obarjanje naravnih spojin.
- Kemično lahko sintetiziramo polimerno ogrodje med samo izdelavo ND s polimerizacijo monomernih enot.
- Predhodno sintetiziran polimer lahko oborimo in sicer tako, da ga najprej raztopimo v določenem topilu, temu pa sledi dispergiranje v zunanjo fazo. To lahko naredimo s sušenjem z razprševanjem, s koacervacijo ali ločitvijo faz, nanoprecipitacijo in emulzijskimi metodami (7).

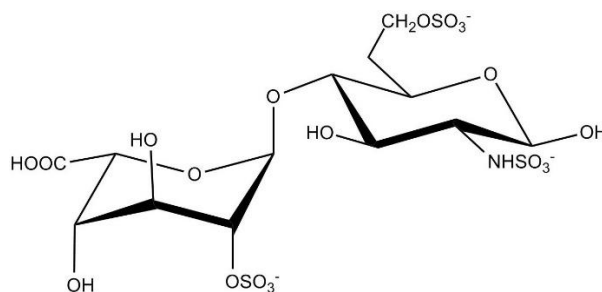
1.2 Heparini

Antikoagulanti

Antikoagulanti so ena izmed skupin antitrombotičnih učinkovin. Le-te se uporabljajo za zdravljenje in preprečevanje tromboemboličnih dogodkov. Mehanizem preprečitve strjevanja krvi antikoagulantov temelji na preprečitvi pretvorbe fibrinogena v fibrin. Delimo jih na indirektno antikoagulate, ki delujejo tako, da zavirajo biosintezo koagulacijskih faktorjev. Druga skupina pa so antikoagulanti, ki zavirajo encimsko delovanje koagulacijskih faktorjev in jih zato imenujemo direktni antikoagulanti (8, 9).

Heparini

Heparini so družina naravnih polisaharidov, shranjenih v sekrecijskih veziklih mastocitov, skupaj s histaminom. Molekulo heparina sestavljajo ponavljajoče se disaharidne enote D-glukozamina in uronske kisline (*slika 2*). Aminske skupine D-glukozamina so sulfatirane ali acetilirane ter tako zaslužne za negativen naboj molekule in njene izrazito kisle lastnosti (10). Imajo tri vrste kislih funkcionalnih skupin: sulfatne in sulfamidne skupine (pKa vrednost od 0,5 do 1,5) ter karboksilne skupine (pKa vrednost med 2 in 4) (11).



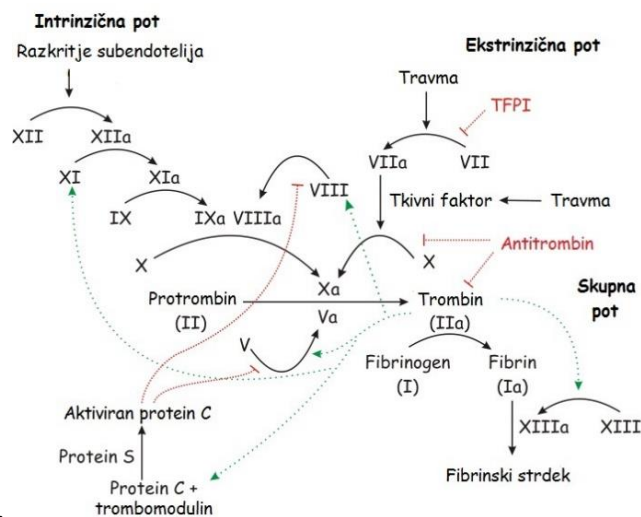
Slika 2: Ponavljajoče se disaharidne enote heparina (prirejeno po viru 12).

Delimo jih na nefrakcionirane heparine z molekulsko maso od 4 do 40 kDa in na nizkomolekularne heparine (LMWH), s povprečno molekulsko maso okrog 5 kDa (13).

Proces strjevanja krvi poteka preko koagulacijske kaskade (*slika 3*). Na začetku ločeno po ekstrinzični in intrinzični poti, združitev obeh poti se zgodi ob pretvorbi proencima X v aktivno obliko, v faktor Xa. Le-ta je skupaj s kofaktorjem, Ca^{2+} in fosfolipidi zaslužen za nadaljnji proces, kjer s proteolizo iz protrombina nastane trombin.

Heparini so predstavniki direktnih antikoagulantov, saj inhibirajo koagulacijo tako, da aktivirajo enega najpomembnejših inhibitorjev - antitrombin III. Heparin se s svojo pentasaharidno sekvenco veže na antitrombin III, sprememba konformacije poveča afiniteto

do trombina in tako posledično pride do inhibicije trombina ter drugih serinskih proteaz. Trombin je veliko bolj občutljiv na inhibitorne učinke kompleksa heparin-antitrombin III kot faktor Xa. Ker pa so molekule LMWH manjše, se kompleks z antitrombinom III in trombinom težje tvori in tako je zaviralni učinek omejen predvsem na faktor Xa (9, 14).



Slika 3: Shematska predstavitev koagulacije (prirejeno po viru 15).

Obe obliki heparinov se v nizkih odmerkih uporabljata za primarno profilakso in za zdravljenje venske tromboze ter akutnega miokardnega infarkta (14).

Heparini se ne absorbirajo iz GIT, saj imajo veliko molekularno maso in so negativno nabiti. Primerni aplikaciji sta tako IV ali SC, IM ga ne moremo dajati, saj bi povzročili nastanek hematoma. Po IV aplikaciji je učinek takojšen, pri aplikaciji pod kožo pa šele čez 1 h. Razpolovni čas obsega 40 do 90 min. Če damo pacientu IV injekcijo, se učinkovina veže na endotelij, dokler se proces ne zasiti in do takrat se bo koncentracija v obtoku hitro zniževala. V nadaljevanju pa renalna ekskrecija povzroči počasnejše upadanje in posledično podaljšanje razpolovnega časa.

LMWH imajo v primerjavi z nefrakcioniranimi heparini kar nekaj prednosti. So bolj varni in preprosti za uporabo, pacienti si jih lahko SC aplicirajo sami. Imajo daljši razpolovni čas, ki je neodvisen od odmerka, saj proces poteka po kinetiki I. reda. To omogoča manj pogosto odmerjanje (1-2-krat dnevno) in bolj predvidljive učinke. LMWH tudi ne podaljšajo aktivnega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ). Stalno spremljanje zaradi predvidljivega učinka standardnega odmerka tako ni potrebno. Izločanje poteka v večji meri preko ledvic, zato so pri hudi ledvični odpovedi kontraindicirani (14).

LMWH so zadnja leta zamenjali nefrakcionirani heparin, saj se poleg daljšega razpolovnega časa, manj pogosto pojavljajo tudi krvavitve (16). Predstavljajo pa tudi najbolj varen klinično uporabljen antikoagulant za zdravljenje različnih vaskularnih bolezni (17).

Neželeni učinki

Glavno tveganje ob zdravljenju s heparini je nastanek krvavitev. V tem primeru moramo terapijo takoj prekiniti in IV aplicirati močno bazičen antagonist heparina - protamin sulfat. Tromboza je sicer redek, a hud neželen učinek. Povezan je s heparin-inducirano trombocitopenijo, ki nastane zaradi IgG ali IgM proti kompleksom heparina in trombocitnega faktorja 4. Vezava imunskih kompleksov na Fc receptorje na trombocitih, povzroči aktivacijo trombocitov in sproščanje trombocitnega faktorja 4, kar posledično vodi v trombocitopenijo. Protitelesa se vežejo tudi na kompleks med trombocitnim faktorjem in glikozaminoglikani na endotelnih celicah, to poškoduje endotelij in sproži trombozo ter diseminirano intravaskularno koagulacijo (DIK). Aktivacija trombocitov je redkejša ob uporabi LMWH, le-ta se slabše veže na trombocitni faktor 4, zato je tudi verjetnost za nastanek trombocitopenije in posledično tromboze ter DIK manjša.

Ob dolgotrajnem zdravljenju, več kot šestmesečni terapiji, lahko pride tudi do nastanka osteoporoze s spontanimi zlomi. Mehanizem, ki do tega privede ni znan. Tveganje je povečano med nosečnostjo, saj je takrat varfarin kontraindiciran.

Pojavi se lahko tudi hipoaldosteranizem s hiperkaliemijo. Tudi ta neželen učinek je sicer redek, se pa tveganje za pojav povečuje s časom terapije, tako da je po več kot tedenski terapiji priporočljivo spremljanje plazemskih koncentracij kalija.

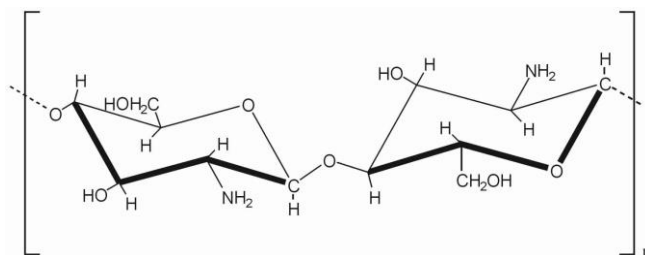
Možne so tudi preobčutljivostne reakcije, vendar se le-te redko pojavijo (9, 14).

1.3 Hitosan

Hitosan je naravni polimer, ki ga sestavljajo enote $\beta(1,4)$ glukozamina in N-acetil glukozamina (*slika 4*). Pridobivajo ga z delnim deacetiliranjem hitina, ki je sestavni del ogrodja rakov, insektov in celičnih sten gliv. Hitin predstavlja drugi najbolj zastopan polisaharid v naravi, takoj za celulozo. Družino hitosanov sestavljajo polimeri, ki se med seboj razlikujejo v molekularni masi (50 kDa–2000 kDa), v stopnji deacetilacije (40–98 %) in v viskoznosti disperzije. Njihova kristalinična zgradba je rigidna, kar je posledica inter- in intra-molekularnih vodikovih vezi (18). Imajo lastnosti šibkih baz s pKa od 6,2–7,0 (19, 20, 21). Pozitiven naboj amino skupin omogoča, da se hitosan poveže z negativno nabitimi

snovmi. Samo število pozitivno nabitih skupin je odvisno predvsem od stopnje deacetilacije, posledično pa tako vplivamo na topnost hitosana. Hitosan s 40 % stopnjo deacetilacije je topen tudi do pH 9, z zviševanjem stopnje deacetilacije pa se pH medija, kjer se polimer topi, strmo znižuje do 6,5. V splošnem se najboljšje topi v kislinskih raztopinah pod pH 6,5, pri čemer je večina amino skupin protoniranih, slabo topnost pa izkazuje v alkalnih in nevtralnih medijih. S pomočjo modifikacij je raziskovalcem uspelo pripraviti derivate, ki imajo povečano topnost (17). Tvorba soli z organskimi in anorganskimi solmi mu omogoča topnost tudi v vodi (19, 20).

Ključni lastnosti hitosana, ki omogočata vpliv na viskoznost disperzij sta molekulska masa in nerazvejanost molekul, razporejenih v prožno verigo. Viskoznost lahko povečamo tako, da znižamo temperaturo, zvišamo koncentracijo polimera ali zvečamo stopnjo deacetiliranja. Hitosan ima majhno peroralno toksičnost. Toksičnost je poleg stopnje deacetiliranja in molekulske mase odvisna tudi od čistote hitosana ter njegove aplikacije. Zaradi izražene biokompatibilnosti in biorazgradljivosti je primeren in pogosto uporabljen polimer v dostavnih sistemih, ki pa s pridom izkoriščajo tudi njegove dobre bioadhezivne lastnosti. Služi kot odličen biomaterial za dostavo več vrst makromolekul, tako proteinov, DNA, diagnostičnih agentov in različnih ZU. Zaradi pozitivnega naboja tvori močne interakcije z anionskimi biomakromolekulami in jih brez toksičnih učinkov na epitelij dostavi v centralni krvni obtok (17, 19, 20).



Slika 4: Kemijska struktura hitosana; n =število sladkornih enot (22).

1.4 Nanokompleksi pridobljeni s polielektrolitnim kompleksiranjem

Komplekse v nanovelikostnem redu lahko tvorimo na različne načine. Ena izmed možnosti je spontano združevanje oz. polielektrolitno kompleksiranje ob mešanju nasprotno nabitih polielektrolitov. Pri tem nastanejo kompleksi, kjer močne, a reverzibilne elektrostatske interakcije med seboj povežejo nasprotno nabite funkcionalne skupine. Nastanek in lastnosti kompleksov so odvisne od veliko različnih dejavnikov. Pomembno vlogo igrajo narava in

lokacija ioniziranih skupin, gostota in koncentracija naboja, delež prisotnih nasprotnih nabojev, masno razmerje polielektrolitov, molekulska masa makromolekul, kot tudi temperatura, pH ter ionska moč reakcijskega medija (11, 23). Deleži uporabljenih polielektrolitov se razlikujejo, ob upoštevanju stehiometričnega razmerja pride do tvorbe kompleksov, pri katerih znaša neto naboj 0. Ti kompleksi so ponavadi netopni in nagnjeni k precipitaciji po tvorbi. Če stehiometričnega razmerja ne upoštevamo, potem po mešanju prevladuje eden od nabojev, kar ponavadi vodi v tvorbo topnih kompleksov (11). Polielektrolitni kompleksi (PEC) imajo pomembno vlogo v primerih, ko nabite molekule (proteini, polisaharidi in celice) prihajajo v stik s telesnimi tekočinami in tkivi. Pomembni so pri genski terapiji, za dostavo drugih makromolekularnih učinkovin. Umetni polielektrolitni sistemi bioaktivnih komponent, kot so ZU in geni, interagirajo z različnimi nasprotno nabitimi molekulami, prisotnimi v telesnih tekočinah, kar lahko vodi v celično agregacijo ali hemolizo. Zato je potrebno posebno pozornost nameniti zagotovitvi stabilnosti nanokompleksov. Pomemben vpliv na le-to imajo moč polielektrolita, molekulska masa, pH in ionska moč medija (23).

Hitosan in heparin imata sposobnost tvorbe polielektrolitnih kompleksov preko elektrostatskih interakcij med pozitivno nabitimi $-\text{NH}_3^+$ skupinami hitosana in negativno nabitimi $-\text{COO}^-$ in $-\text{SO}_3^-$ skupinami heparina. Območje, ki omogoča nastanek nanokompleksov je med pKa heparina, ki znaša 3,1 in pKa hitosana, ki ima vrednost 6,5. Nad tem pH-jem je sistem nestabilen, nagnjen k precipitaciji (11, 24).

V študiji, ki so jo izvedli Sun in sodelavci, so s polielektrolitnim kompleksiranjem tvorili nanokomplekse med različnimi derivati hitosana in nizkomolekularnim heparinom, enoksaparinom. Ugotovili so, da stabilni PEC nastanejo v pH območju od 3,0 do 6,5. Delci so imeli premer v območju 200-500 nm, sferično obliko, učinkovitost vgradnje učinkovine pa je znašala približno 90 % (24).

V drugi študiji so preverjali optimalno masno razmerje med hitosanom in heparinom. Ugotovili so, da se delci nanometrskih velikosti tvorijo pri uporabljenih razmerjih 3,0:1,0, 4,5:1,0, 6,0:1,0; medtem ko je pri razmerju 1,5:1,0 prišlo do precipitacije. Povprečna velikost delcev je znašala 130-300 nm, vrednosti zeta potenciala (razlaga v poglavju 1.7.3) pa so se gibale v območju 25-35 mV. Za optimalno masno razmerje so izbrali razmerje hitosan/heparin 3,0:1,0, saj so bili delci takrat najmanjši z ustreznostjo zeta potenciala. Za tvorbo PEC preko elektrostatskih interakcij so ugotovili, da je potreben pH med 4,5 in 6,5. Pri pH 1,2-2,5 je prišlo do protonacije nekaterih $-\text{COO}^-$ skupin heparina, kar

vodi v šibkejše elektrostatske interakcije, ob povišanju pH na 7,0 pa je hitosan deprotoniran, nanodelci so postali nestabilni in tako razpadli (11).

Na velikost nastalih delcev odločilno vpliva izbor hitosana oz. njegova molekulska masa. Tako se je ob uporabi hitosana z molekulsko maso 10 kDa namesto 400 kDa velikost kompleksov zmanjšala iz 600 nm na 200 nm. Velikost delcev se je zmanjšala tudi ob uporabi modificiranega hitosana v primerjavi z nemodificiranim iste molekulske mase. To lahko pripišemo močnejšim ionskim interakcijam med hitosanom in enoksaparinom, saj ima polimer močnejši pozitiven naboj. Sulfatirani hitosan je tvoril večje komplekse, saj se je gostota naboja zaradi dodatne aminske substitucije na polimernih verigah zmanjšala. Proste aminske skupine so bile zaslužne za izmerjen pozitiven zeta potencial. Ugotovili so, da modificiranje vodi v spremembe gostote naboja, in tako se tudi vrednosti zeta potenciala razlikujejo, najvišji je pri N-trimetil hitosanu (TMC), sledi PEG-TMC, nato nemodificiran hitosan in najnižje vrednosti so pri hitosanu, ki je bil obdelan s cisteinom. Ugotovili so, da se tvorijo PEC sferične oblike, ki so ločeni med seboj, kar kaže na to, da so stabilizirani. Kinetično proces aglomeracije poteče odvisno od aktivacijske energije. Možna je tako elektrostatska, kot tudi sterična stabilizacija. Ugotovili so, da lahko v tem primeru sterična stabilizacija hitosanskih verig na površju kompleksa signifikantno poveča stabilnost in prepreči agregacijo, tudi ko je zeta potencial nižji od 10 mV (25).

Stehiometrično razmerje enoksaparin/hitosan tudi odločilno vpliva na velikost nastalih PEC. Ugotovili so, da se ob konstantnem povečevanju deleža učinkovine delci zmanjšujejo. Začetni, nižji deleži enoksaparina sicer dajejo večje delce, razlaga tega pa temelji na predpostavki, da se ena molekula učinkovine poveže z več molekulami polimera. Nato se do kritične točke (dosežena pri razmerju enoksaparin/hitosan 1:2) tvori večje število delcev, leti so manjši in z bolj definirano strukturo. Tej točki pa sledi proces fizikalne nestabilnosti – flokulacija, pride do združevanja delcev v večje strukture (24).

Na velikost delcev občutno vpliva tudi uporabljena koncentracija polimera. Ugotovili so, da uporaba višje koncentracije polimera vodi v nastanek večjih delcev. Če je ob tem masno razmerje enoksaparin/hitosan konstantno, razlog za ta pojav najverjetneje temelji na povečanju števila nastalih kompleksov, kar posledično poveča tudi tendenco k nestabilnosti (24). Vendar pa se ob uporabi visokih koncentracij, tako polimera kot heparina pojavi močno povečanje delcev, nagnjenost k precipitaciji je tako zelo velika (24, 26).

