

Hidrogelne obloge za vlažno celjenje ran s proteinsko učinkovino

Protein loaded hydrogels as dressing for moist wound healing

Romana Rošic, Julijana Kristl, Saša Baumgartner

Povzetek: Sodoben pristop k celjenju ran temelji na vzdrževanju vlažnega mikrookolja na rani, kar lahko dosežemo s hidrogelnimi oblogami. Raziskave so pokazale, da lahko izboljšamo celjenje kroničnih ran z vključevanjem ravnih dejavnikov ali inhibitorjev proteaz v obloge. V članku je predstavljeno oblikovanje hidrogelov iz hidroksietilceluloze ali ksantana v različnih koncentracijah in z vgrajeno modelno proteinsko učinkovino. Hidrogeli iz 3% hidroksietilceluloze ali 6% ksantana imajo ustrezne reološke lastnosti, ne glede na uporabljen medij (voda, fosfatni pufer), sterilizacijo ali način zamrzovanja pred liofilizacijo. Uporaba blagih tehnoloških pogojev izdelave omogoča ohranitev native strukture proteina. Za preskuse sproščanja smo razvili lastno metodo, saj uveljavljeni modeli po farmakopejah ne posnemajo stanja v kronični rani. Metoda omogoča sproščanje proteina neposredno v medij brez vmesne bariere daljše časovno obdobje. Modelni protein se je iz hidroksietilceluloznega hidrogela sproščal difuzijsko nadzorovano, kar opisuje Higuchijeva kinetika, pri čemer se je v 4 dneh sprostilo 90 % vgrajenega proteina. Takšen hidrogel zagotavlja vlažno okolje na rani, vanj pa bi lahko med drugim vgradili tudi proteazni inhibitor, ki bi pomagal povrniti ravnovesje med ravnimi dejavniki in proteazami v rani, kar bi zmanjšalo vnetni proces in omogočilo hitrejšo celjenje.

Gljučne besede: hidrogel, reološke lastnosti, celjenje ran, modelni protein, kontrolirano sproščanje

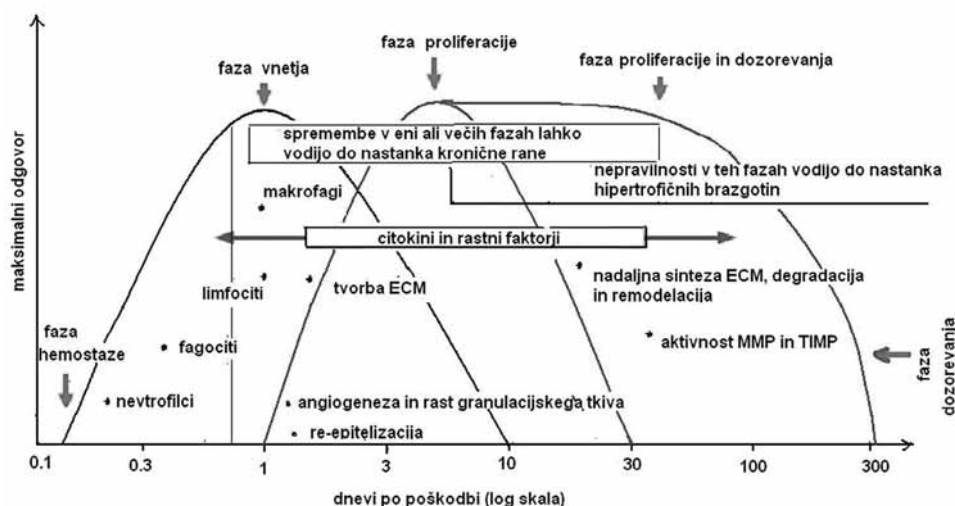
Abstract: Modern approach in the wound healing is based on maintenance of moist environment on the wound and as modern dressings hydrogels have been offered. Based on different researches the healing of the wound can be improved by application of growth factors or protease's inhibitors. In the article the development of hydrogels from hydroxyethylcellulose or xantan in different concentrations and with incorporated model protein is presented. Hydrogels from 3% hydroxyethylcellulose or 6% xantan possess appropriate rheological characteristics, regardless to the medium used (water, phosphate buffer), sterilization process or way of freezing before lyophilization. The mild technologic conditions of preparation prevent denaturation of the native structure of protein. A new method for release studies was developed, due to the fact that established pharmacopoeial models do not simulate chronic wound's state. The method enables protein's release directly into the medium without barrier through longer period of time. The release of protein from hydroxyethylcellulose hydrogel is controlled by diffusion and in 4 days around 90% of incorporated protein has been released. Hence, such hydrogel enables moist wound environment and incorporation of protease's inhibitor, which might help to regain the balance between growth factors and proteases in the wound, what could decrease inflammation and guarantee faster healing.