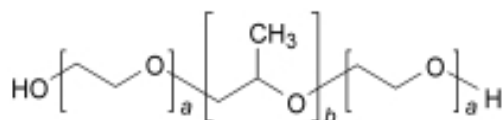
1.5 Hidrogeli

Hidrogele sestavlja mreža hidrofilnih polimerov, ki tvorijo netopno trodimenzionalno strukturo. Imajo sposobnost absorpcije vode od 10-20 % pa vse do 1000-kratne količine glede na njihovo suho maso. Razdelitev hidrogelov na dve vrsti temelji na interakcijah, ki delujejo med polimernimi enotami. Tako imenujemo reverzibilne oz. fizikalne tiste gele, pri katerih so povezave posledica šibkih Van der Waalsovih, vodikovih ali hidrofobnih interakcij. Druga vrsta so ireverzibilni ali kemijski geli, kjer pa so vezi kovalentne narave. Obojim je skupno, da je njihova struktura nehomogena. Vsebujejo področja, ki so manj zamrežena in tako, zaradi večje možnosti tvorbe interakcij med polarnimi skupinami in vodo, močnejše nabrekajo v primerjavi z bolj zamreženimi deli (27, 28). Za tvorbo hidrogelov lahko uporabimo tako sintezne kot naravne polimere, možna pa je tudi kombinacija obojih (27).

Lastnost, ki je ključna za široko uporabo hidrogelov je biokompatibilnost. Vsebujejo visok delež vode, imajo mehko in prožno strukturo, vse to jih dela podobne tkivom. Zmanjšano je tudi tveganje, da bi jih telo zaznalo kot tujek. Medfazna napetost med hidrogelom in biološko tekočino je nizka, možnost adsorpcije proteinov in proces zavrnitve sta tako manj verjetna. Uvrščamo jih med t.i. inteligentne dostavne sisteme, ki ob določenem dražljaju ustrezno spremenijo svoje lastnosti in kontrolirano sprostijo zdravilno učinkovino iz matriksa. Dražljaji, ki povzročijo spremembe so: pH, temperatura, električno in magnetno polje, svetloba ter endogene molekule (28).

1.6 Polimeri

Ena izmed družin netoksičnih sintetičnih polimerov so poloksameri. Po sestavi so kopolimeri polioksietilena (PEO) in polioksipropilena (PPO), kot lahko vidimo na *sliki 5*. Pridobivajo jih s polimerizacijo mononernih enot etilen oksida in propilen oksida v prisotnosti natrijevega ali kalijevega hidroksida (29, 30).



Slika 5: Struktura poloksamera, a – etilen oksidni del, b – propilen oksidni del (31).

Poloksameri imajo amfifilen značaj, saj PEO izkazuje hidrofilne lastnosti, PPO pa hidrofobne. S spreminjanjem deleža monomernih enot tako vplivamo na velikost polimera in njegove hidrofilno-lipofilne lastnosti (30).

V splošnem so poloksameri v obliki belih, voskastih in sipkih granul brez vonja in okusa (32, 33). Vodne raztopine poloksamerov tvorijo termoreverzibilen gel. Pri nižjih temperaturah so v tekočem oz. sol stanju, pri fizioloških temperaturah pa preidejo v gel stanje (29). V nižjih koncentracijah se združujejo v monomolekularne micide, v višjih koncentracijah pa oblikujejo večmolekularne agregate. PPO verige se formirajo v centralno hidrofobno jedro, pri čemer se metilne skupine povežejo z Van der Waalsovimi vezmi s snovjo med potekajočim raztapljanjem. Raztapljanje je posledica tvorbe vodikovih vezi med atomi kisika hidrofilnih PEO verig z molekulami vode (33, 34). Do tvorbe micelov v razrečenih raztopinah kopolimerov pride po presegu kritične micelarne koncentracije (CMC, *angl. Critical Micelle Concentration*), do takrat pa se površinsko aktivne snovi (PAS) porazdeljujejo na mejnih površinah. Vodne raztopine so stabilne v prisotnosti kislin, baz in kovinskih ionov (33).

Poloksamer 407 PEO₁₀₁ - PPO₅₆ - PEO₁₀₁

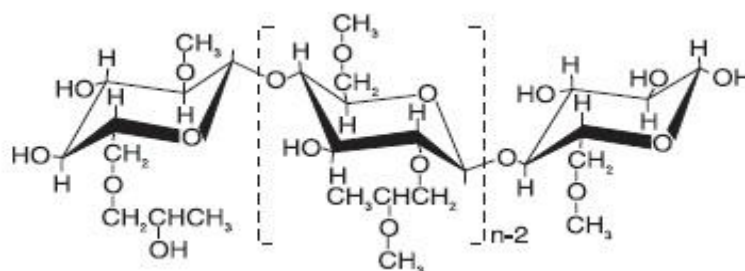
Poloksamer 407 (P407) je neionska PAS, ki tvori hidrogel. Njegova molekulska masa znaša od 9840 do 14600 g/mol. Število enot PEO se giblje od 95 do 105, PPO pa od 54 do 60, kar posledično pomeni večje hidrofilne lastnosti (30, 33). Ima dobro kapaciteto solubilizacije in nizko toksičnost, zato je primeren vehikel za dostavo ZU. Omogočena je tvorba različnih formulacij. Primeren je tako za peroralno, topikalno, intranazalno, vaginalno, rektalno, okularno kot tudi parenteralno aplikacijo (33). Boljšo topnost izkazuje v topilu nižje temperature, saj je takrat povečana solvatacija in tvorba vodikovih vezi. Vodne raztopine 20-30 m/m % polimera so v sol stanju pri temperaturi 4-5°C, pri sobni temperaturi pa tvorijo gel, ki je ob ponovnem ohlajanju reverzibilen (33).

Poloksamer 188 PEO₈₀ - PPO₂₇ - PEO₈₀

Poloksamer 188 (P188) je tako kot P407 neionski amfifilen polimer z molekulska maso med 7680 in 9510 g/mol. Število enot PEO se giblje v območju od 75 do 85, število prisotnih PPO enot pa znaša med 25 in 30. Srednji letalni odmerek (LD₅₀) je 9380 mg/kg, kar pomeni nizko toksičnost (34, 35).

Hidroksipropilmetilceluloza

Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) je zelo pogosto uporabljen celulozni derivat za tvorbo dostavnih sistemov, ki nabrekajo in omogočajo prirejeno sproščanje učinkovin. Uvrščamo jo med neionske celulozne etre, kot lahko vidimo na *sliki 6*, ima hidroksilne skupine osnovne verige substituirane z metilnimi in hidroksipropilnimi skupinami (36).



Slika 6: Strukturna formula HPMC; n = število monomernih enot (prirejeno po viru 37).

USP (angl. *United States Pharmacopoeia*) ločuje 4 tipe HPMC, pomen oznak pa lahko razložimo na tipu, ki smo ga uporabljali - HPMC 2208. Iz prvega dela oznake razberemo odstotek prisotne metilne substitucije (22 %), drugi del pa nam pove odstotek prisotne hidroksipropilne skupine (8 %) (36, 38). Različni deleži prisotne substitucije dajejo polimere z različnimi lastnostmi, tako se HPMC med seboj razlikujejo v topnosti v organskih topilih in temperaturi steklastega prehoda. Z namenom zagotovitve želenih lastnosti polimerov v proizvodnji prilagajajo tudi stopnjo polimerizacije, za produkte, ki omogočajo kontrolirano sproščanje se le-ta ponavadi giblje v območju 100-1500. HPMC je hidrofilen polimer, v hladni vodi se dobro raztaplja in pri tem daje koloidno raztopino. V vroči vodi pa je praktično netopen (39).

Zaradi hidratacije polimernih verig se ob stiku z vodo oz. telesno tekočino spremeni viskoznost polimerne raztopine. To je v večji meri posledica vodikovih vezi med kisikovimi atomi v etrskih vezeh in molekulami vode. To vodi do raztegnitve verig, tvorbe odprtih vijačnic in tako je omogočeno nadaljnje povezovanje. Končen rezultat je povečana efektivna velikost in strižna odpornost proti toku.

Na hidratacijo polimera v vodni raztopini odločilno vpliva tudi temperatura. Ta lastnost je zelo uporabna, saj lahko s spremembo temperature vplivamo na potek geliranja dostavnega sistema. Pri nizki temperaturi so molekule hidratirane in le v manjši meri so prisotne tudi interakcije med metoksi skupinami. Ob povišanju temperature pa pride do izgube hidratne vode, kar lahko opazimo kot znižanje relativne viskoznosti. Ko dosežemo zadostno stopnjo

dehidracije postanejo vodilne interakcije hidrofobne interakcije med metoksi substituenti. Pride do interpolimernega združevanja pripetih funkcionalnih skupin, kar vodi v nastanek strukture neskončnih povezav z močno povečano viskoznostjo. Temperaturi, pri kateri se le-to zgodi, rečemo točka geliranja in je karakteristična lastnost posameznega produkta. Nastali gel je popolnoma reverzibilen, kar pomeni, da polimer z ohlajanjem iz gel stanja ponovno pretvorimo v tekoče oz. sol stanje (36, 40). Učinkovitost tvorbe trdnega gela je odvisna od viskoznosti, koncentracije in same kemijske sestave uporabljenega polimera. V tem pogledu HPMC prednjači pred drugimi celuloznimi derivati, saj kemijska sestava omogoča hitro in močno nabrekanje, kar odločilno vpliva na podaljšanje sproščanja vgrajene učinkovine (40). Pogosta uporaba tega polysinteznega polimera je posledica tudi odlične ocene varnosti, saj ima od FDA (*angl. Food and Drug Administration*) priznan status GRAS (*angl. Generally Recognized as Safe*) (36). Zaradi neionskega značaja izkazuje stabilnost v širokem pH intervalu od vrednosti 3,0 do 11,0. Ugodna lastnost pa je tudi odpornost na encimsko razgradnjo (36).

1.7 Vrednotenje

1.7.1 Povprečni premer delcev

Naprava Zetasizer Nano ZS izvaja meritve velikosti delcev s pomočjo sipanja laserske svetlobe (DLS) oz. fotonske korelacijske spektroskopije (PCS). DLS meri Brownovo gibanje delcev, ki je definirano kot naključno gibanje delcev v tekočini, do katerega prihaja zaradi trkov z molekulami topila. Hitrost gibanja delcev je odvisna od njihove velikosti. Majhni delci se gibljejo hitreje v primerjavi z večjimi. Ko laserski žarek osvetli vzorec, se svetloba na delcih sipa, intenziteta sipane svetlobe pa fluktuirira z različno hitrostjo in ti podatki so podlaga za izračun velikosti delcev (41, 42).

1.7.2 Polidisperzni indeks

Polidisperzni indeks (PDI) je parameter, ki nam daje informacijo o širini porazdelitve velikosti delcev. Obsega vrednosti od 0 do 1, pri čemer vrednosti blizu 0 pričajo o veliki homogenosti vzorca, vrednosti nad 0,3 pa kažejo na prisotnost delcev različnih velikosti oz. na heterogenost disperzije (43).

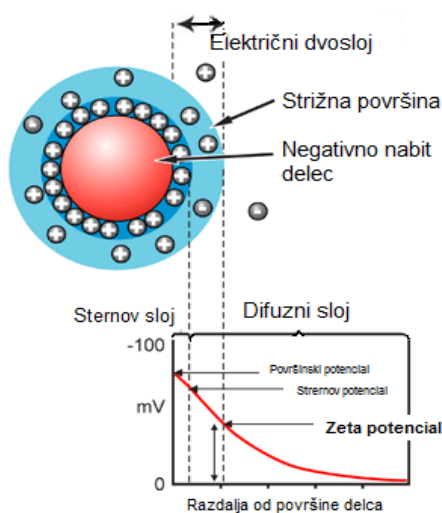
1.7.3 Zeta potencial

Vsak v mediju gibajoč nabit delec obdaja tekoča plast imenovana električna dvojna plast. Notranjo plast sestavljajo med seboj močno povezani ioni, ki so del Sternovega sloja. Njihov naboj je nasproten naboju delca. V zunanji plasti, v difuznem sloju pa so nasprotno nabiti ioni manj trdno pritrjeni in mejijo na notranjost raztopine. Zeta potencial (ZP) imenujemo razliko potencialov med vrednostjo potenciala na mejni plasti in v notranjosti raztopine. Le-ta je na primeru negativno nabitega delca predstavljen na *sliki 7*. Določamo ga z metodo Dopplerjeve elektroforeze, z napravo Zetasizer Nano ZS. Delci v električnem polju zaradi privlačnostnih sil potujejo proti nasprotno nabiti elektrodi. Ob osvetlitvi vzorca z laserjem, gibanje delcev povzroči spremembo frekvence sipane svetlobe (Dopplerjev efekt). Končno vrednost potenciala naprava izračuna na podlagi Henry-jeve enačbe:

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(Ka)}{3\eta}$$

U_e – elektroforezna mobilnost, ε – dielektrična konstanta, ζ – zeta potencial, $f(Ka)$ – Henry-jeva funkcija, η – viskoznost medija (42)

Merimo ga v mV in vrednost potenciala nam kaže stabilnost koloidnega sistema. V splošnem velja, da je sistem fizikalno stabilen, ko absolutna vrednost ZP izkazuje vrednosti večje od 30 mV. Pri nižjih vrednosti se delci med seboj manj odbijajo in tako je težnja k agregaciji povečana. Najmanj stabilen sistem je ob dosegu izoelektrične točke, ob vrednosti ZP 0 mV. Izmed faktorjev, ki vplivajo na ZP, je najpomembnejši pH. Delci imajo v kislem mediju bolj pozitiven naboj, v bazičnem pa negativen (42).



Slika 7: Prikaz zeta potenciala na primeru negativno nabitega delca (prirejeno po viru 44).

1.7.4 pH

pH je definiran kot merilo vsebnosti vodikovih ionov v raztopini. Tako določa njeno kislost oz. bazičnost. Izračunamo ga s pomočjo Sørensonove enačbe: $\mathbf{pH} = -\log [a_{H^+}]$

Meritve izvajamo s pomočjo pH metra. Aparatura je zelo občutljiv voltmeter, sestavljen iz dveh elektrod, referenčne in merilne. Referenčna elektroda zagotavlja konstanten in stabilen električni potencial. Glavni del merilne elektrode predstavlja steklena membrana, ob stiku z vzorčno raztopino poteče ionska izmenjava med alkalnimi ioni v steklu in vodikovimi ioni v raztopini. Razlika potencialov med obema elektrodama nam kaže na število prisotnih vodikovih ionov. Dejansko vrednost pH vzorca pa določimo preko Nernstove enačbe:

$$E = E_0 + 2,3 \frac{RT}{nF} \times \log[a_{H^+}] \quad \rightarrow \quad \mathbf{pH} = \frac{E_0 - E}{kT} \quad (k = 2,3 \frac{R}{nF})$$

E - električni potencial med elektrodama [V], E_0 - potencial referenčne elektrode [V],
 R - plinska konstanta [kPa L mol⁻¹ K⁻¹], T - temperatura [K], n - naboj iona,
 F - Faradayeva konstanta [mol⁻¹], a_{H^+} - aktivnost vodikovih ionov,
 kT - Nernstov faktor [kPa L] (45)

1.7.5 UV-VIS spektroskopija

UV-VIS spektroskopija je spektralna analiza, ki temelji na absorpciji elektromagnetnega valovanja v območju ultravijolične in vidne svetlobe, torej valovnih dolžin od 160 do 780 nm. Primerna je predvsem za kvantitativno analizo tistih spojin, ki močno absorbirajo v tem območju ali pa ob dodatku snovi, ki z analitom tvorijo obarvan kompleks. Naprava za merjenje se imenuje spektrofotometer, njegove glavne komponente pa so izvor svetlobe, monokromator, kiveta in detektor.

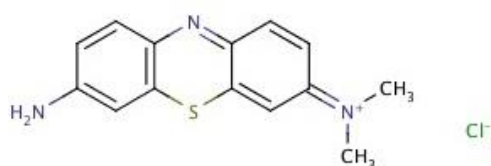
Merjenje poteka tako, da vzorec v transparentni kiveti obsevamo, svetloba pa deluje kot stimulus, ki molekule analita pretvori v višja energetska stanja. Izmerimo vrednosti prepuščene svetlobe, ki jo imenujemo transmitanca (T). Nato pa absorbanco (A) izračunamo s pomočjo enačbe, ki temelji na Beer-Lambertovem zakonu in pravi, da je koncentracija vzorca v prejem sorazmerju z absorbanco: $A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$

A - absorbanca, T - transmitanca, P_0 - intenziteta vpadlega valovanja [W],
 P - intenziteta izhodnega valovanja [W], ϵ - molarni ekstinkcijski koeficient [L mol⁻¹ cm⁻¹],
 b - dolžina kivete [cm], c - koncentracija vzorca [mol L⁻¹] (46, 47, 48, 49)

Azure A kolorimetrična metoda

Kolorimetrična metoda z uporabo barvila Azure A (kemijska struktura na *sliki 8*) je indirektna metoda za kvantitativno določevanje heparina v vzorcu. Dodatek barvila v

raztopino vzorca povzroči nastanek novih interakcij, med anioni heparina in kationi barvila se tvorijo ionske vezi. Posledično pride tudi do spremembe barve raztopine, iz temno modre v svetlejšo odtenke modre ali vijolične (*slika 9*). Količino prisotnega heparina lahko nato detektiramo s pomočjo spektrofotometrije, saj nove interakcije povzročijo metakromatski premik absorptivnega maksimuma k nižjim valovnim dolžinam. Postopek določevanja poteka tako, da pri valovni dolžini 512 nm izmerimo absorbenco kompleksu, ki nastane ob zmešanju enake količine vzorca in vodne raztopine Azure A barvila (8×10^{-5} M). Absorpcijski maksimum barvila je dosežen pri valovni dolžini 633 nm (50, 51).



Slika 8: Kemijska struktura barvila Azure A (52). **Slika 9:** Spremembe barve Azure A.

1.8 Subkutana aplikacija

Parenteralna aplikacija pomeni, da zdravilo v telo apliciramo z injiciranjem, infundiranjem ali implantiranjem (53). Na tak način se izognemo učinku prvega prehoda, saj učinkovina prehaja v sistemski krvni obtok brez predhodnega metabolizma. To pot torej uporabimo za aplikacijo zdravila, ki je podvrženo predsistemski presnovi, v primeru slabe resorpcije učinkovine iz prebavnega trakta in pri pojavu neželenih učinkov pri peroralni aplikaciji. Ena izmed možnosti parenteralne uporabe zdravil je subkutana oz. podkožna aplikacija. Učinkovino apliciramo v podkožje, ki je sestavljeno iz vezivnega tkiva, maščobnih celic, čutilnih živčnih vlaken in manjšega števila krvnih žil. Učinek zdravila je tako zakasnel, saj je zaradi počasne in dlje trajajoče resorpcije učinkovine v krvni obtok, podaljššan razpolovni čas ZU. Za to pot aplikacije je potrebno biti pozoren na količino vbrizganega zdravila (1 do 2 ml), zagotovitev primerne pH (alkalnost) in ustrezno osmolarnost (izotoničnost) (54). V našem primeru imamo opravka z učinkovino, ki se zaradi svojih lastnosti ne absorbira iz gastrointestinalnega trakta. Ko je nujen takojšen učinek, LMWH apliciramo intravensko. Za subkutano aplikacijo se odločimo, ko želimo, da se učinek zdravila pojavi kasneje in traja dlje časa. Prehod učinkovine v krvni obtok je tako počasnejši, pri tem pa se BU zmanjša le nekje za 10 % v primerjavi z intravensko aplikacijo (54, 55).

2. NAMEN IN NAČRT DELA

Namen magistrske naloge bo izdelati poloksamerne termoreverzibilne hidrogelne za subkutano aplikacijo, ki bodo zagotavljali podaljšano sproščanje LMWH in ovrednotiti njihove lastnosti.