Key words: hydrogel, rheological properties, wound healing, model protein, controlled release

1 Uvod

Rana je po definiciji odprta poškodba kože in globljega tkiva ali sluznic zaradi fizikalnih, patofizioloških ali drugih dejavnikov. Poškodba kože pomeni prekinitev njene integritete, kar je lahko vzrok za oslabitev ali izpad njenih funkcij. Tem spremembam nasprotujejo endogeni procesi celjenja rane, saj ima vsaka rana lastno sposobnost za celjenje. Fiziološki proces celjenja poteka v fazah, kjer se posamezne celične aktivnosti odvijajo v določenem časovnem zaporedju in se navezujejo ena na drugo. Po fazi hemostaze si sledijo faze vnetja, proliferacije in

epitelizacije ter preoblikovanje in zorenje tkiva. Te faze potekajo različno dolgo, se med seboj prepletajo, sprožajo pa jih različni dejavniki, kar je predstavljeno na sliki 1 (1, 2, 3). Pri procesu celjenja sodelujejo tudi rasti dejavniki in proteaze, njihovo izražanje ter aktivnost pa sta natančno nadzorovani (1). Rastni dejavniki sodelujejo pri migraciji celic, proliferaciji, sintezi proteinov in tvorbi ekstracelularnega matriksa, delujejo pa lahko na endokrini, parakrini, avtokrini in tudi juksakrini način. Proteaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidnih vezi, prisotni so v vseh izločkih ran, v rani pa jih večinoma izločajo granulociti, keratinociti in fibroblasti.



Slika 1: Časovni potek celjenja ran po fazah z ustreznim odgovorom organizma (1). ECM - izvencelično ogrodje, MMP - metaloproteaze, TIMP - tkivni zaviralci metaloproteaz.

Figure 1: Time evolution of response mechanisms during wound healing phases (1). ECM-extracellular matrix, MMP-metalloproteinases, TIMP-tissue inhibitors of metalloproteinases.

1.1 Kronične rane

Kronične rane so vse zdravljene rane, ki se v času osmih tednov ne zacelijo. Nastanejo lahko kjerkoli na telesu, vendar največkrat na spodnjih okončinah. Vzroki za njihov nastanek so številni, mnogokrat se tudi prepletajo (1, 3). V kronični rani so moteni naravni procesi celjenja. Prisotno je neravnovesje med ravnimi dejavniki in proteazami, pri čemer je koncentracija ravnih dejavnikov znižana, proteaz pa zvišana. Najpogosteje se celjenje ustavi v vnetni fazi (1, 4), ker izločajo makrofagi vnetne citokine, ki povišajo izražanje proteaz in znižajo izražanje njihovih inhibitorjev ter ravnih dejavnikov. Tako za razliko od akutne rane, ki se celi in kjer so vnetni citokini vedno v ravnotežju z njihovimi zaviralci, v kronični rani prevlada delovanje citokinov. Stanje dodatno poslabšajo reaktivne kisikove spojine, kopica nekrotičnega tkiva ter kolonizacija bakterij (4). Nenormalno povišane koncentracije proteaz uničujejo ravnne dejavnike in njihove receptorje, zavirajo angiogenezo ter razgrajujejo na novo nastalo granulacijsko tkivo in tako zavirajo celjenje. Uničujoče delovanje proteaz lahko preprečimo z dodajanjem ravnih dejavnikov ali z zaviranjem delovanja proteaz (4, 5). Ravnne dejavniki, ki sodelujejo pri procesih celjenja, so PDGF (trombocitni ravnne dejavniki), TGF- β (transformirajoči ravnne dejavniki), VEGF (žilni endoteljski ravnne dejavniki), EGF (epidermalni ravnne dejavniki), FGF (fibroblastni ravnne dejavniki) in IGF (inzulinu podoben ravnne dejavniki). Aplikacija le-teh na rano bi izboljšala zdravljenje kroničnih ran (5, 6, 7).

Izpeljana so bila že številna klinična testiranja z uporabo ravnih dejavnikov za celjenje kroničnih ran, a so si rezultati raziskav glede učinkovitosti zdravljenja precej nasprotujoči (7). Klinične študije, ki jih je izvedel Rayment s sodelavci, so pokazale, da ni nobene razlike v uspešnosti zdravljenja diabetične razjede z dostavo FGF v primerjavi s placebom (7). Po drugi strani pa je bila že leta 1999 odobrena uporaba PDGF (Regranex™) za hitrejše in popolnejše celjenje diabetičnih stopal (7), kjer je ravnne dejavniki vgrajen v karboksimetilcelulozni gel za lokalno aplikacijo. Mnogi avtorji zatrjujejo, da je vzrok za neuspešnost zdravljenja z ravnimi dejavniki izredno visoka aktivnost proteaz v rani (4,7). Aktivnost proteaz je namreč

tako velika, da le-te razgradijo ravnne dejavnike, ki jih nanesejo v rano, še preden bi se lahko izrazil njihov terapevtski učinek. Zato se je porodila ideja o dermalni dostavi proteaznih inhibitorjev v kronično rano, kar bi izboljšalo njeno celjenje. Eden od proteaznih inhibitorjev, ki jih raziskujejo za celjenje kroničnih ran, je tudi cistatin (8). Uvrščamo ga med reverzibilne inhibitorje, ki delujejo v zunajceličnem prostoru (8, 9, 10, 11).

Kot proteazni inhibitorji so bile patentirane že številne majhne molekule - oleinska kislina, hidroksamske kisline in druge. Rayment in sodelavci poročajo, da lahko cinkove metaloproteaze v kronični rani zavira bifosfonat alendronat v hidrogelu (7). V namene zdravljenja kroničnih ran pa so raziskovali tudi uporabo α -antikimotripsina (4).

1.2 Sodobna oskrba rane

Sodobni pristopi k celjenju ran temeljijo na vzdrževanju vlažnega mikrookolja na rani. Prednosti, ki jih prinaša vlažno okolje, so številne. Vлага ustrezno hidratira tkivo in omogoči večjo celično in encimsko aktivnost. Posledično se zniža pH in nastane blaga hipoksija, kar vzpodbudi tvorbo novega kapilarnega žilja. Takšno okolje ugodno vpliva na avtolitične procese čiščenja in razkranje nekroz (1, 3, 12). Vlažna obloga prekrije tudi proste živčne končiče, zato sta draženje in bolečina manjša. Sodobne obloge predstavljajo nadomestek manjkajočega tkiva, ustrezno pripravijo ležišče rane, omogočajo izmenjavo kisika in CO₂, ohranjajo vlažno okolje, preprečujejo maceracijo in izušitev, vpijajo izločke, zaščitijo pred sekundarno okužbo in fizično poškodbo, prevezovanje pa je redkejše in manj boleče. S tem se poviša kakovost bolnikovega življenja in zmanjšajo celokupni stroški zdravljenja; čeprav so sodobni materiali dražji od klasičnih gaz, pa je bistveno skrajšan čas zdravljenja (12, 13).