Na začetku bomo s polielektrolitnim kompleksiranjem izdelali nanokomplekse LMWH in hitosana. Poiskali bomo optimalno masno razmerje LMWH/hitosan, ki bo dalo komplekse z najustrežnejšimi fizikalnimi in kemijskimi lastnostmi. Izkazovati bodo morali čim manjšo velikost nanometriškega razreda in PDI vrednost pod 0,3, kar kaže na homogenost nastale disperzije. Vendar pa je za zagotovitev stabilnosti disperzije potrebno zadostiti še večim pogojem. Absolutna vrednost zeta potenciala mora biti večja od 30 mV. Vse te parametre bomo spremljali z napravo Zetasizer Nano ZS. S pH metrom bomo merili pH, saj tudi le-ta odločilno vpliva na nastanek nanokompleksov. Vrednosti se bodo morale gibati med 4 in 5.

Po določitvi optimalnega razmerja bomo izbrane disperzije nanokompleksov, kot tudi raztopino učinkovine vgradili v 3 različne formulacije termoreverzibilnih hidrogelov. Formulacije bo v največjem deležu sestavljala poloksamer 407, ki mu bomo v manjšem deležu dodali še poloksamer 188. Tretja formulacija bo poleg obeh poloksamerov vsebovala še HPMC.

Nato bo sledil *in vitro* poskus sproščanja učinkovine in raztapljanja hidrogelov. S spektrofotometrično metodo bomo spremljali hitrost sproščanja LMWH, določitev hitrosti raztapljanja hidrogelov pa bo temeljila na vizualni oceni.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Materiali za izdelavo nanokompleksov:

- Fragmin (Na-dalteparinat, LMWH), 10.000 i.e./1ml, za i.v. in s.c., Pfizer
- Hitosan hidroklorid, Kraeber&Co GmbH, Ellerbek, Nemčija
- destilirana voda

Materiali za izdelavo hidrogelov:

- Fragmin (Na-dalteparinat, LMWH), 10.000 i.e./1ml, za i.v. in s.c., Pfizer
- Hitosan hidroklorid, Kraeber&Co GmbH, Ellerbek, Nemčija
- Lutrol® F68 (Poloksamer 188, P188), Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- Lutrol® F127 (Poloksamer 407, P407), Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- Methocel K4M Premium EP (HPMC), Colorcon, Velika Britanija
- destilirana voda

Reagenti za pripravo fosfatnega pufra (PBS):

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

Barvilo za spremljanje sproščanja z UV-VIS spektroskopijo:

- Azure A klorid, Standard Fluka, za mikroskopiranje, Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija

3.2 NAPRAVE

- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- analitska tehtnica, Mettler Toledo XS 205, Schwerzenbach, Švica
- tehtnica, Vibra AJ Tuning-Fork Balance, Železniki, Slovenija
- magnetno mešalo, IKA-WERKE Ro 15 power, Staufen, Nemčija
- magnetno mešalo, Rotamix 550 mmH, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- naprava za merjenje velikosti in zeta potenciala nanodelcev, Zetasizer Nano ZS, Malvern, Velika Britanija
- UV-VIS sprektrofotometer, HP Hewlett Packard 8453, Nemčija
- pH meter, SevenCompact ph/ion, Mettler Tolledo, Schwerzenbach, Švica
- vodna kopel WB-13, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- mikrocentrifuga, Eppendorf Centrifuge 5415R, Hamburg, Nemčija
- avtomatske pipete (20-100 μ L, 50-1000 μ L, 100-5000 μ L), Biohit, Finska

3.3 METODE

3.3.1 Izdelava nanokompleksov LMWH in hitosana

Z metodo polielektrolitnega kompleksiranja oz. z metodo samozdruževanja smo pripravili nanokomplekse LMWH in hitosana v različnih masnih razmerjih in z različno koncentracijo učinkovine. V vseh primerih smo uporabili 4,0 ml raztopine LMWH in 6,667 ml raztopine hitosana ustreznih koncentracij, ki so dajale določena masna razmerja.

3.3.1.1 Priprava raztopin LMWH

Najprej smo pripravili raztopine LMWH z redčenjem osnovne raztopine s koncentracijo 10.000 i.e./1 ml, kar ustreza 64 mg/ml. Volumen raztopine LMWH, ki smo ga uporabljali pri izdelavi delcev, je ostajal ves čas enak in znašal 4,0 ml. Iz *preglednice I* vidimo, koliko so znašale koncentracije učinkovine, potrebne za izdelavo.

Preglednica I: Izračunane koncentracije LMWH potrebne za izdelavo.

Masa LMWH [mg]	Koncentracija LMWH v raztopini [mg/ml]	Končna koncentracija LMWH v nanokompleksih [mg/ml]
3	1,00	0,375
12	3,00	1,125

3.3.1.2 Priprava raztopin hitosana

Po predhodnem izračunu smo za zagotovitev ustrezne koncentracije na analitski tehnični natehtali hitosan. Uporabljene mase so predstavljene v *preglednici II*. Kvantitativno smo ga prenesli v bučko, ga v dodanem manjšem volumnu destilirane vode najprej raztopili in nato redčili do oznake na bučki. Volumen raztopine hitosana, ki smo jo uporabili pri izdelavi nanodelcev je ostajal ves čas enak in je znašal 6,667 ml.

Preglednica II: Izračunane koncentracije hitosana za ustrezno disperzijo.

Masno razmerje LMWH/hitosan	Masa LMWH [mg]	Masa hitosana [mg]	Koncentracija hitosana [mg/ml]
1:0,5	3	1,5	0,225
	12	6	0,900
1:1,0	3	3	0,450
	12	12	1,800
1:1,125	3	3,375	0,506
	12	13,5	2,025
1:1,250	3	3,75	0,562
	12	15	2,250
1:1,375	3	4,125	0,619
	12	16,5	2,475
1:1,5	3	4,5	0,675
	12	18	2,700
1:1,6	3	4,8	0,720
	12	19,2	2,880
1:1,7	3	5,1	0,765
	12	20,4	3,060
1:1,8	3	5,4	0,810
	12	21,6	3,240
1:1,9	3	5,7	0,855
	12	22,8	3,420
1:2,0	3	6	0,900
	12	24	3,600
1:3,0	3	9	1,350
	12	36	5,400
1:4,0	3	12	1,800
	12	48	7,200

3.3.1.3 Izdelava nanokompleksov

V čašo z volumnom 25 ml smo najprej s pomočjo avtomatske pipete odmerili 6,667 ml raztopine hitosana ustrezne koncentracije. Čašo smo postavili na magnetno mešalo in pričeli z mešanjem pri 600 rpm in sobni temperaturi. Med konstantnim mešanjem smo nato z

avtomatsko pipeto počasi dodali še 4,0 ml raztopine LMWH izbrane koncentracije. Po končanem dodajanju smo čašo zaščitili s parafilmom in pustili disperzijo, da se je mešala še 1 h. Sveže pripravljene disperzije smo do uporabe hranili v hladilniku, pri 4°C.

3.3.2 Priprava termoreverzibilnih hidrogelov

V primerjavi z metodo, kjer pri pripravi hidrogelov uporabljajo visoko temperaturo, hladna metoda izkazuje več prednosti, saj omogoča lažje raztapljanje polimera in omejuje nastanek sprememb toplotno labilnih komponent (30). Tako smo s pomočjo hladne metode pripravili 3 različne formulacije hidrogelov, sestava posameznih formulacij je podana v *preglednici III*. Vodno komponento so predstavljale disperzije nanokompleksov z masnim razmerjem LMWH/hitosan 1:1,375 in 1:2,0, oboje s koncentracijo 1,125 mg/ml in raztopina samega LMWH v isti koncentraciji.

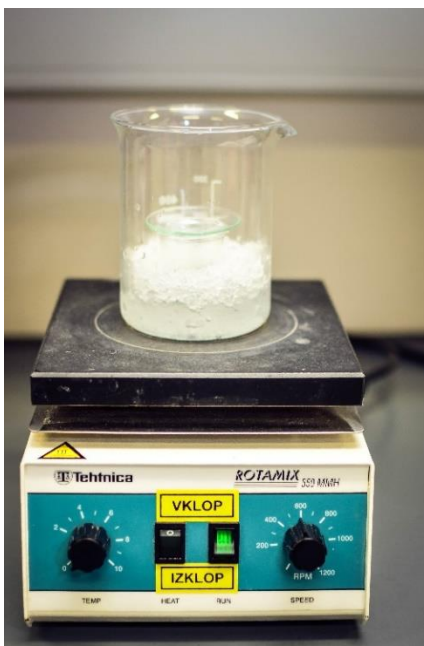
Metoda geliranja je potekala tako, da smo najprej natehtali 10 g vodne komponente v 25 ml čašo. V večji čaši smo pripravili kopel, mešanico ledu in vode in tako zagotovili temperaturo nekje od 5 do 10°C in vanjo postavili čašo z vodno komponento. Z nižjo temperaturo je bila preprečena pretvorba iz sol v gel stanje že v času raztapljanja polimera. Med stalnim mešanjem na magnetnem mešalu pri 400-500 rpm smo nato zelo počasi dodajali polimere, vmes smo imeli čašo pokrito z urnim steklom, kot lahko vidimo na *sliki 10*. Najprej smo dodali osnovni polimer P407 in nato še P188 in/ali HPMC, uporabljene mase polimerov so razvidne iz *preglednice IV*. Po koncu smo urno steklo zamenjali s parafilmom in mešali do popolne raztopitve. Ker smo s pomočjo mešanja vnesli v formulacije veliko zračnih mehurčkov, smo gel shranjevali v hladilniku pri 4°C še vsaj 24 h. Na ta način smo se znebili mehurčkov, preden smo gel uporabili za nadaljnje poskuse, saj bi lahko povzročali dodatne motnje.

Preglednica III: Masni deleži polimerov v posameznih formulacijah.

Formulacija	P407/P188/HPMC [m/m %]
F1 (ND1 in R1)	18/0/0
F2 (ND2 in R2)	18/1/0
F3 (ND3 in R3)	18/1/1

Preglednica IV: Mase polimerov v posameznih formulacijah (masa vodne komponente znaša 10 g).

Formulacija	Masa P407 [g]	Masa P188 [g]	Masa HPMC [g]
F1	2,195	/	/
F2	2,222	0,123	/
F3	2,250	0,125	0,125



Slika 10: Proces priprave termoreverzibilnih hidrogelov.

3.3.3 Vrednotenje disperzij nanokompleksov

Nastale nanodelce smo vrednotili glede na njihovo povprečno velikost, polidisperzni indeks, zeta potencial, pH disperzije in učinkovitost vgrajevanja LMWH.

3.3.3.1 Določitev povprečnega premera delcev in homogenosti disperzije

Z napravo Zetasizer Nano ZS (*slika 11*) smo s pomočjo fotonske korelacijske spektroskopije pri temperaturi 25°C in kotu 173° izmerili povprečni premer in določili homogenost disperzije. Viskoznost vode, kot disperznega medija, je znašala 0,8872 mPa, lomni količnik pa 1,330. Izvor svetlobe je predstavljal He-Ne laser, katerega valovna dolžina je znašala 633 nm. V plastično kiveto smo s kapalko odmerili približno 1 ml vzorca in pazili na to, da pri tem nismo vnesli zračnih mehurčkov.

3.3.3.2 Določitev zeta potenciala delcev

Preko merjenja elektroforezne mobilnosti delcev in uporabe Henry-jeve enačbe je naprava določila še ZP. Pogoji meritev so bili enaki, kot pri določitvi povprečne velikosti, dielektrična konstanta disperznega medija pa je znašala 78,5. Za merjenje se uporabljajo posebne kapilarne celice, v katere smo vzorce polnili s pomočjo injekcijske brizge. Tudi

tukaj smo morali ob polnjenju paziti na morebiten vnos zračnih mehurčkov. Disperzije v višji koncentraciji (1,125 mg/ml) smo predhodno redčili z destilirano vodo.



Slika 11: Naprava Zetasizer Nano ZS.

3.3.3.3 Določitev pH vrednosti disperzij

pH vrednost disperzij smo določili s pomočjo predhodno umerjenega pH metra SevenCompact pH/Ion. Meritve za posamezno disperzijo smo trikrat ponovili in kot rezultat podali vrednost zadnje meritve.

3.3.3.4 Določitev učinkovitosti vgradnje LMWH

Učinkovitost vgradnje LMWH v nanokomplekse smo preverili z indirektno metodo. Vzorce majhnega volumna in različnih masnih razmerij ter koncentracij smo prenesli v mikrocentrifugirke in jih centrifugirali 1 h pri 13200 rpm in 4°C. Po ločitvi faz smo supernatant odpipetirali v epruvete in mu dodali barvilo Azure A. S pomočjo UV-VIS spektroskopije smo nato izmerili absorbanco pri 512 nm. Dejansko koncentracijo LMWH smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje z enačbo $0,0355x + 0,0858$, kot je opisano v 3.3.4.2.

3.3.4 Vrednotenje termoreverzibilnih hidrogelov

Priprava PBS

Pufer smo pripravili tako, da smo na analitski tehtnici zatehtali 8 g NaCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl in 0,24 g KH₂PO₄ ter to kvantitativno prenesli v 1000 mL bučko. Skoraj do oznake smo dolili bidestilirano vodo in mešali do raztopitve na magnetnem mešalu. Sledilo je umerjanje raztopine na pH 7,4 s pomočjo 1 M HCl oz. 1 M NaOH in dopolnitev z bidestilirano vodo do oznake.

Za *in vitro* poskus sproščanja in raztapljanja smo uporabili model, ki ne vsebuje membrane (30). Poskus smo izvedli tako, da smo 1 ml predhodno pripravljene formulacije odpipetirali v graduirane epruvete majhnega volumna in premera 1 cm. Za kratek čas smo jih postavili v vodno kopel, ogreto na temperaturo fizioloških pogojev, torej na 37°C. Tako je prišlo do prehoda iz sol v gel stanje. Pretvorba v gel stanje pred dejanskim začetkom poskusa je preprečila, da bi se formulacija ob stiku z vodnim medijem hitro raztopila (30). Označili smo začetni nivo hidrogela, mu dodali 2 ml fosfatnega pufrs s pH 7,4 in epruvete postavili nazaj v vodno kopel. Celoten poskus smo izvedli v treh paralelkah, izvedba poskusa pa je prikazana na *sliki 12*.

3.3.4.1 Raztapljanje hidrogelov

Raztapljanje termoreverzibilnega hidrogela smo spremljali tako, da smo vizualno, s pomočjo oznak volumna na epruvetah, preverjali nivo gela, to je koliko se je le-ta znižal v primerjavi z začetnim stanjem.

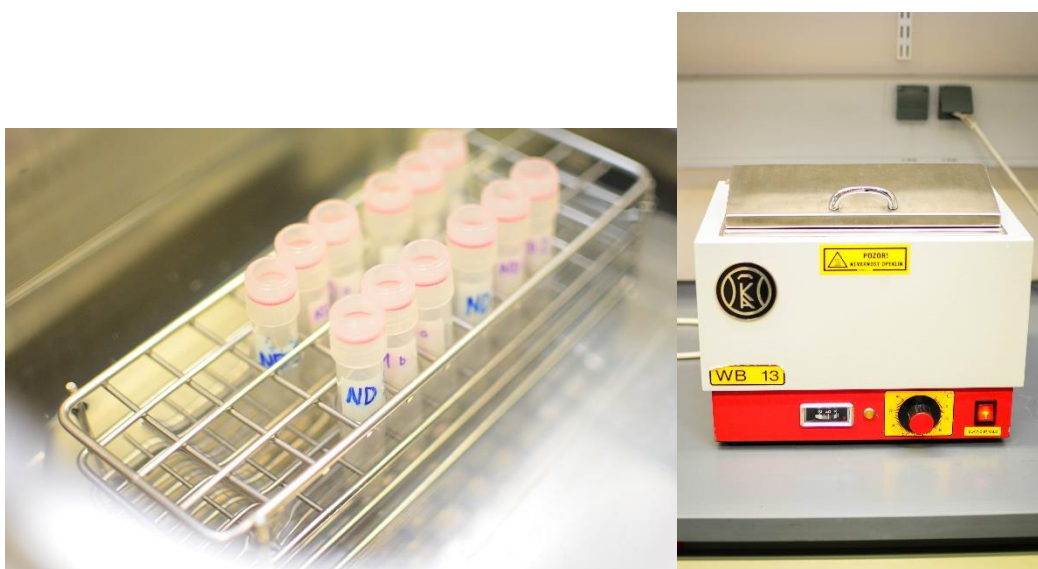
3.3.4.2 Sproščanje LMWH iz hidrogelov

Po preteku pol ure po pregledu raztopitve formulacij hidrogelov smo odvzeli 0,5 ml medija za sproščanje in le-tega nato nadomestili s svežim pufrom, predhodno segretim na približno telesno temperaturo. Vzorce smo redčili z destilirano vodo. V različnih časovnih točkah je bilo tudi redčenje različno, saj je bilo odvisno od hitrosti sproščanja LMWH iz hidrogela. Kakšne so bile redčitve v posameznih točkah, lahko razberemo iz *preglednice V*.

Preglednica V: Redčenje vzorcev medija za sproščanje LMWH iz hidrogelov v posameznih časovnih točkah.

Časovne točke/ Formulacije	1h	6h	24h	28h	48h	72h	Naprej 1x/dan
F1/ND1 F2/ND2 F3/ND3	10x	10x	10x	10x	20x	20x	20x
F1/R1 F2/R2 F3/R3	10x	10x	20x	50x	50x	50x	50x

10-kratno redčenje je pomenilo, da smo 0,5 ml odvzetega medija za sproščanje redčili do oznake v 5 ml bučki. 1 ml razredčenega vzorca smo nato prenesli v stekleno epruveto in mu dodali še enak volumen barvila Azure A, v koncentraciji 0,02 mg/ml. Za kvantitativno detekcijo LMWH smo uporabili indirektno Azure A kolorimetrično metodo. Merjenje je potekalo na UV-VIS spektrofotometru pri valovni dolžini 512 nm, kjer absorbira kompleks LMWH/Azure A. Kot slepo raztopino smo uporabili 1 ml destilirane vode. Koncentracijo sproščenega LMWH smo izračunali s pomočjo umeritvene premice. Le-to smo predhodno pripravili tako, da smo raztopino LMWH ustrezno redčili in pripravili raztopine v koncentracijah 0,5; 1; 2,5 in 5 µg/ml, jim dodali barvilo in izmerili absorbanco. S pomočjo meritev v teh točkah smo nato določili enačbo premice.



Slika 12: Graduirane epruvete v katerih smo določali hitrost raztapljanja in hitrost sproščanja LMWH iz hidrogelov. Temperaturo 37 °C smo vzdrževali s pomočjo vodne kopeli.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VREDNOTENJE NANOKOMPLEKSOV HITOSANA IN NIZKOMOLEKULARNEGA HEPARINA

Izdelali smo nanokomplekse in s spremljanjem njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti določili optimalno masno razmerje LMWH/hitosan, ki je bilo potrebno za nastanek fizikalno stabilnih disperzij nanokompleksov. Nanokomplekse z najustreznějšími lastnostmi smo nato vgradili v termoreverzibilne hidrogelne, ki smo jih vrednotili v nadaljnjih študijah.