Obloge niso univerzalne, saj so materiali, iz katerih so sestavljene, po kemijski sestavi zelo različni. Med naravnimi materiali se pogosto uporabljajo alginati, hitosan, pektin, celuloza, med sintezniimi in polsintezniimi pa poliamidi, poliestri, poliuretani, polipropileni, celulozni derivati, akrilati, silikoni in drugi (3, 12). Povečini so to polimeri, ki imajo

sposobnost, da vodo ali izloček iz rane vežejo bodisi kemijsko bodisi fizikalno, pri čemer nabrekajo in lahko tvorijo tudi gel (1, 3, 12).

Raziskave na področju materialov za vlažno celjene ran so razkrile bistvene lastnosti, ki jih mora imeti primeren polimer za sodobne obloge. Polimer mora izkazovati hidrofilen značaj, da lahko deluje kot vpojna obloga, če ga apliciramo v nehidratiranem stanju, ali omogoča hidratacijo suhe ali zasušene rane, kadar je nanešen v hidratirani obliki. Želena je, da ima polimer v svoji strukturi funkcionalne skupine, ki omogočajo lovljenje radikalov in kompleksiranje kovinskih ionov, kar zmanjša oksidativni stres v vnetni fazi (1, 12). Dodatno naj bi bil polimer sposoben tvoriti vodikove in elektrostatske vezi. Biomateriali na ta način lahko zavirajo encime in tako dodatno prispevajo k terapevtskemu učinku vgrajenega proteaznega inhibitorja. Mehanizem same inhibicije še ni pojasnjen, predpostavljajo pa, da denaturacija proteinov nastopi ravno zaradi omenjenih interakcij s funkcionalnimi skupinami polimera: s hidroksilno, karbonilno in karboksilno skupino. K uspešnemu celjenju ran pripomore tudi urejenost polimernih molekul v obliki vlaken, saj omogoča pravilno nalaganje in orientacijo novonastalih kolagenskih vlaken, kar daje podporo tudi drugim celičnim elementom (4, 12).

Doslej so za dostavo ravnih dejavnikov proučevali različne sisteme (polimerne gele, nanodelce in druge), vendar do danes še ni bil razvit idealen dostavni sistem (7). Dostavni sistem mora zagotoviti vnos proteinske učinkovine v aktivni obliki in omogočiti primerno sproščanje v rani.

Eden izmed primernih dostavnih sistemov za vnos proteinskih učinkovin na rano so tudi hidrogeli. Sestavljeni so iz hidrofilnih polimerov, ki tvorijo premreženo tridimenzionalno strukturo, v katero sprejmejo večjo količino vode. Polimer v vodi nabreka, ne da bi se pri tem raztapljal. Zaradi visoke vsebnosti vode omogočajo hidratacijo tkiva, mehka konsistenca in prožnost hidrogela pa zmanjšujeta možnost draženja okoliškega tkiva, zato je biokompatibilnost hidrogelov zelo velika. Nizka medfazna napetost med hidrogelom in okoliško tkivno tekočino dodatno zmanjša možnost adsorpcije proteinov iz telesnih tekočin (13, 15, 16). Polimer v hidrogelu za vlažno celjenje ran mora biti odporen na pogoje sterilizacije, kar pomeni, da se ne sme razgraditi, sočasno pa mora ohraniti ustrezno viskoznost. Slednja je pomembna predvsem zaradi aplikacije gela na rano, saj mora omogočati neboleč nanos in zagotavljati dober in tesen stik z rano skozi daljši čas (3, 12).

Razvojne usmeritve zdravljenja kroničnih ran so torej sodobne obloge za vlažno celjenje z vgrajeno učinkovino, ki aktivno posega v celjenje. Namen našega raziskovalnega dela je bil izdelati hidrogel z ustreznimi reološkimi lastnostmi, ki bo omogočal nadzorovano sproščanje vgrajenega modelnega proteina, ki bi lahko posnemal bodisi proteazni inhibitor bodisi enega od ravnih dejavnikov. Izdelali smo hidrokele iz hidroksietilceluloze (HEC) in ksantana, proučevali vpliv različnih koncentracij polimera, osmolarnosti medija, sterilizacijskega postopka ter liofilizacije na reološko obnašanje hidrogelov. Rezultate viskoznosti smo primerjali z viskoznostjo hidrogelov, ki so že prisotni na tržišču. Ovrednotili smo tudi sproščanje proteina iz hidrogela na posebnem modelu, ki smo ga razvili v ta namen. Rezultati raziskave naj bi bile obloge, ki bi jih zaradi povečanja stabilnosti biološke učinkovine shranjevali v suhi obliki v primarni ovojnjini in jih pred aplikacijo rehidrirali ter nanесли na rano kot hidrogel. Takšen hidrogel bi po eni

strani zagotavljal idealno vlažno okolje na rani, po drugi strani pa bi lahko vanj namesto modelnega proteina vgradili inhibitor proteaz, ki bi zmanjšal prekomerno aktivnost teh encimov.

2 Materiali in metode

2.1 Materiali

Hidrokele smo izdelali iz hidroksietilceluloze (Natosol® Pharm, tip 225 HHX- Pharm, Lot: X-01017) ali ksantana (XANTURAL® 75, proizvajalec CP Kelco Knowsley Plant, Velika Britanija), brezvodnega glicerola kot vlažilca (Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija) ter dinatrijevega tetraborat dekahidrata (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija) v vlogi konzervansa. Kot modelno proteinsko učinkovino smo uporabili jajčni albumin (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija; molska masa 44 kDa). Sterilni komercialno dostopni hidrogeli: Intrasil® gel, Purilon® in Tegaderm® hidrogel 3M 91110, ki so namenjeni za neposreden nanos na kronične rane, so nam služili za opredelitev primerne viskoznosti hidrogelov za obloge.

2.2 Priprava hidrogelov

Pripravili smo prazne hidrokele z 1,5-, 3- in 4,5- odstotno koncentracijo ter HEC 1,5-, 3-, 4,5- in 6 - odstotno koncentracijo ksantana. K disperziji polimera v glicerolu smo počasi dodali 0,1 % raztopino konzervansa, nato pa vzorec homogenizirali v ultrazvočni kadički 1 min in ga pustili gelirati en dan pri sobni temperaturi. Proteinsko učinkovino smo vgradili v hidrokele tako, da smo jo raztopili v steriliziranem izotoničnem fosfatnem pufru s pH 7 (PBS: 0,02 m/m % KCl, 0,024 m/m % KH_2PO_4 , 0,144 m/m % Na_2HPO_4 , 0,8 m/m % NaCl), le to pa nato uporabili za tvorbo hidrogela z vsebnostjo proteina 1 mg/g hidrogela. Postopek smo izvedli v aseptičnih pogojih. Vzorce praznih hidrogelov smo sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C, 2 barih, 15 minut.

Homogenost porazdelitve proteina po celotnem hidrogelu smo preverili tako, da smo odvzeli vzorce hidrogela iz različnih mest znotraj čaše, v kateri smo izdelali hidrogel (dno, sredina in površje hidrogela), jih nato raztopili v PBS ter določili količino vgrajenega proteina s HPLC metodo.

Hidrokele smo zamrznili na tri različne načine (v zmrzovalniku, neposredno v liofilizatorju ter v tekočem dušiku) in jih liofilizirali pri -21°C 24 ur pri tlaku 0,37 mbar v fazi primarnega sušenja in 0,11 mbar v fazi sekundarnega sušenja (CHRIST BETA 1-8K, Osterode, Nemčija). Izdelane liofilizate smo rehidrirali tako, da smo suhim vzorcem v aseptičnih pogojih s kapalko dodali sterilizirano vodo, in sicer toliko kot smo je odstranili med liofilizacijo. Rehidrirane gele smo vrednotili po 24-ih urah rehidracije.