4.1.1 Vpliv masnega razmerja LMWH/hitosan na velikost in PDI delcev

Nanokomplekse smo pripravili z variiranjem masnih razmerij LMWH/hitosan, preskusili smo trinajst razmerij, vse od 1:0,5 do 1:4,0. Uporabili smo dve različni končni koncentraciji LMWH v nastalih disperzijah, in sicer 0,375 mg/ml ter trikrat višjo koncentracijo 1,125 mg/ml. Naš cilj je bil izdelati čim manjše nanokomplekse, ki bi izkazovali zadostno fizikalno stabilnost, hkrati pa bi bil delež ZU v njih čim višji.

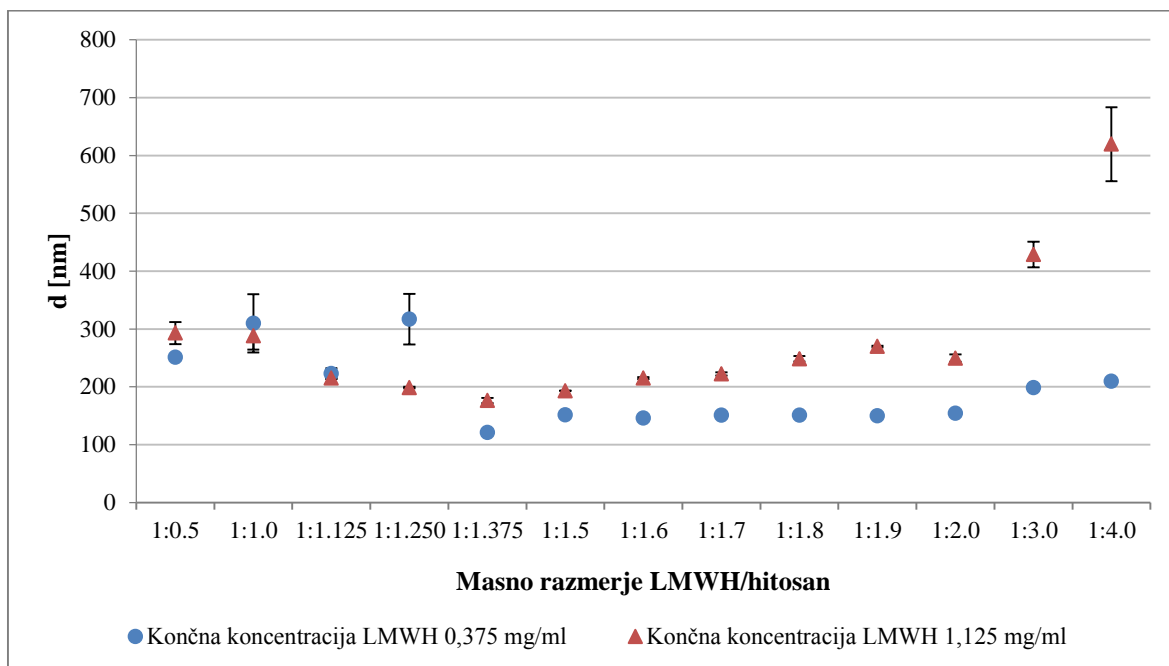
Kot je bilo že navedeno, ima masno razmerje med LMWH in polimerom značilen vpliv na lastnosti nanokompleksov. V študiji, ki so jo opravili Sun in sodelavci, je bilo ugotovljeno, da se ob titriranju hitosanskih raztopin z raztopinami različnih deležev enoksaparina, velikost nastalih delcev zmanjšuje z višanjem deleža učinkovine. Ta trend se nadaljuje vse do kritične točke, dosežene pri masnem razmerju hitosan/enoksaparin 2:1, kjer začne velikost delcev drastično naraščati. Na začetku so delci najverjetneje večji zato, ker se ena molekula učinkovine poveže z več molekulami polimera. Nato se do kritične točke tvori večje število delcev, le-ti so manjši in z bolj definirano strukturo. Tej točki sledi proces fizikalne nestabilnosti - flokulacija, pride do združevanja delcev v večje strukture (24).

Iz rezultatov na *sliki 13* je razvidno, da je pri nižji koncentraciji LMWH (0,375 mg/ml) prišlo do tvorbe večjih delcev vse do masnega razmerja 1:1,375, kjer smo po strmejšem padcu dosegli najmanjši premer (121 nm). Le-ta se v nadalje ni več občutneje zviševal, tudi pri razmerju 1:4,0 so delci izkazovali ustrezne vrednosti velikosti (209 nm). Če primerjamo rezultate pri koncentraciji LMWH 0,375 mg/ml z dobljenimi vrednostmi povprečnega premera ob uporabi trikrat višje koncentracije LMWH (1,125 mg/ml) vidimo, da so v slednjem primeru nastali delci z večjim premerom. Naši rezultati se torej skladajo s študijama Suna in Liuja s sodelavci. Le-ti so namreč prišli do zaključkov, da ob ohranjanju masnega razmerja heparin/hitosan in povečevanju koncentracije hitosana ali heparina pride do zvečanega povprečnega premera delcev. Vendar je trend nastanka stabilnih delcev opazen le pri uporabi koncentracije heparina in hitosana do 2 in 4 mg/ml, pri višjih koncentracijah pa se poveča tendenca k agregaciji. Ob uporabi višjih koncentracij predvidevajo, da pride do povečanega števila interakcij, ena molekula učinkovine reagira z več molekulami polimera. Vse to ima za posledico povečevanje velikosti nastalih delcev (24, 26). Najnižji deleži polimera so pri višji koncentraciji LMWH rezultirali v delce z večjim povprečnim premerom, najverjetneje kot posledica tvorbe večjega števila interakcij molekul hitosana z eno molekulo učinkovine. Velikost stabilnih delcev se je gibala od 176 nm (pri masnem razmerju 1:1,375) do 270 nm (pri razmerju 1:1,9). Kritično točko smo tako kot Sun in sodelavci tudi mi dosegli pri razmerju 1:2,0. Pri višjih deležih hitosana, se je močno povečal povprečni premer, kar priča o združevanju delcev.

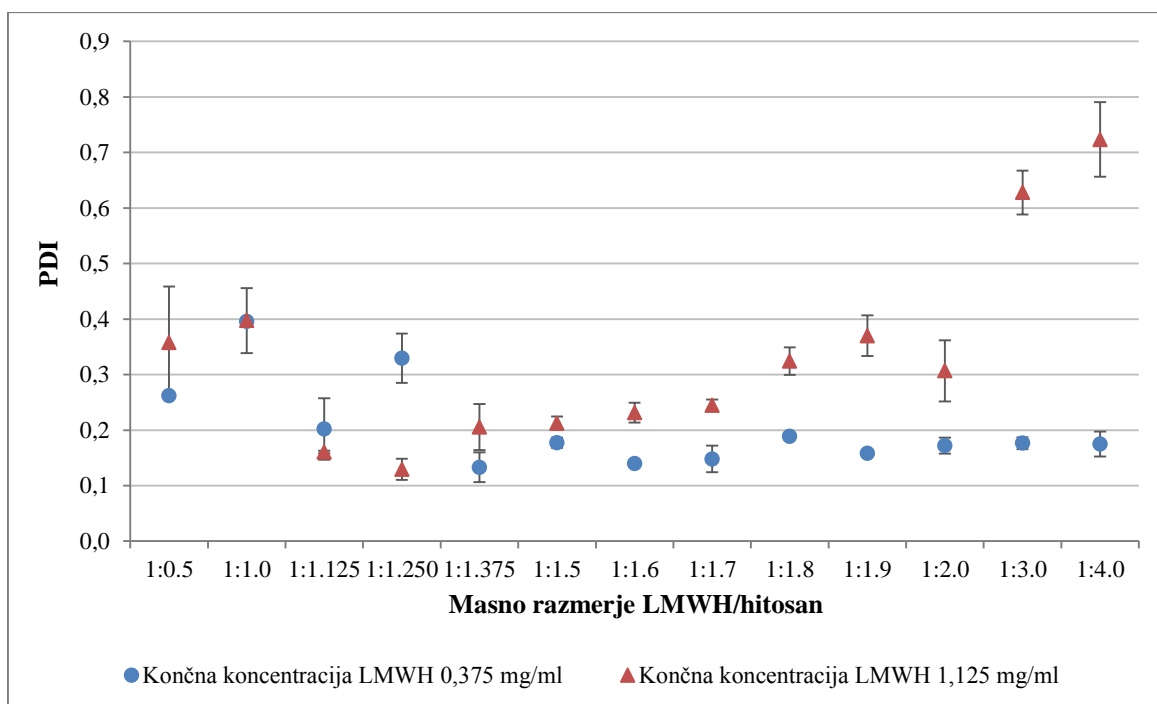
S prostim očesom smo opazili, da so disperzije koncentracije 0,375 mg/ml opalescentne barve. Pri masnih razmerjih od 1:0,5 do 1:1,250 smo opazili posedanje delcev na dnu čaše, kar nam v skladu z rezultati s *slike 13* kaže na nestabilnost oz. obarjanje. Pri ostalih, višjih deležih hitosana ni bilo vidnih delcev. Vrednosti PDI na *sliki 14* kažejo homogenost disperzije in posledično na njihovo stabilnost. Namreč, vrednosti PDI so lahko v območju od 0 do 1, pri čemer vrednosti blizu 0 pričajo o velikostni podobnosti prisotnih delcev. Nad vrednostjo 0,3 disperzije označimo kot heterogene (43). Iz naših rezultatov vidimo, da so disperzije homogene, razen pri razmerjih 1:1,0 in 1:1,250, kjer je meja 0,3 presežena.

Disperzije višje koncentracije LMWH so bile bele barve, vidne delce smo zaradi nestabilnosti zaznali pri najnižjih razmerjih (od 1:0,5 do vključno 1:1,250), nato pa so se ponovno pojavili pri razmerjih, ki so vsebovala najvišje vrednosti dodanega polimera. Homogenost disperzije je pri višji koncentraciji učinkovine manjša v primerjavi z nižjo

koncentracijo. Pri tem močno izstopata vrednosti pri masnih razmerjih 1:3,0 in 1:4,0, ki kažeta na veliko heterogenost nastale disperzije, kar je najverjetneje posledica združevanja delcev zaradi nestabilnosti.



Slika 13: Povprečni premer delcev (d) v odvisnosti od masnega razmerja LMWH/hitosan in končne koncentracije LMWH v disperziji.

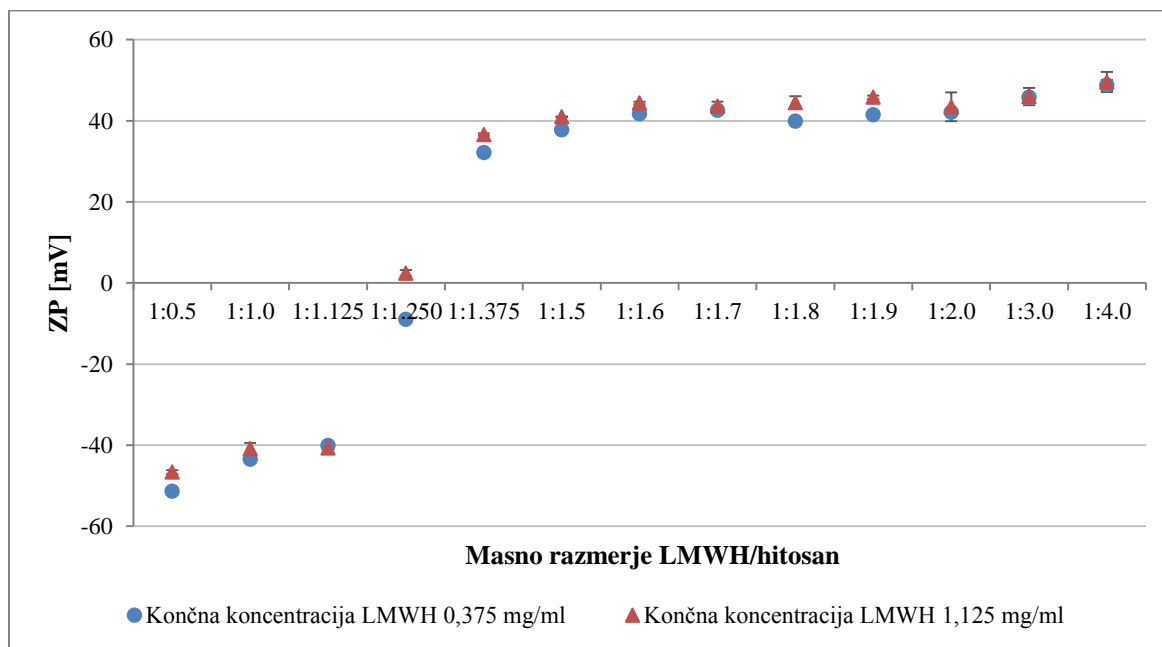


Slika 14: Polidisperzni indeks (PDI) v odvisnosti od masnega razmerja LMWH/hitosan in končne koncentracije LMWH v disperziji.

4.1.2 Vpliv masnega razmerja LMWH/hitosan na zeta potencial delcev

Z merjenjem zeta potenciala smo preverjali, kakšen vpliv ima masno razmerje LMWH/heparin na gostoto naboja na površini in posledično na fizikalno stabilnost nastale disperzije.

Iz rezultatov vrednosti zeta potenciala na *sliki 15*, pri obeh uporabljenih koncentracijah LMWH smo ugotovili, da izkazujejo podobne vrednosti. Povprečna vrednost ZP je pri razmerjih, ki dajejo pozitiven površinski naboj, znašala 42 mV. S spreminjanjem masnega razmerja smo ugotovili, da se točka preskoka zeta potenciala iz negativnih vrednosti v pozitivne približuje razmerju 1:1,250. Za negativne vrednosti zeta potenciala so zaslužne negativno nabite skupine LMWH, v točki preskoka pa se je naboj na površini izničil. To pomeni, da ni prisotnih sil, ki bi delce med seboj ločevale, sistem je tako nagnjen k fizikalni nestabilnosti. Nadalje vidimo, da prevladajo amino skupine hitosana, kar se kaže s pozitivnimi vrednostmi zeta potenciala. Dobljene visoke vrednosti zeta potenciala (cca. 40 mV) so rezultati, ki smo si jih želeli. To kaže na močan odboj posameznih delcev med seboj in posledično na visoko kinetično stabilnost nastale disperzije.



Slika 15: Zeta potencial (ZP) v odvisnosti od masnega razmerja LMWH/hitosan in končne koncentracije LMWH v disperziji.

4.1.3 Vpliv masnega razmerja LMWH/hitosan na pH disperzije

Sun in sodelavci so ugotovili, da se z višanjem pH vrednosti sistema (do meje 6,5) povečuje tudi zmožnost za nastanek kompleksa med enoksaparinom in polikationom. Do istih rezultatov so prišli tudi Lin in sodelavci. Ugotovili so, da do nastanka kompleksov lahko pride le, če sta učinkovina in polimer v ioniziranem stanju (11, 24). Lin je s sodelavci pri različnih pH vrednostih preveril naboje funkcionalnih skupin heparina in hitosana.

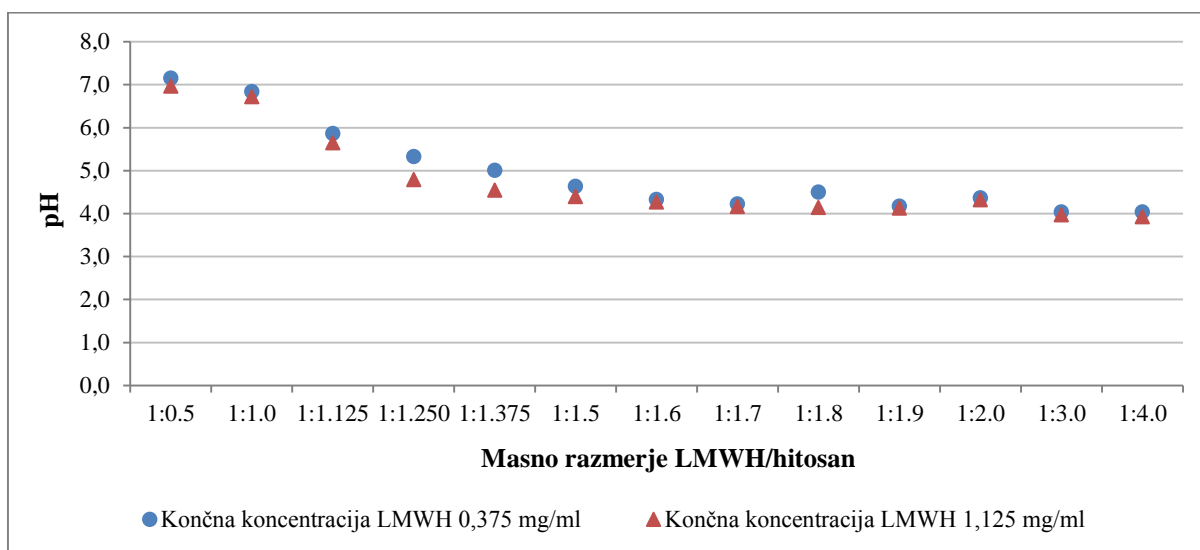
Po njihovih rezultatih v *preglednici VI* se lahko polielektrolitni kompleksi s sferično obliko tvorijo v pH območju 1,2-6,5. Zunaj pH območja delci postanejo nestabilni in razpadejo, kar je posledica deprotonacije hitosana (11).

Rezultati študije Suna in sodelavcev pričajo o tem, da je za nastanek stabilnih kompleksov potreben pH v območju pKa vrednosti enoksaparina in hitosana, kar pomeni med vrednostmi 3,1 in 6,5. Velikost delcev se zmanjšuje s povečevanjem pH vrednosti hitosanske raztopine. Začetna faza tvorbe, kjer nastajajo večji delci je pri pH od 3,0 do 4,5. Nato je v območju 4,5-6,5 dosežen plato, delci imajo najmanjši povprečen premer, le-ta pa nato začne naraščati in okoli pH vrednosti 7,0 se prične agregacija. To lahko pripišemo dejstvu, da je v kislem mediju hitosan močno pozitivno nabit in medsebojni odboj prostih amino skupin povzroči močno raztegnitev molekule hitosana, ki ima potem za posledico tvorbo večjih kompleksov z enoksaparinom. Skupaj s povečevanjem pH disperzije se odbojna sila zmanjšuje in izkazuje tvorbo kompaktnih delcev manjših velikosti. Vendar pa je pri pH disperzije več kot 6,5, manj kot 50 %, amino skupin hitosana pozitivno nabitih, kar zmanjša topnost hitosana in elektrostatski odboj med delci. Sistem postane nestabilen in stremi k precipitaciji pri pH okoli 7,0 (24).

Preglednica VI: Naboj funkcionalnih skupin heparina in hitosana pri različnih pH vrednostih.

pH vrednost	Naboj funkcionalnih skupin heparina	Naboj funkcionalnih skupin hitosana
1,2	COOH, SO ₄ ⁻ , NHSO ₃ ⁻	NH ₃ ⁺
2,5	COOH, COO ⁻ , SO ₄ ⁻ , NHSO ₃ ⁻	NH ₃ ⁺
4,5-6,5	COO ⁻ , SO ₄ ⁻ , NHSO ₃ ⁻	NH ₃ ⁺
7,0	COO ⁻ , SO ₄ ⁻ , NHSO ₃ ⁻	NH ₂

Iz naših rezultatov s *slike 16* vidimo, da se s povečevanjem deleža polimera, zmanjša tudi pH vrednost disperzije. Vse od masnega razmerja 1:1,125 so vrednosti pH v optimalnem območju za tvorbo stabilnih delcev z majhnim povprečnim premerom.