2.3. Metode

2.3.1 Reološko vrednotenje hidrogelov

Vse hidrokele smo reološko ovrednotili z rotacijskim viskozimetrom Rheolab MC 100 Paar (Physica, Stuttgart, Nemčija) s sistemom stožecplošča KT 22, pri T = 25°C, 32°C in 37°C in pri različnih strižnih hitrostih.

2.3.2 Določevanje albumina v vzorcih s HPLC metodo

Pri merjenju količine sproščenega albumina iz hidrogelov ter za spremljanje stabilnosti smo uporabili HPLC metodo (HPLC, Agilent Series, Agilent Technologies, Nemčija). Mobilna faza je bila sestavljena iz 130 mM NaCl in 20 mM Na₂HPO₄ s pH 7. Uporabili smo kolono Agilent ZORBAX GF-250 velikosti 9,4 x 250 mm, s premerom por 4µm, ki je primerna za ločevanje proteinskih molekul na osnovi velikosti. Pretok mobilne faze je bil 1ml/min, volumen injiciranega vzorca 10 µL, detekcija eluiranega proteina je potekala z UV spektrometrom pri valovni dolžini 210 nm, analiza pa je trajala 20 minut.

Umeritveno premico smo izdelali tako, da smo albumin raztopili v mobilni fazi in pripravili osnovno raztopino s koncentracijo 2 mg/ml. Osnovno raztopino smo ustrezno redčili do koncentracije 0,010 mg/ml, ki že predstavlja spodnjo mejo detekcije. Umeritveno premico smo delali v treh paralelkih.

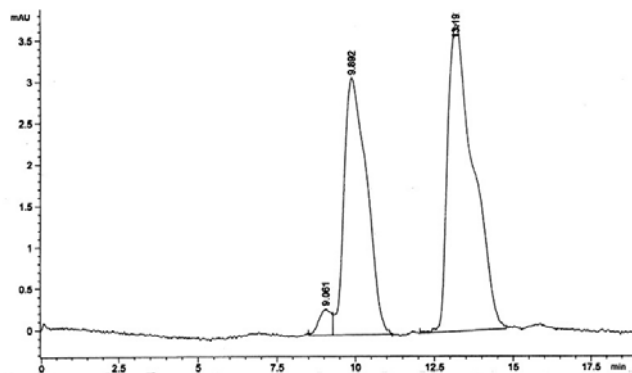
2.3.3 Vrednotenje stabilnosti vgrajenega proteina

Hidrogel z že vgrajenim albuminom smo raztopili v fosfatnem pufru, vzorec hranili pri sobni temperaturi ter iz raztopine odvezemali vzorce v določenih časovnih intervalih (0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 in 96 h). Količino albumina smo določili s HPLC metodo.



Slika 2: Shematski prikaz modela sproščanja.

Figure 2: Scheme of developed release model.



Slika 3: Tipični kromatogram, ki smo ga posneli po 24 h sproščanja. Kromatografska vrhova z retencijskim časom približno 9,0 in 9,8 min predstavljata sproščeni albumin, vrh pri 13 min pa hidroksietilcelulozo.

Figure 3: Typical chromatogram after 24 h of drug release. Peaks at retention time at about 9,0 and 9,8 min represent released albumin, peak at 13 min is hydroxyethylcellulose.

2.3.4 Sproščanje albumina iz hidrogelov

Izvedli smo ga na lastno razvitem modelu. Na plast hidrogela v vialah (približno 1g) smo dodali fosfatni pufer kot medij, kamor se je sproščal albumin. Masno razmerje med hidrogelom in pufrom je bilo 1:2, mediju pa smo tako izpostavili le zgornjo površino hidrogela. Medij nad hidrogelom je slednjega sicer redčil, vendar je bila meja med njima ves čas zaznavna, odvzem vzorca pa neproblematičen. Iz sredine medija smo odvezemali vzorce ob rednih časovnih intervalih, jih nadomestili z enakim volumnom svežega pufra ter analizirali s HPLC.