Slika 16: pH v odvisnosti od masnega razmerja LMWH/hitosan in končne koncentracije LMWH v disperziji.

4.1.4 Učinkovitost vgradnje LMWH v delce

Z visoko centrifugalno silo smo ločili nanokomplekse od disperznega medija in nato z indirektno spektrofotometrično metodo, z uporabo barvila Azure A preverili, kakšen delež uporabljene učinkovine se je vgradil v nanokomplekse.

Iz rezultatov v *preglednici VII* vidimo, da je učinkovitost vgradnje v vseh primerih skoraj 100 %.

Preglednica VII: Učinkovitost vgradnje LMWH v nanokomplekse v odvisnosti od masnega razmerja LMWH/hitosan in končne koncentracije LMWH v disperziji.

Končna koncentracija LMWH [mg/mL]	Masno razmerje LMWH/hitosan	Učinkovitost vgradnje LMWH [%]
0,375	1:2,0	99,8
	1:1,6	99,8
	1:1,5	99,9
	1:1,375	99,9

1,125	1:2,0	99,9
	1:1,5	99,9
	1:1,375	99,9

4.1.5 Fizikalna stabilnost disperzij nanokompleksov v času shranjevanja

Za študijo stabilnosti smo na podlagi rezultatov fizikalnih lastnosti nastalih kompleksov, ki jih lahko vidimo v *preglednici VIII*, izbrali 4 disperzije. Masno razmerje 1:1,375 je izstopalo v vseh pogledih. Dosegli smo najmanjšo velikost delcev z nizkimi vrednostmi PDI, kar pomeni, da so nastale disperzije tudi homogene. Vrednosti zeta potenciala kažejo na pozitiven naboj na površini nastalih delcev. Tudi pH vrednosti so znotraj zelenega območja. Rezultati kažejo na fizikalno stabilnost nastalih disperzij, na katero je nakazoval že vizualni izgled, saj ni bilo opaziti vidnih delcev.

Kot drugo optimalno masno razmerje LMWH/hitosan se je izkazalo razmerje 1:2,0. Nastali delci izkazujejo majhen premer in nizek PDI. Vrednosti zeta potenciala so še višje, pH vrednost disperzije pa je znotraj zelenega območja.

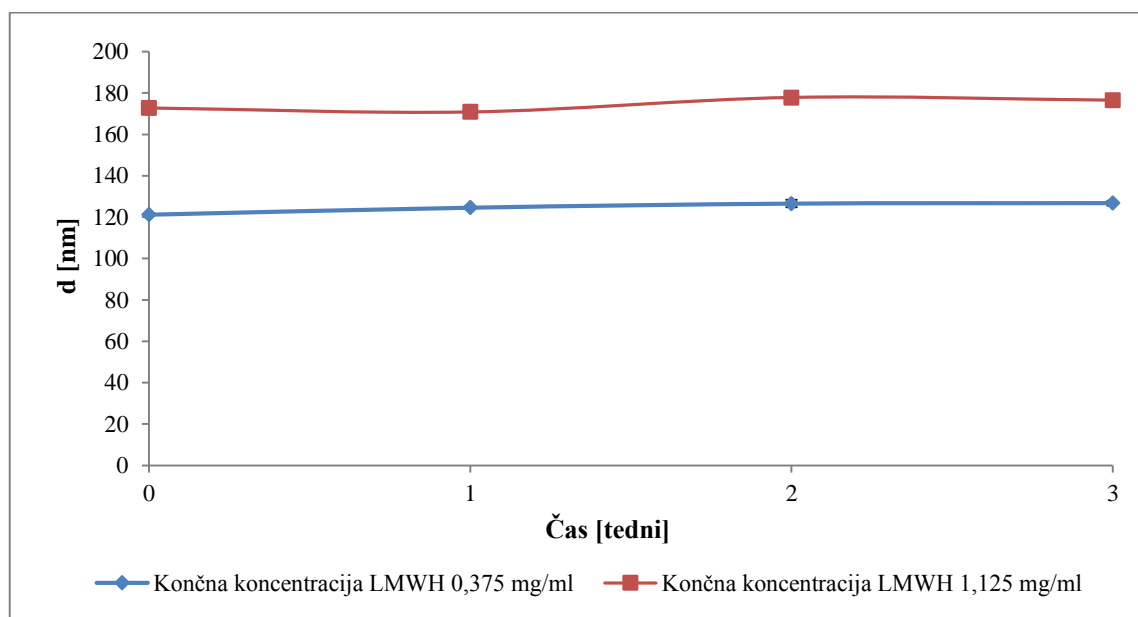
Preglednica VIII: Fizikalni parametri štirih izbranih disperzij, takoj po izdelavi.

Masno razmerje LMWH/hitosan	Končna koncentracija LMWH [mg/ml]	Velikost delcev [nm]	Zeta		
			PDI	potencial [mV]	pH
1:1,375	0,375	121	0,133	32,2	5,0
	1,125	176	0,206	36,6	4,5
1:2,0	0,375	154	0,172	42,1	4,4
	1,125	249	0,307	43,5	4,3

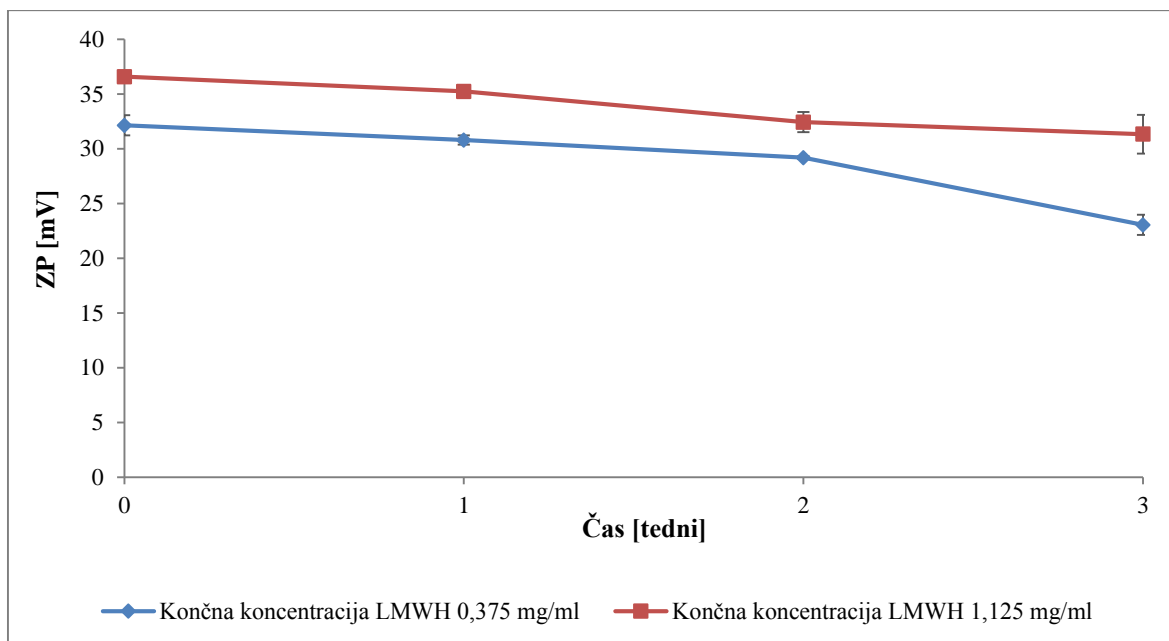
Za doseganje ustreznega podaljšanega sproščanja je stabilnost in ohranjanje začetnih lastnosti delcev zelo pomembno. Tako smo po izboru ustreznih disperzij nanokompleksov, glede na njihove lastnosti po izdelavi, le-te spremljali še naslednje tri tedne. Vzorčenje in preverjanje fizikalno-kemijskih lastnosti je potekalo enkrat tedensko.

4.1.6 Fizikalne lastnosti delcev pri uporabljenem masnem razmerju LMWH/hitosan 1:1,375

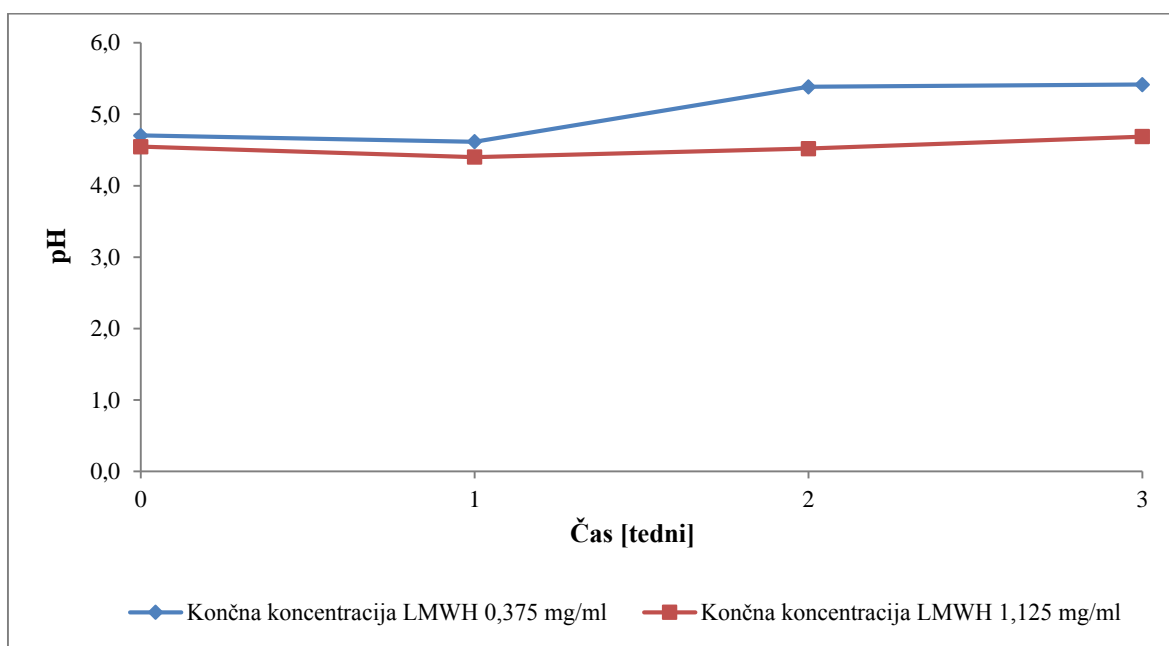
Rezultati kažejo, da so se fizikalni parametri delcev skozi tritedensko obdobje le v manjši meri spremenili. Velikost, kot vidimo na *sliki 17*, je ostala enaka. Rezultati zeta potenciala (*slika 18*) kažejo na potencialno nestabilnost le pri nižji končni koncentraciji LMWH v disperziji (0,375 mg/ml), saj so se v tem primeru vrednosti znižale iz 32 mV na 23 mV. V disperziji z višjo koncentracijo LMWH (1,125 mg/ml) pa ni prišlo do znižanja ZP pod mejo 30 mV. Na *sliki 19* imamo prikaz spreminjanja pH vrednosti v času shranjevanja. Vidimo, da se vrednosti pri višji koncentraciji niso spremenile, pri nižji pa je prišlo do zvišanja pH za skoraj eno enoto (iz 4,5 na 5,4), kar pa je še vedno v optimalnem pH območju. Iz rezultatov poskusa stabilnosti lahko zaključimo, da so nanodisperzije z obema koncentracijama LMWH, stabilne skozi daljši čas in tako primerne za nadaljnje študije.



Slika 17: Povprečni premer delcev v odvisnosti od časa shranjevanja (LMWH/hitosan = 1:1,375).



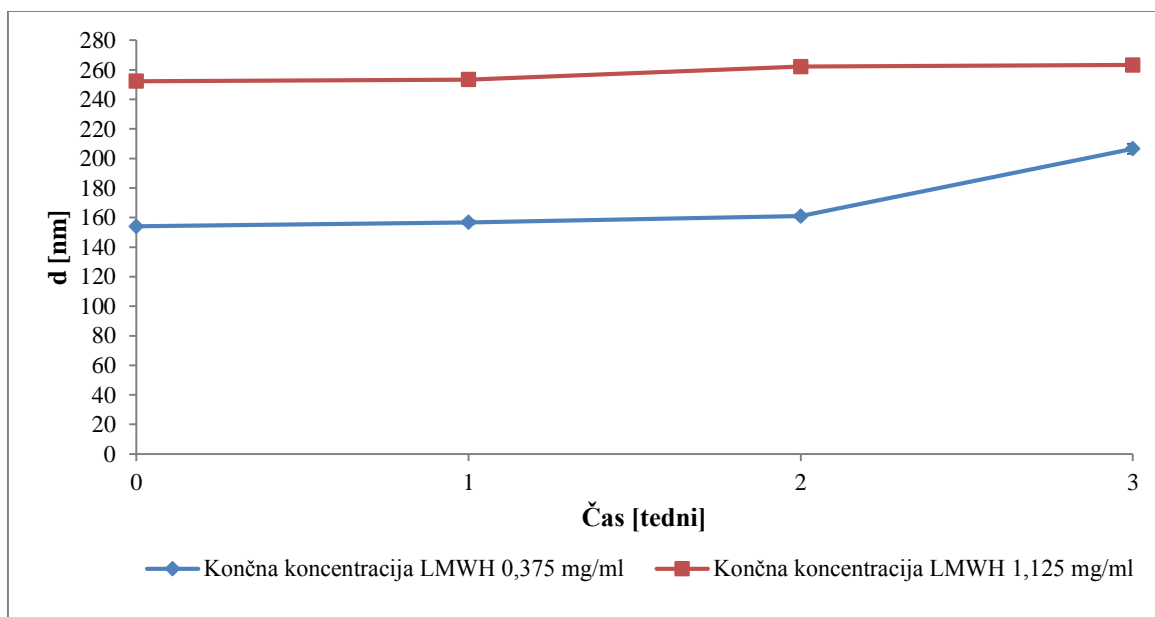
Slika 18: Zeta potencial v odvisnosti od časa shranjevanja (LMWH/hitosan = 1:1,375).



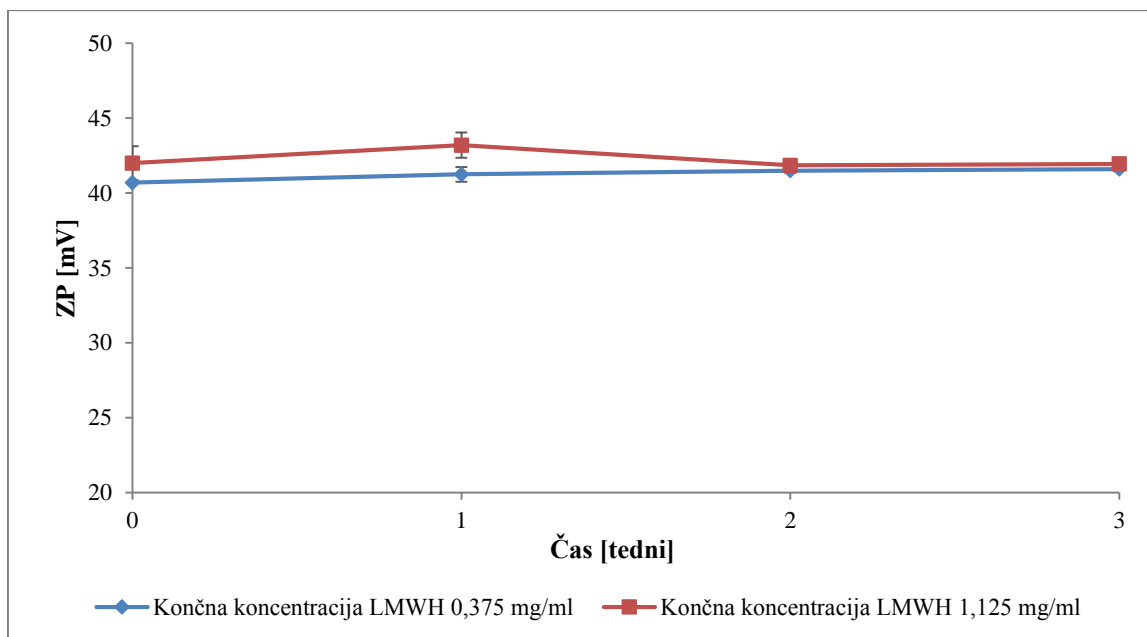
Slika 19: pH v odvisnosti od časa shranjevanja (LMWH/hitosan = 1:1,375).

4.1.7 Fizikalne lastnosti delcev pri uporabljenem masnem razmerju LMWH/hitosan 1:2,0

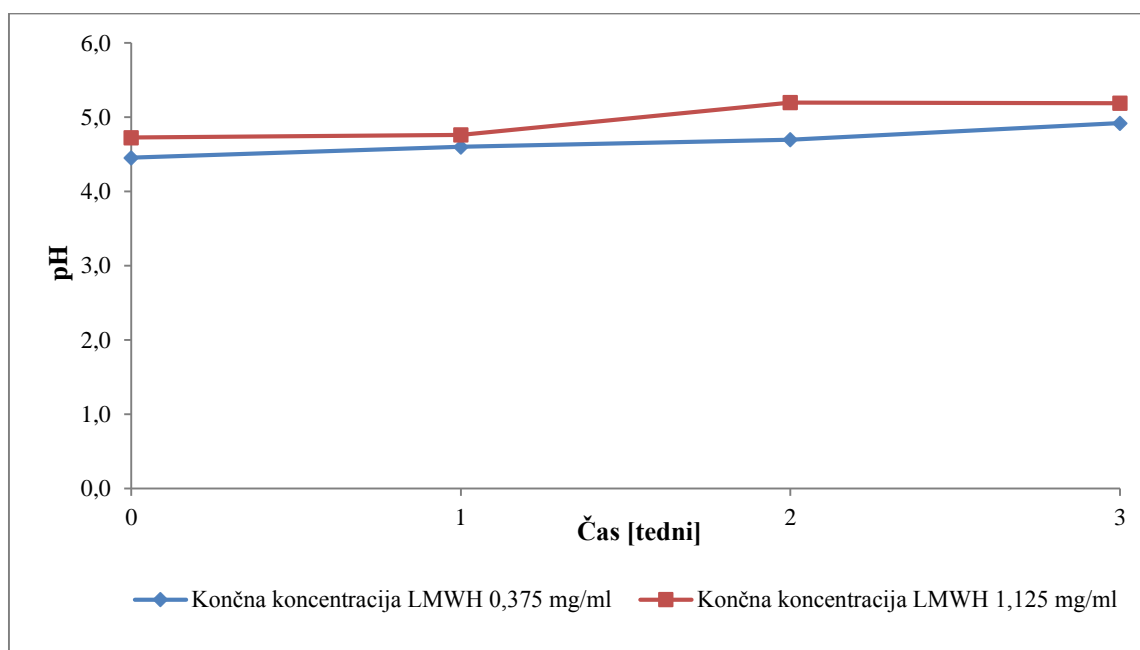
Preverili smo še odvisnost fizikalnih parametrov od časa shranjevanja disperzij nanokompleksov z masnim razmerjem LMWH/hitosan 1:2,0. Rezultati, podani na *slikah 20, 21 in 22*, prikazujejo skoraj popolno ohranjanje vrednosti fizikalnih parametrov z eno samo izjemo. Pri nižji koncentraciji LMWH vidimo na *sliki 20* porast povprečnega premera v tretjem tednu (za približno 45 nm), kar pa je še vedno dokaj majhna sprememba. Tako kot pri razmerju 1:1,375, lahko tudi v tem primeru sklepamo na dolgoročno stabilnost disperzije in ustreznost za nadaljnjo uporabo. Tudi rezultati raziskave, ki so jo opravili Costalat in sodelavci kažejo, da so nanokompleksi med hitosanom in heparinom, ob ustreznem kontroliranem kompleksiranju, stabilni več kot 30 dni tudi pri višjih koncentracijah. Poskus so izvedli v PBS pri sobni in telesni temperaturi. Njihova stabilnostna študija tako zaključuje, da so nanokompleksi primerni za biomedicinsko aplikacijo (56).