3 Rezultati in razprava

3.1 Viskoznost hidrogelov

3.1.1 Vpliv koncentracije polimera

Pri meritvah viskoznosti hidrogelov smo spremljali odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti v intervalu 0 - 50 s⁻¹ pri treh različnih temperaturah. Z reološkim vrednotenjem nekaterih komercialno dostopnih hidrogelov, ki se že uporabljajo kot sodobne obloge in so brez učinkovine, smo ugotovili, da se le-ti med seboj razlikujejo po viskoznosti, kar je posledica različne sestave hidrogelov (Tabela 1). Izmerjeni interval viskoznosti od 50 do 225 Pas pa nam je služil kot referenčna vrednost za izbor ustreznega hidrogela. Vsi komercialni hidrogeli so imeli šibko izražene tiksotropne lastnosti.

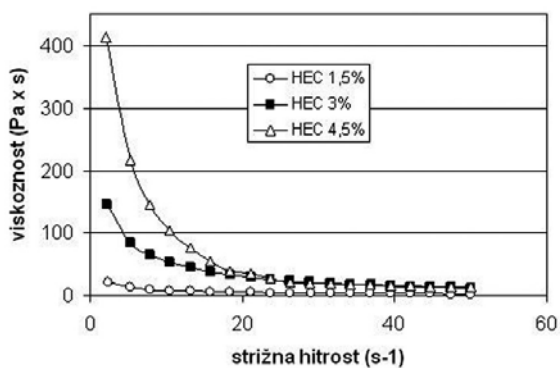
Tabela 1: Viskoznost nekaterih komercialno dostopnih hidrogelov za vlažno celjenje ran, merjena pri različnih temperaturah.

Table 1: Viscosity of some commercial hydrogels for moist wound healing measured at different temperatures.

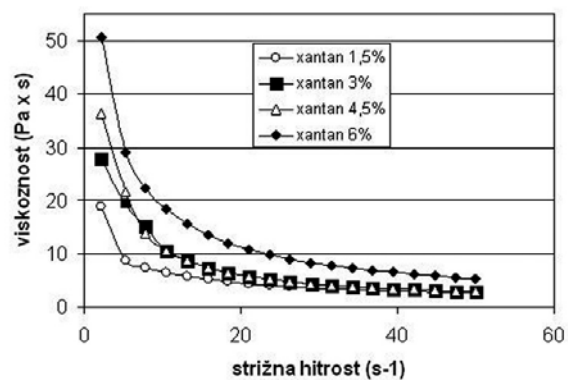
HIDROGEL	Viskoznost (Pa × s)		
	25°C	32°C	37°C
Purilon [™]	225,3 ± 8,51	163 ± 4,58	154,3 ± 6,11
Tegaderm [™]	75,7 ± 3,16	67,7 ± 1,59	68,7 ± 2,66
Intrasite [™]	67,9 ± 1,77	56,1 ± 1,45	51,0 ± 1,53

Iz širokega nabora poznanih polimerov smo za izdelavo hidrogelov izbrali HEC in ksantan, saj se glede na v uvodu navedene zelene lastnosti približujeta optimalnim polimerom za sodobne obloge. Viskoznost izdelanih hidrogelov pri različnih koncentracijah polimera prikazuje Slika 4. Prisotnost proteina v hidrogelih, zaradi njegove nizke koncentracije (1 mg/g), na viskoznost hidrogelov ne vpliva.

Rezultati kažejo, da daje HEC višje vrednosti za viskoznost kot ksantan pri isti koncentraciji polimera. V postavljen referenčni interval viskoznosti sodi 3 % hidrogel HEC in 6 % hidrogel iz ksantana, oba pa imata tudi izražene tiksotropne lastnosti. Pomembno je, da viskoznost že pri nizki strižni hitrosti zelo hitro pade, kar omogoča enostaven in neboleč nanos na rano.