Slika 20: Premer delcev v odvisnosti od časa shranjevanja (LMWH/hitosan = 1:2,0).



Slika 21: Zeta potencial v odvisnosti od časa shranjevanja (LMWH/hitosan = 1:2,0).



Slika 22: pH v odvisnosti od časa shranjevanja (LMWH/hitosan = 1:2,0).

4.2 VREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV

4.2.1 Izbor disperzij za vgradnjo v termoreverzibilne hidrokele

Na podlagi rezultatov stabilnostne študije smo izbrali optimalne disperzije, ki smo jih nato vgradili v različne formulacije termoreverzibilnih hidrogelov. Odločili smo se za uporabo disperzij z masnim razmerjem LMWH/hitosan 1:1,375 in 1:2,0. Višja koncentracija LMWH (1,125 mg/ml) je z vidika zagotavljanja ustreznih terapevtskih koncentracij primernejša izbira v primerjavi z nižjo koncentracijo. Tako smo se tudi mi odločili, da za študijo uporabimo disperzije v koncentraciji 1,125 mg/ml.

4.2.2 Izbor sestave termoreverzibilnih hidrogelov

Odločili smo se, da kot dostavni sistem za LMWH uporabimo inteligentni dostavni sistem, in sicer termoreverzibilni hidrogel. Kot je že bilo povedano v poglavju 1.5, hidrogeli izkazujejo primerne lastnosti za to vrsto aplikacije. So biokompatibilni, njihovo mehko in prožno strukturo, ki jih dela podobne tkivom, v največjem deležu sestavlja voda. Tako je tudi verjetnost zavrnitve majhna (28).

Potrebno je bilo izbrati ustrezne polimere, ki izkazujejo edinstveno sposobnost reverzibilnega prehoda iz sol v gel stanje takoj po aplikaciji. Tak dostavni sistem je še posebej primeren za injiciranje, saj se tako *in situ* tvori depo z zdravilno učinkovino. Večina aplikacij temelji na uporabi P407, saj velja za najmanj toksičen komercialno dostopen kopolimer (57). Kot smo že omenili, za poloksamere velja, da pri nizkih koncentracijah tvorijo monomerne micelle. Ob povišanju koncentracije se miceli začnejo združevati v večmolekularne agregate s hidrofobnim jedrom, hidrofilne PEO verige pa sestavljajo njihovo površino in so tako v stiku z medijem. V sistem lahko vgradimo tako hidrofilno kot tudi hidrofobno učinkovino, ki je lahko bolj ali manj topna, z različno molekulsko maso in polarnostjo ter tudi s slabšo stabilnostjo. Predvsem pa je to zelo uporaben dostavni sistem za učinkovine z visoko molekulsko maso in polarnostjo, ki zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti ne morejo biti aplicirane peroralno (58). V vodni raztopini, pri nizki temperaturi molekulo polimera obdaja hidratirana plast. Če pa temperaturo povišamo, pride do dehidracije površinskih verig, prekinejo se vodikove vezi, ki so se vzpostavile med polimerom in topilom. Ta pojav ima za posledico prevlado hidrofobnih interakcij med PPO verigami, kar vodi v nastanek gela (33). Le-to lastnost izkazujejo tudi nekateri celulozni

derivati, vendar morajo imeti ustrezno ravnotežje med hidrofilnimi in hidrofobnimi deli. Tipična primera sta tako metilceluloza in hidroksipropilceluloza. Z višanjem temperature postaja voda vedno slabši medij za raztapljanje, izgublja se vezana hidratna voda. Prevladujoče interakcije postanejo hidrofobne med metoksi substituenti in interpolimerno združevanje pripetih funkcionalnih skupin ima za posledico nastanek gela (36, 40, 57).

Temperatura geliranja izbranih polimerov je za podkožno aplikacijo ključnega pomena. Biti mora višja od sobne temperature, da nam dostavni sistem že pred aplikacijo ne preide v gel stanje, saj bi bila aplikacija tako zelo otežena. Potrebno je tudi, da je nižja od telesne temperature (37 °C), saj se v nasprotnem primeru pod kožo ne bi tvoril gel. Ugotovili so, da se temperatura, pri kateri pride do pretvorbe iz enega stanja v drugega, povečuje ob zniževanju koncentracije poloksamera 407, giblje se nekje med 15 in 30 °C. Za nemodificiran P407 pri 18 m/m % tako znaša okrog 25 °C (30). Ugotovljeno je bilo tudi, da če k P407 dodamo še nizkomolekularni P188, se temperatura geliranja poveča (59). Temperatura geliranja je za celulozne derivate odvisna od substitucije na hidroksi skupini (57). Dodatek HPMC poloksamerom pa ima na temperaturo geliranja takšen vpliv, da le-to znižuje (59). Tudi heparin odločilno vpliva na temperaturo prehoda iz sol v gel stanje, saj slednjo zniža. To so raziskovali Chung in sodelavci, ki so v svoji raziskavi proučevali vpliv dodatka heparina na lastnosti P407 hidrogela. Zanimalo jih je torej, kako vplivajo interakcije med heparinom in P407 na lastnosti hidrogela. Njihovi rezultati kažejo na to, da interakcije pospešujejo združevanje posameznih micelov polimera, pri čemer so interakcije dovolj močne, da tvorijo stabilen gel. Povezave so najverjetneje posledica intermolekularnih vodikovih vezi med karboksilno skupino heparina in etrsko skupino PEO verige poloksamera, kar rezultira v zamreženje micelov. Potencialna funkcionalna skupina heparina za tvorbo vodikovih vezi s PEO pa je tudi sulfatna skupina. Ugotovili so tudi, da premreževanje heparina in poloksamera povzroči gostejše zvijanje enot v primerjavi s samim polimerom (60).

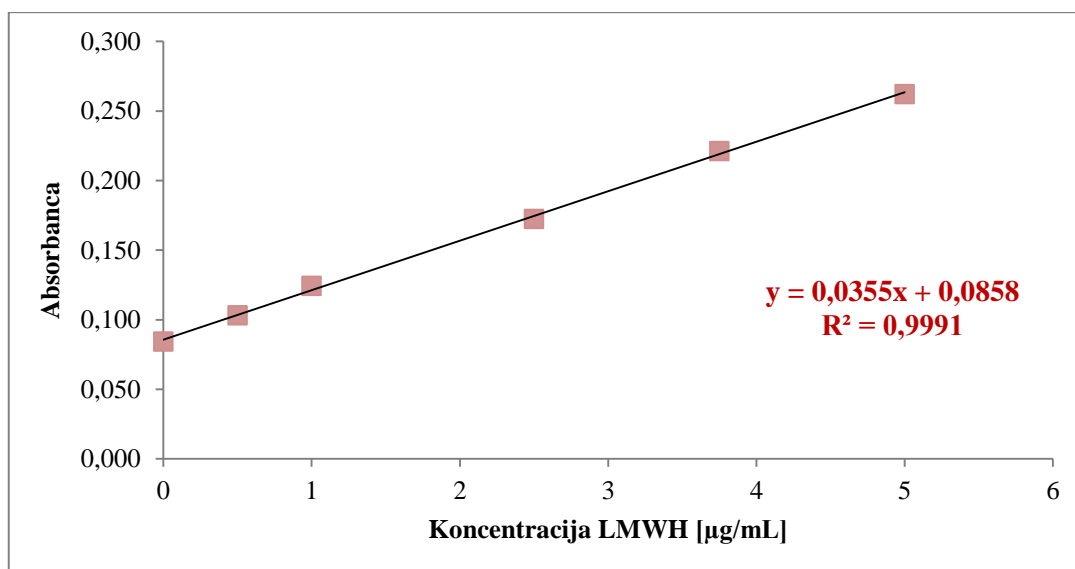
V preglednici IX smo predstavili sestavo treh formulacij, ki smo jih uporabili za *in vitro* poskus sproščanja LMWH in raztapljanja hidrogelov. Odločili smo se za uporabo formulacij, kjer je P407 zastopan v 18 % masnem deležu. Pri formulaciji 1 smo uporabili le-tega, za formulacijo 2 pa smo dodali še 1 % poloksamera 188. V zadnjem primeru smo poleg obeh poloksamerov v 1 % dodali še HPMC in tako dobili formulacijo 3. Zaradi boljše preglednosti smo jih označili s kraticami.

Preglednica IX: Sestava termoreverzibilnih hidrogelov z nanokompleksi LMWH in hitosana (ND1-ND3) in raztopinami LMWH (R1-R3).

Formulacija	P407/P188/HPMC (m/m %)
F1 (ND1 in R1)	18/0/0
F2 (ND2 in R2)	18/1/0
F3 (ND3 in R3)	18/1/1

4.2.3 Priprava umeritvene krivulje

Da bi lahko spektrofotometrično določili koncentracijo sproščenega LMWH pri *in vitro* poskusu sproščanja učinkovine, smo morali najprej določiti, kakšna je odvisnost absorbance od koncentracije kompleksa med LMWH in barvilom Azure A. Ob ustreznem redčenju raztopine barvila smo dobili točke na linearni premici z enačbo $0,0355x + 0,0858$ (slika 23). Vrednost korelacijskega koeficienta R^2 je znašala 0,9991 in se tako močno približala vrednosti 1. Iz tega torej lahko sklepamo, da bodo koncentracije LMWH izračunane po tej enačbi točne.



Slika 23: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije LMWH.

4.2.4 Sproščanje LMWH iz termoreverzibilnih hidrogelov

Zanimal nas je vpliv sestave hidrogelov na sproščanje LMWH. Želeli smo ugotoviti, kako lahko na proces sproščanja vplivamo z uporabo različnih kombinacij polimerov. Nadalje nas je zanimalo, kakšne so razlike, če pri tem uporabimo različno tekočo fazo, torej kako poteka sproščanje ob vgrajeni raztopini učinkovine in kako ob uporabi hitosanskih nanokompleksov in če tudi različna količina hitosana vpliva na ta proces.

Poskus smo izvedli v termostahirani vodni kopeli s temperaturo 37 °C (telesna temperatura). Pogoje za izvedbo *in vitro* poskusa smo v celoti poskušali čim bolj približati fiziološkim. Ob subkutani aplikaciji pride do direktnega stika hidrogela z ekstracelularno tekočino (59). Tako smo se odločili za uporabo sistema, ki ne vsebuje membrane, saj je v tem primeru površina gela v neposrednem stiku z raztopino medija, za razliko od druge vrste poskusov, kjer imamo vmes prisotno še membrano. Ustrezno je bilo potrebno prilagoditi tudi pH medija, uporabili smo fosfatni pufer s pH 7,4. Volumen ekstracelularne tekočine, ki pride direktno v stik s hidrogelom ni velik, tako da smo se odločili, da 1 ml gela prelijemo z 2 ml medija. V določenih časovnih točkah smo odvzeli 0,5 ml medija, odvzeto pa smo nato nadomestili z enakim volumnom svežega in predhodno segretega PBS. Vzorec smo nato ustrezno redčili, mu dodali barvilo Azure A in s pomočjo indirektno spektrofotometrične metode določili sproščen delež učinkovine.

Sproščanje iz hidrogelov je lahko kontrolirano preko več mehanizmov, in sicer preko difuzije skozi gel, preko nabrekanja hidrogela, lahko pa je kontrolirano tudi kemijsko. Najbolj pogost mehanizem kontrole sproščanja je preko difuzije. Temelji na Fickovem zakonu, pri čemer je lahko difuzijski koeficient konstanten ali pa se spreminja. Sproščanje kontrolirano z nabrekanjem gela se pojavi takrat, ko je difuzija učinkovine hitrejša kot nabrekanje gela. Zadnji tip mehanizma sproščanja je kemijsko kontrolirano sproščanje. Pri tem lahko odločilno vlogo igra razgradnja polimera ali pa so za potek sproščanja zaslužni tako razgradnja polimera kot tudi interakcije med učinkovino in polimerom (61).

4.2.4.1 Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov na sproščanje LMWH

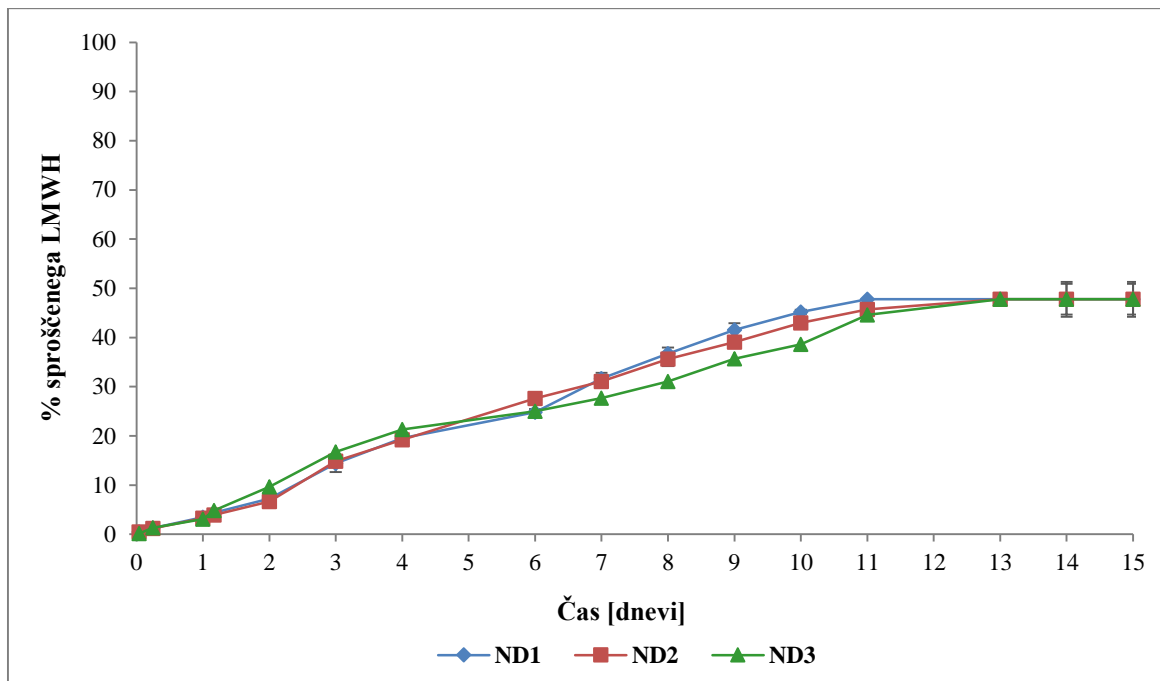
Primerjali smo profile sproščanja LMWH iz nanokompleksov z različnim masnim razmerjem LMWH/hitosan, vgrajenih v različne formulacije termoreverzibilnih hidrogelov. Kot vidimo na *slikah 24 in 25*, so profili sproščanja med seboj zelo podobni, tako če primerjamo različno polimerno sestavo hidrogelov, kot tudi ob primerjavi uporabe različnih masnih razmerij LMWH/hitosan. Sproščanje je zelo počasno, saj se je po 15 dneh sprostilo približno 50 % učinkovine, tako pri masnem razmerju LMWH/hitosan 1:1,375 kot tudi pri 1:2,0. Opazili smo, da je bila hitrost sproščanja pri tem enakomerna. Pričakovali smo, da bo HPMC zaradi svojih lastnosti hitrost sproščanja izrazito upočasnila, kar pa se ni zgodilo. Iz rezultatov smo zaključili, da različna polimerna sestava formulacij termoreverzibilnih hidrogelov, skoraj nima vpliva na potek sproščanja LMWH, če je le-ta kompleksiran s hitosanom.

Odstotki sproščene učinkovine so po določenih časih izkazovali zelo podobne vrednosti, pri obeh uporabljenih masnih razmerjih. Vzroke, zakaj se je sprostilo manj učinkovine, kot smo jo vgradili, lahko iščemo v hitri spremembi pH vrednosti ob sprostitvi kompleksa v okoliški medij, ki lahko povzroči precipitacijo. Kot je že bilo navedeno, nanokompleksi so ob povišanju pH nad vrednost 7,0 nestabilni zaradi zmanjšane odboja med delci, kot posledice deprotonacije hitosanskih verig (11).

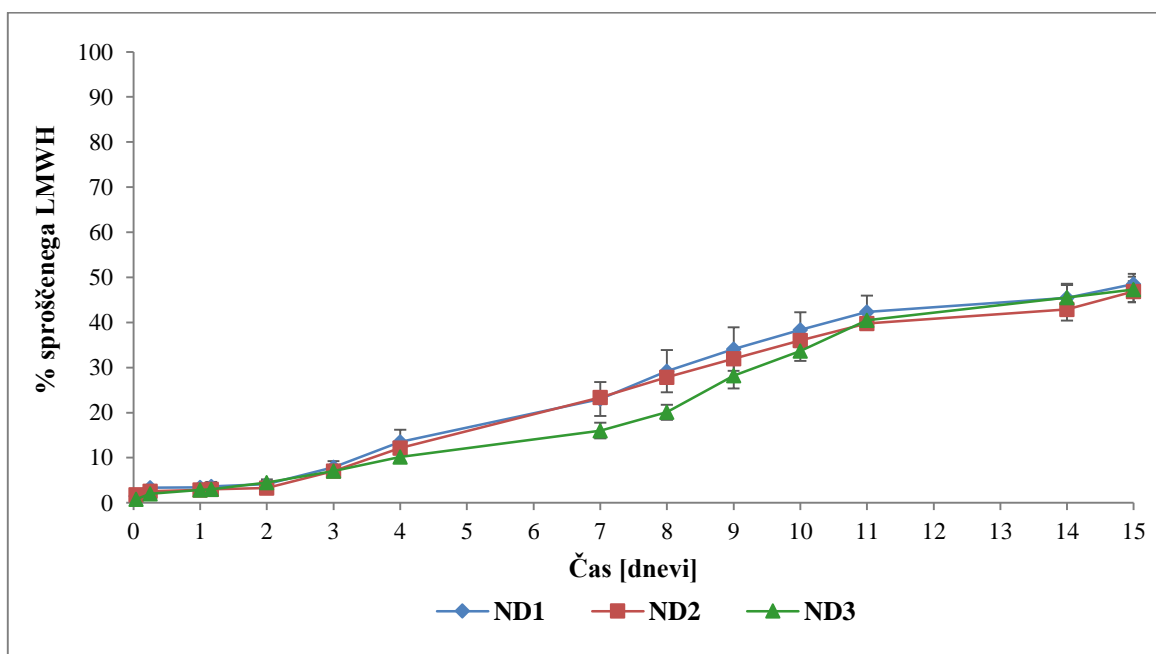
Če predhodne rezultate primerjamo s sproščanjem LMWH iz hidrogelov z raztopino, prikazanim na *sliki 26*, vidimo drugačne profile. Pri formulacijah, ki so vsebovale le P407 oz. kombinacijo obeh poloksamerov (R1 in R2) je sproščanje potekalo le 4 dni, ob dodatku HPMC (R3) pa se je hitrost zmanjšala in sproščanje se je podaljšalo na 8 dni. Sklepamo lahko, da je vzrok tega močnejše nabrekanje HPMC, kar ima za posledico sproščanje učinkovine iz hidrogela preko difuzije (30, 60). Vrednosti sproščene učinkovine so bile pri vseh formulacijah z raztopino visoke in so znašale >90%. Polimerna sestava hidrogelov tako močnejše vpliva na sproščanje učinkovine ob vgradnji raztopine LMWH, kot pri formulacijah z nanokompleksi.

Ob primerjavi profilov sproščanja LMWH iz formulacij, kjer smo kot tekočo fazo hidrogelov uporabili raztopino učinkovine in kjer disperzije nanokompleksov, smo ponovno potrdili

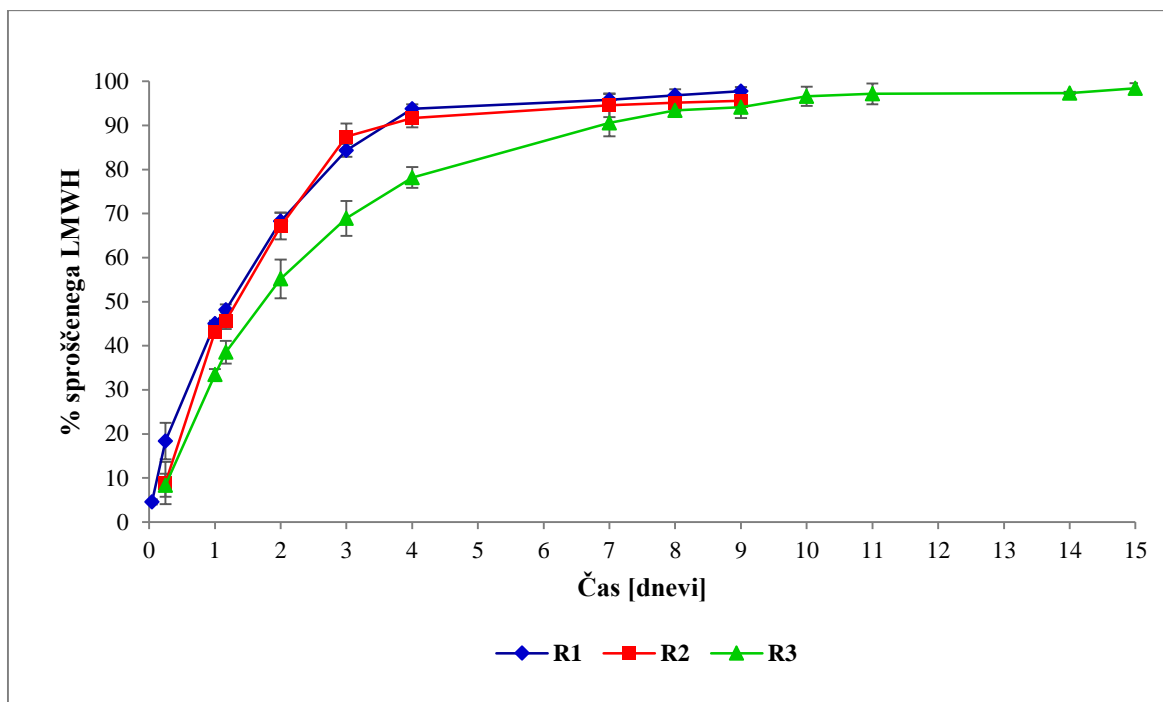
pomembnost predhodnega kompleksiranja učinkovine pri podaljšanjem sproščanju. Učinkovina se je v slednjem primeru sproščala dlje časa in z enakomerno hitrostjo.



Slika 24: Odstotek sproščenega LMWH iz nanokompleksov z masnim razmerjem LMWH/hitosan 1:1,375, vgrajenih v formulacije različnih termoreverzibilnih hidrogelov, v odvisnosti od časa.



Slika 25: Odstotek sproščenega LMWH iz nanokompleksov z masnim razmerjem LMWH/hitosan 1:2, vgrajenih v formulacije različnih termoreverzibilnih hidrogelov, v odvisnosti od časa.



Slika 26: Odstotek sproščenega LMWH iz raztopine učinkovine, vgrajene v formulacije različnih termoreverzibilnih hidrogelov, v odvisnosti od časa.

4.2.5 Raztapljanje termoreverzibilnih hidrogelov

Zanimalo nas je, kako hitro se raztapljajo različne formulacije hidrogelov. Proučevali smo vpliv posameznih sestavin formulacij in dodanih nanokompleksov oz. raztopine same učinkovine na potek raztapljanja hidrogelov. Poskus je potekal istočasno kot proučevanje sproščanja LMWH. Uporabili smo torej termostatirano vodno kopel s temperaturo 37 °C. 1 ml hidrogela smo prelili s PBS s pH 7,4 in v določenih časovnih točkah nato na graduiranih epruveh preverjali, za koliko se je znižal nivo hidrogela. Vsak poskus je bil izveden trikrat.

V splošnem je raztapljanje poloksamernega hidrogela kontrolirano z mehanizmom površinske razgradnje. V vodi poteka ionizacija, protonacija ali hidroliza netopnih stranskih funkcionalnih skupin, kar vodi v pretvorbo v vodotopne polimere (62).

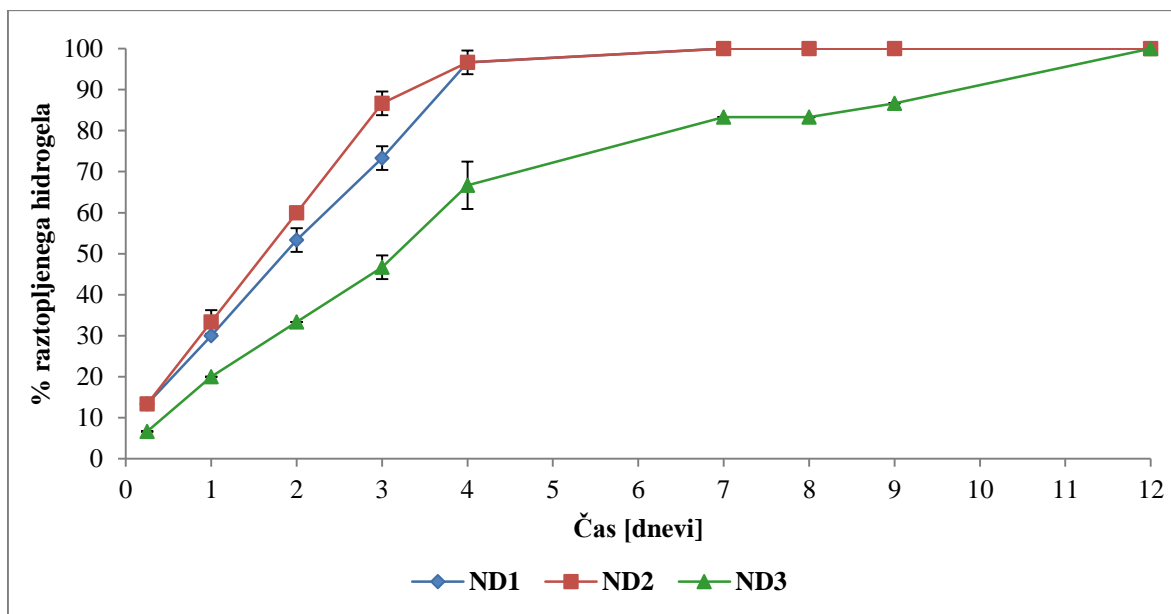
4.2.5.1 Vpliv sestave termoreverzibilnih hidrogelov na njihovo raztapljanje

Pri formulacijah 1 in 2 je ob uporabi raztopine LMWH prišlo do popolne raztopitve že po 4 dneh, kar lahko vidimo na *sliki 29*. Dodatek hitosanskih nanokompleksov je, kot je prikazano na *slikah 27 in 28*, potek raztapljanja podaljšal na 7 dni, pri čemer pa moramo vseeno pomisliti na možnost, da je do raztopitve prišlo že kakšen dan prej, vendar tega zaradi nevsakodnevnega vzorčenja nismo opazili.

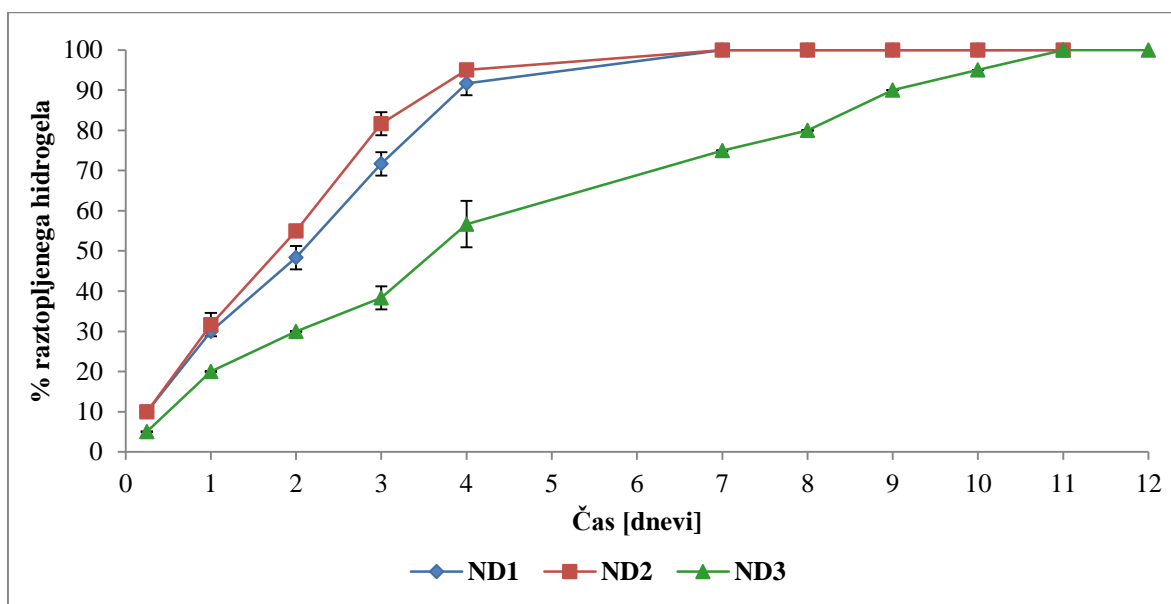
Iz grafičnega prikaza rezultatov na *slikah 27, 28 in 29* smo ugotovili, da če smo k 18 % P407 dodali 1 % P188, se je raztapljanje hidrogelov pospešilo. V skoraj vseh točkah vzorčenja smo tako opazili višji odstotek raztopitve hidrogela v primerjavi s formulacijo 1. Vendar pa na čas, ko se je hidrogel popolnoma raztopil, dodatek ni vplival. Naši rezultati so tako v skladu s pričakovanji, saj P188 zaradi PEO verig izkazuje večjo hidrofilnost in tako poveča hitrost raztapljanja.

Ob uporabi kombinacije poloksamerov z dodatkom HPMC smo raztapljanje občutneje podaljšali. Pri masnem razmerju LMWH/hitosan 1:2,0 se je gel popolnoma raztopil po 11 dneh, pri nižji koncentraciji LMWH in hitosana pa je bilo za raztopitev potrebnih 12 dni. Raztopitev hidrogela z raztopino LMWH smo tudi opazili ob vzorčenju 11. dan. Čas raztapljanja se je tako v primerjavi z le poloksamernimi formulacijami (F1 in F2) podaljšal za 7 dni. Ta pojav lahko pripišemo dejstvu, da HPMC v vodnih medijih intenzivno nabreka, pri čemer pride do tvorbe neurejenih tridimenzionalnih struktur. Hitrost difuzije medija v sam hidrogel se ob nabrekanju polimernih verig zmanjša in tako se posledično upočasni tudi raztapljanje samega hidrogela (59).

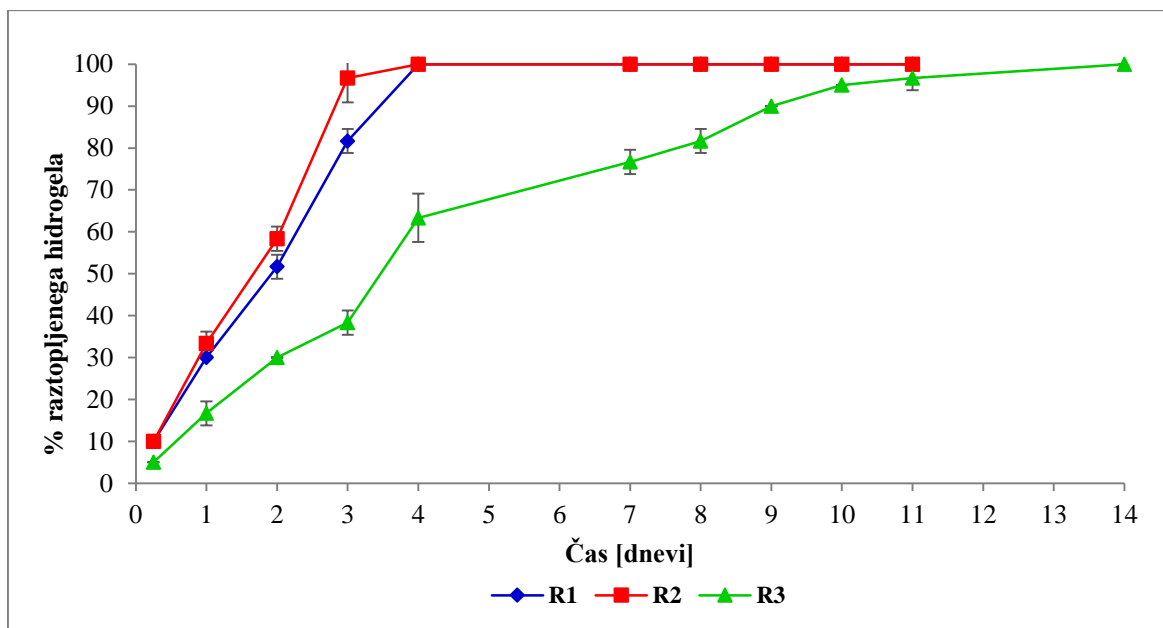
Ob primerjavi profilov raztapljanja pri vzorcih, kjer so tekočo fazo hidrogela sestavljale disperzije nanokompleksov in kjer smo uporabili raztopino LMWH, smo ugotovili, da so profili precej podobni. Iz rezultatov tako lahko sklepamo, da dodatek nanokompleksov na raztapljanje hidrogelov ne vpliva.



Slika 27: Raztapljanje formulacij termoreverzibilnih hidrogelov z nanokompleksi z masnim razmerjem LMWH/hitosan 1:1,375, v odvisnosti od časa.



Slika 28: Raztapljanje formulacij termoreverzibilnih hidrogelov z nanokompleksi z masnim razmerjem LMWH/hitosan 1:2,0, v odvisnosti od časa.



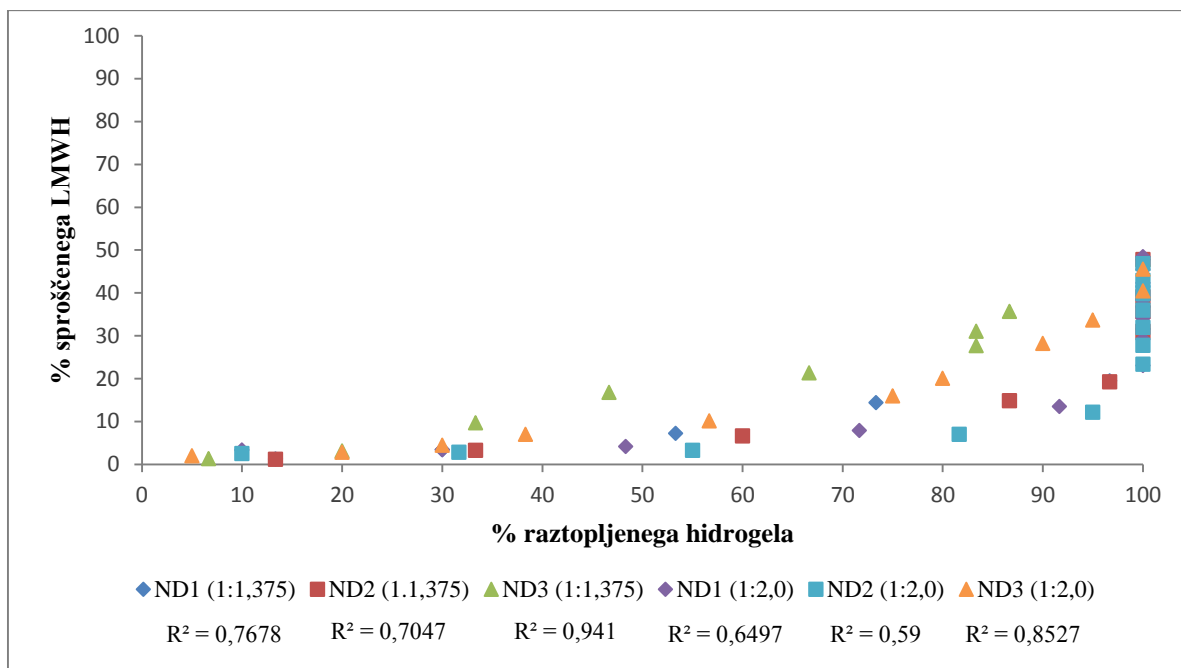
Slika 29: Raztapljanje formulacij termoreverzibilnih hidrogelov z raztopinami LMWH v koncentraciji 1,125 mg/ml, v odvisnosti od časa.

4.2.6 Odvisnost sproščanja LMWH od časa raztapljanja hidrogela

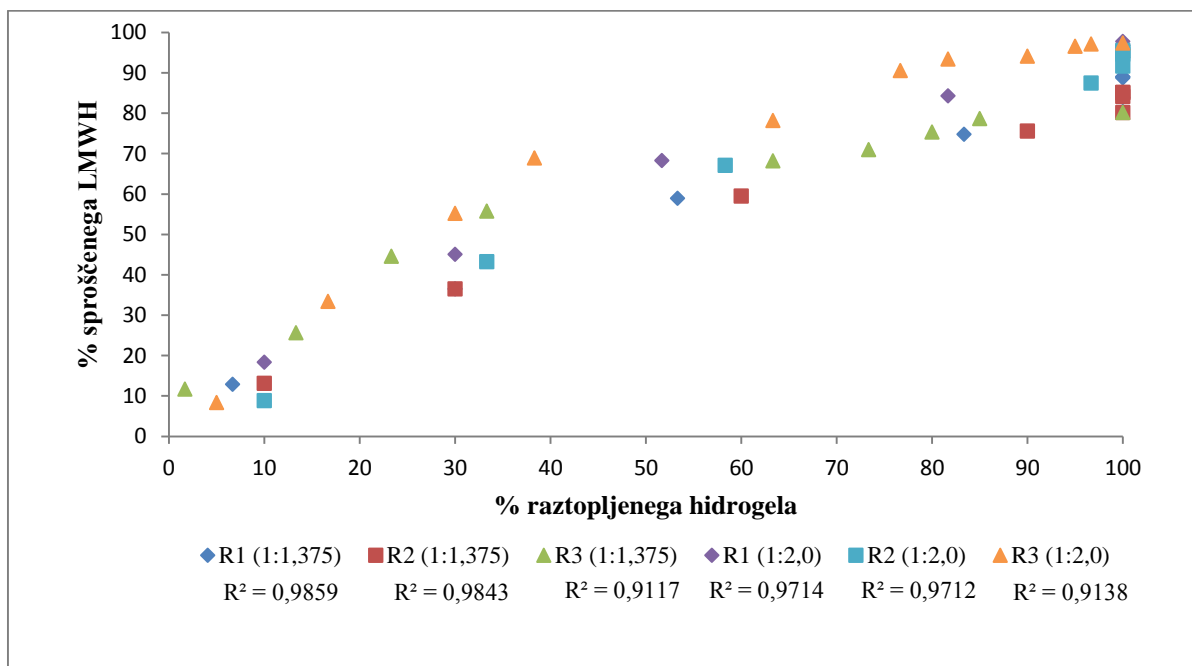
Preverili smo ali obstaja korelacija med hitrostjo sproščanja učinkovine in hitrostjo raztapljanja hidrogela.

S *slike 30* lahko razberemo, da sproščanje LMWH iz hitosanskih nanokompleksov ni v korelaciji z raztapljanjem hidrogela. Iz tega lahko sklepamo, da je poglavitni proces, ki je zaslužen za sprostitvev učinkovine iz vseh treh formulacij (ND1, ND2 in ND3) razpad nanokompleksov.

Na *sliki 31* imamo prikazano korelacijo med odstotkom sproščene učinkovine in odstotkom raztopljenega hidrogela z raztopino LMWH. Ugotovili smo, da obstaja korelacija le v primeru poloksamernih formulacij (R1 in R2), pri obeh masnih razmerjih LMWH/hitosan, saj so vrednosti R^2 presegale 0,95. Zaključimo lahko, da je sproščanje v glavnem pogojeno z raztapljanjem hidrogela, preko površinske razgradnje. Pri formulaciji 3 (R3) o takšni korelaciji ne moremo govoriti. Dodatek HPMC povzroči, da se strukture gela tesneje med seboj povežejo in močnejše nabrekajo (59). S tem se sproščanje upočasni, večjo vlogo pri tem procesu pa ima difuzija skozi gel, ne samo raztapljanje. To se sklada tudi z dejstvom, da se je >93% LMWH sprostito po 8 dneh, torej še preden je bil raztopljen skoraj ves hidrogel (>96% v 11 dneh).



Slika 30: Odstotek sproščenega LMWH iz hidrogelov z nanokompleksi v odvisnosti od odstotka raztopljenega hidrogela.



Slika 31: Odstotek sproščenega LMWH iz hidrogelov z raztopino LMWH v odvisnosti od odstotka raztopljenega hidrogela.

5. SKLEP

Z metodo polielektrolitnega kompleksiranja smo izdelali nanokomplekse hitosana in nizkomolekularnega heparina. Uporabili smo masna razmerja LMWH/hitosan od 1:0,5 do 1:4,0, pri čemer sta končni koncentraciji LMWH v nastalih nanokompleksih znašali 0,375 mg/ml in 1,125 mg/ml. S preverjanjem fizikalnih lastnosti (velikost, PDI, zeta potencial in pH) smo ugotovili:

- Pri koncentraciji LMWH 0,375 mg/ml smo stabilne nanokomplekse tvorili pri masnih razmerjih LMWH/hitosan v območju od 1:1,375 do 1:4,0, najmanjši premer delcev (121 nm) smo dosegli ob razmerju 1:1,375.
- Ko smo koncentracijo LMWH zvišali na 1,125 mg/ml se je povprečni premer nastalih delcev zvišal. Ponovno so bili delci najmanjši (176 nm) pri razmerju 1:1,375, stabilnost nastale disperzije pa smo dokazali še vse do razmerja 1:2,0.
- Vrednosti PDI so bile pri ustrezne ($<0,3$) pri vseh razmerjih in koncentracijah, ki so dajale stabilne nanokomplekse.
- Povprečne vrednosti zeta potenciala so pri razmerjih s pozitivnim površinskim nabojem znašale 42 mV, kar kaže na močan odboj med delci in posledično visoko kinetično stabilnost nastale disperzije.
- Izoelektrična točka ($ZP=0$ mV) se je močno približala masnemu razmerju LMWH/hitosan 1:1,250.
- Vse od masnega razmerja LMWH/hitosan 1:1,125 naprej so bile vrednosti pH v optimalnem območju (3,9-5,6).
- Po pregledu vseh fizikalnih parametrov smo ugotovili, da sta optimalni masni razmerji LMWH/hitosan 1:1,375 in 1:2,0.

Ob preverjanju učinkovitosti vgradnje LMWH smo ugotovili, da smo pri vseh testiranih nanodisperzijah dosegli izredno visok delež vgrajene ZU ($>99,8\%$).

Disperzije optimalnih lastnosti (masno razmerje 1:1,375 in 1:2,0 v obeh koncentracijah) smo nato spremljali še skozi tri tedensko obdobje in ugotovili, da se fizikalne lastnosti skozi ta čas niso spremenile. Tako smo torej dokazali še stabilnost skozi daljši čas in primernost za *in vitro* poskuse.

V nadaljevanju smo izdelali tri različne formulacije termoreverzibilnih hidrogelov z vgrajenimi optimalnimi disperzijami nanokompleksov in raztopinami LMWH, oboje v koncentraciji 1,125 mg/ml. Izvedli smo *in vitro* poskus sproščanja LMWH in poskus raztapljanja hidrogelov ter prišli do naslednjih ugotovitev:

- Sproščanje LMWH iz nanokompleksov je tako pri masnem razmerju 1:1,375 kot tudi pri 1:2,0, znašalo 15 dni, pri tem se je sprostilo približno 50 % učinkovine.
- Različna polimerna sestava formulacij ni imela učinka na sproščanje LMWH iz nanokompleksov. Sproščanje je bilo pogojeno z mehanizmom razgradnje nanokompleksov.
- Poloksamerne formulacije z raztopino LMWH so učinkovino sprostile po 4 dneh (>91 %), dodatek HPMC pa je sproščanje podaljšal na 8 dni (>93 %).
- Dodatek visoko nabreklivega HPMC je povzročil tudi občutno daljši čas raztapljanja (11 dni) v primerjavi s formulacijama 1 in 2 (4 dni). Z dodanim P188 smo povečali hidrofilnost in tako smo pričakovano dosegli hitrejše raztapljanje.
- Na kinetiko raztapljanja formulacij hidrogelov ne vplivamo z dodatkom nanokompleksov.
- Pri formulacijah 1 in 2, pri katerih smo kot tekočo komponento uporabili raztopino LMWH smo opazili pozitivno linearno odvisnost med sproščanjem LMWH in hitrostjo raztapljanja hidrogela. V tem primeru je sproščanje pogojeno s površinsko razgradnjo hidrogelov.

Iz rezultatov lahko zaključimo, da so termoreverzibilni hidrogeli, pri katerih tekočo fazo predstavljajo disperzije hitosanskih nanokompleksov z učinkovino, potencialno primeren dostavni sistem za zagotovitev podaljšanega sproščanja LMWH.

6. LITERATURA

1. Mirković B, Lah Turnšek T, Kos J: Nanotehnologija pri zdravljenju raka. *Zdrav Vest* 2010; 79 : 146-155
2. Remškar M: Nanodelci in nanovarnost. Ljubljana : Ministrstvo za zdravje/Urad RS za kemikalije 2009; 14-26
3. Kristl J: Vpliv nanotehnologije na razvoj zdravil. *Farm Vestn* 2012; 63: 67-73
4. https://www.google.si/search?q=nanomedicine&espv=2&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMIscqpuLWHxgIVhYYsCh2x8wDQ#imgrc=qXMyErz7coJUGM%253A%3Bp5pi54LO2lSc5M%3Bhttp%253A%252F%252Ffarm2.static.flickr.com%252F1243%252F1413772971_dc8928259f_o.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fnanoparticledrugdelivery.blogspot.com%252F2007%252F09%252Fintroduction-to-nanopharmaceuticals.html%3B720%3B502; dostopano november 2014
5. Cegnar M., Kerč J: Nanozdravila. *Farm Vestn* 2012; 63: 75-81
6. Obermajer N, Kos J, Kristl J: Nanodelci: Sodobni dostavni sistem za učinkovine in antigene celicam imunskega sistema. *Farm Vestn* 2007; 58 : 39-44
7. Cegnar M., Kristl J, Kos J: Oblikovanje nanodelcev s proteini. *Farm Vestn* 2003; 54: 37-46
8. Peterlin Mašič L: Učinkovine, ki vplivajo na trombozo. *Farm Vestn* 2014; 65: 118-128
9. Kikelj D: Antitrombotična zdravila pri starostnikih. *Farm Vestn* 2005; 56: 78-82
10. Lindahl U: Biosynthesis of heparin and related polysaccharides. In heparin: Chemical and biological properties, clinical applications. Lane D A, Lindahl U, Edward A. London; 159-189
11. Lin Y H, Chang C H, Wu Y S, Hsu Y M, Chiou S F, Chen Y J: Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Biomaterials* 2009; 30: 3332-3342
12. https://www.google.si/search?q=heparin+structure&espv=2&biw=1366&bih=643&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&sqi=2&ved=0CB0QsARqFQoTCMnY78q1jcYCFUOh2wodgb0A0w#tbm=isch&q=heparin+chemical+structure&imgrc=TTPmXVTiN6_JIM%253A%3B8K6GU9Hak8A15M%3Bhttp%253A%252F%252Fpolysac3db.cer mav.cnrs.fr%252Fimages%252Fheparin-repeat-

- unit.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fpolysac3db.cermav.cnrs.fr%252Fdiscover_GAGs.html%3B1331%3B736; dostopano junij 2015
13. Luelmann H et al.: Color atlas of pharmacology. 4th edition. Stuttgart : Tieme 2010; 146-147
 14. Rang H P, Dale M M: Rang&Dale's pharmacology. 7th edition. Edinburg: Churchill Livingstone 2011; 331-346
 15. https://www.google.si/search?q=coagulation+cascade&espv=2&biw=1366&bih=599&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMI36ean9KNxgIVKeFYCh1fdgC-#imgrc=I7h9Wa0NCaL7TM%253A%3BPGzueo5Xn6jC6M%3Bhttps%253A%252F%252Fittakes30.files.wordpress.com%252F2010%252F10%252Fclotting-cascade.jpg%3Bhttps%253A%252F%252Fittakes30.wordpress.com%252F2010%252F10%252F21%252Fto-clot-or-not-the-trigger-for-coagulation%252F%3B1420%3B1160; dostopano junij 2015
 16. Presad Y, Minamimoto Y, et al.: In situ intestinal absorption studies on low molecular weight heparin in rats using Labrasol as absorption enhancer. *Int J Pharm* 2004; 271: 225-232
 17. Paliwal R, Paliwal R S, Agrawal P G, Vyas P. S. Chitosan nanoconstructs for improved oral delivery of low molekular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm* 2012; 422: 179-184
 18. Hejazi R, Amiji M: Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *J Control Release* 2003; 89 : 151-165
 19. Kerec Kos M: Uporaba hitosana v farmaciji. *Farm Vestn* 2006; 57: 287-291
 20. Erman A: Hitosan in možna uporaba v medicini. *Zdrav Vestn* 2011; 80: 489-498
 21. Illum R: Chitosan and its use as a pharmaceutical excipients. *Pharm Res* 1998; 15: 1326-1331
 22. https://www.google.si/search?q=chitosan&espv=2&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMIv7HWn7aHxgIVZVnbCh2GnQDZ#imgrc=pWKyGhqdp90zOM%253A%3BDlxYuN9JFseeaM%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.falcon18.com%252Fhealth-blog%252Fimages%252Fproduct_images%252FherbImg%252Fchitosan.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.falcon18.com%252Fhealth-blog%252FBest-Ingredient-

- And-Herbs%252FTo-Know-About-Chitosan%252FBenefits-and-Advantages-of-Chitosan.html%3B1825%3B708; dostopano november 2014
23. Etrych T, Leclercq L, Boustta M, Vert M: Polyelectrolyte complex formation and stability when mixing polyanions and polycations an salted media: A model study related to the case of body fluids. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005; 25: 281-288
 24. Sun W, Mao S, Mei D, Kissel T: Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and enoxaparin. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69: 417-425
 25. Sun W, Mao S, Wang Y, Junyaprasert V B, Zhang T, Na L, Wang J: Bioadhesion and oral absorption of enoxaparin nanocomplexes. *Int. J. Pharm.* 2010; 386: 275-281
 26. Liu Z, Jiao Y, Liu F, Zhang Z: Heparin/chitosan nanoparticle carriers prepared by polyelectrolyte complexation. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83: 806-812
 27. Hoffman A S: Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64: 18-23
 28. Abramović Z, Kristl J: Inteligentni hidrogeli za dostavo zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn* 2004; 55: 555-563
 29. Han Gon C, Mi Lyung L, Moon Hee K, Chong Kook K: Effect of additives on the physicochemical properties of liquid suppository bases. *Int J Pharm* 1999; 190: 13-19
 30. Dumortier G, Grossiord J L, Agnely F, Chaumeil J C: A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Research* 2006; 23: 2709-2728
 31. https://www.google.si/search?q=poloxamers&espv=2&biw=1366&bih=643&site=webhp&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAcQ_AUoAmoVChMI2pWJwbeHxgIVxo0sCh0KhAAS#imgrc=6ib2bj9VMeIT_M%253A%3BDlyq_ReF7YBfpM%3Bhttps%253A%252F%252Fwww.medicinescomplete.com%252Fmc%252Fexcipients%252F2012%252FExcpoloxamerC001_default.png%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.lookfor diagnosis.com%252Fmesh_info.php%253Fterm%253DPoloxamer%2526lang%253D1%3B389%3B145; dostopano januar 2015
 32. European Pharmacopoeia 5.0. Monographs: Poloxamers. 5th edition. Strasbourg: Council of Europe 2004; 2264-2265
 33. Escobar Chavez J J, Lopez-Cervantes M, Naik A, Kalia Y N, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A: Applications of thermoreversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2006; 9: 339-358

34. BASF. The Chemical Company. Pharma Ingredients & Services: Lutrol® L and Lutrol F-Grades. Germany 2010; 3-4
35. Obreza A, Bevc B, Baumgartner S, Sollner Dolenc M, Humar M: Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravlju. Ljubljana 2015; 17, 208-210
36. Li C L, Martini L G, Ford J L, Roberts M: The use of hypromellose in oral drug delivery. J Pharm Pharmacol 2005; 57: 533-546
37. https://www.google.si/search?q=hpmc&espv=2&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMItZXsyLiHxgIVRYYSCh0xCAEr#tbm=isch&q=methocel&imgc=GxrwyiwrV8yRNM%253A%3BPDzret_vpr2vFM%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.dow.com%252Fpublic_images%252Fpc%2526t%252Fmethocelcr_chemical_structure_pg9.gif%3Bhttp%253A%252F%252Fdowac.custhelp.com%252Fapp%252Fanswers%252Fdetail%252Fa_id%252F1178%3B422%3B337; dostopano januar 2015
38. Siepmann J, Peppas N A: Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). Adv Drug Deliv Rev 2001; 48: 139-157
39. European Pharmacopoeia, 7th edition. Strasbourg: Council Of Europe 2010; 2219
40. The Dow Chemical Company: Using METHOCEL Cellulose Ethers for Controlled Release of Drugs in Hydrophilic Matrix Systems. USA 2000;
41. Malvern Instruments Ltd: Introducing the Zetasizer Nano. Zetasizer Nano user manual. MAN0485 2013; od 2-6 do 2-9
42. Malvern Instruments Ltd: Measurement theory. Zetasizer Nano user manual. MAN0485 2013; od 11-1 do 11-8 in 13-1 do 13-12
43. Chen M C, Wong H S, Lin K J, Chen H L, Wey S P, Sonaje K, Lin Y H, Chu C Y, Sung H W: The characteristics, biodistribution and bioavailability of chitosan-based nanoparticulate system for the oral delivery of heparin. Biomaterials 2009; 30: 6629-6637
44. https://www.google.si/search?q=zeta+potential&espv=2&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMIocTK-bmHxgIVAXDbCh2wuwCx#imgc=mP-da019BwhO4M%253A%3BE0sjDSh_DR4XhM%3Bhttp%253A%252F%252F50.87.149.212%252Fsites%252Fdefault%252Ffiles%252Fimages%252Fknowledge-base%252Fgeneral%252FZeta_potential.png%3Bhttp%253A%252F%252Fnanocompo

- six.com%252Fpages%252Fcharacterization-techniques%3B300%3B357; dostopano november 2014
45. Mettler-Toledo AG. A guide to pH measurement. Switzerland 2013; 9-18 in 71-84
46. Agilent Technologies: Agilent 8453 UV-visible spectroscopy system. Operator's manual. Germany 2002; 9-13
47. Skoog D A, Holler F J, Nieman T A: Principles of instrumental analysis. 5th edition. Harcourt Brace&company, USA 1998; 300-354
48. Skoog D A, West D M, Holler F J, Crouch S R: Fundamentals of analytical chemistry. 8th edition. Thomson (Brooks/Cole). USA 2004; 710-818
49. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. 1. izdaja. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo 2007; 152-159
50. Gradišek J: Sproščanje heparina iz termoreverzibilnih hidrogelov. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2013; 11
51. Sigma-Aldrich: Wavelength index. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/detection/learning-center/wavelength-index.html>; dostopano december 2014
52. https://www.google.si/search?q=azure+a&espv=2&biw=1366&bih=643&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMIsYbHu72HxgIVw9csCh0dIwAi#imgrc=so66Iysmg5ahHM%253A%3BDU-R4_wPvpvfOM%3Bhttp%253A%252F%252Fmedia.scbt.com%252Fimage.php%253Fimage%253D%252Fi%252F11%252F52%252F115212.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.scbt.com%252Fdatasheet-203729-azure-a.html%3B300%3B300; dostopano marec 2015
53. Obreza A et al.: Farmacevtski terminološki slovar. Ljubljana : Založba ZRC 2011; 180
54. Šmitek J: Parenteralno dajanje zdravil – Intramuskularna injekcija. Obzor Zdr N 2005; 39: 63-71
55. Povzetek glavnih značilnosti zdravila LMWH: <http://www.trombo.net/docs/SPCLMWH.pdf>; dostopano januar 2015
56. Costalat M, Alcouffe P, David L, Delair T: Controlling the complexation of polysaccharides into multi-functional colloidal assemblies for nanomedicine. J Colloid Interface Sci 2014; 430: 147-156
57. Jeong B, Kim S W, Bae Y H: Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. Adv Drug Deliv Rev 2012; 64: 154-162

58. Radivojša Matanović M, Kristl J, Ahlin Grabnar P: Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanism of gelation, and promising biomedical applications. *Int J Pharm* 2014; 472: 262-275
59. Radivojša M, Grabnar I, Grabnar P A: Thermoreversible in situ gelling poloxamer-based systems with chitosan nanocomplexes for prolong subcutaneous delivery of heparin: Design and in vitro evaluation. *Eur J Pharm Sci* 2013; 50: 93-101
60. Chung Y I, Lee S Y, Tae G: The effect of heparin on the gelation of Pluronic F-127 hydrogel. *Colloids Surf A* 2006; 284-285: 480-484
61. Lin C C, Metters A T: Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1379-1408
62. Gombotz W R, Petit D K: Biodegradable Polymers for Protein and Peptide Drug Delivery. *Bioconjugate Chem* 1995; 6: 332-351