A)



B)

Slika 4: Viskoznost hidrogelov A) HEC B) ksantana v odvisnosti od strižne hitrosti pri $T = 25^{\circ}\text{C}$.

Figure 4: Viscosity of hydrogels A) from HEC B) from xanthan dependence on shear rate at $T = 25^{\circ}\text{C}$.

3.1.2 Vpliv medija

Priprava hidrogela z vodo za injekcije in izotonično raztopino fosfatnega pufra vpliva na viskoznost le-tega, kar je bolj izraženo v primeru ksantana kot v primeru HEC hidrogela (Tabela 2). Priprava hidrogela z izotoničnim fosfatnim pufrom s pH vrednostjo 7 predstavlja primernejše okolje za vgrajevanje modelnih proteinov, kot so dokazali v predhodnih raziskavah (8).

3.1.3 Vpliv sterilizacije

Hidrogela po sterilizaciji nekoliko spremenita barvo in konsistenco, vendar pa viskoznost ostane znotraj postavljenega intervala (Tabela 2). Viskoznost HEC hidrogelov pade za približno 20 %, medtem ko se viskoznost pri ksantanskih hidrogelih praktično podvoji.

V nadaljevanju smo za vgrajevanje proteina izbrali 3 % HEC hidrogel v PBS zaradi bistveno lažje izdelave. Priprava hidrogela iz ksantana namreč zahteva intenzivnejše mešanje in daljšo uporabo ultrazvočne kadičke, uporaba ostrejših tehnoloških pogojev pa poveča verjetnost za porušenje native strukture proteina. Kot kažejo naši rezultati so HEC hidrogeli tudi manj občutljivi na povišano osmolarnost medija in pogoje sterilizacije ter mikrobiološko bolj obstojni kot ksantanski hidrogeli. Ksantan je namreč zaradi svoje strukture bolj občutljiv na spremembe medija in temperature kot HEC. V fosfatnem pufru je večina karboksilnih skupin ksantana nabitih, hidratacija je zelo obsežna in viskoznost takega sistema naraste. Pri povišanju temperature med procesom sterilizacije pa ksantan preide iz dvojne v enojno vijačnico, interakcij med verigami je manj, naraste pa število interakcij z molekulami vode, kar spet privede do povišanja viskoznosti (14).

3.1.4 Vpliv liofilizacije na lastnosti hidrogela po rehidraciji

Rehidracija liofilizatov nazaj do hidrogelov poteče spontano po dodatku tolikšne količine vode, kot smo je odstranili med liofilizacijo. Časa potrebnega za rehidracijo sicer nismo preverjali, je pa le-ta popolnoma potekla po 24-ih urah. Ugotovili smo, da način zamrzovanja

Tabela 2: Viskoznost hidrogelov pred in po sterilizaciji, z uporabo PBS kot vodnega medija ter rehidriranega hidrogela po liofilizaciji.

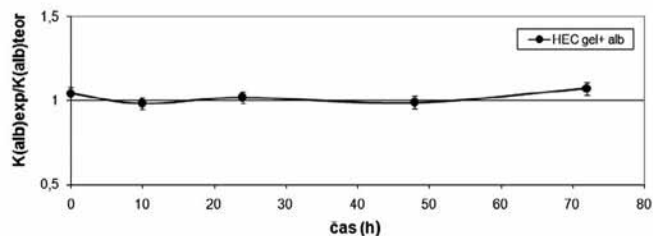
Table 2: Viscosity of hydrogels before and after sterilization, with PBS as water medium and viscosity of rehydrated hydrogel after lyophilized.

HIDROGEL	Viskoznost (Pa x s)		
	25°C	32°C	37°C
HEC 3% v vodi	145 ± 3,46	143,7 ± 7,55	129,3 ± 7,51
HEC 3% v PBS	134 ± 4,24	131 ± 3,22	116 ± 7,89
Ksantan 6 % v vodi	50,6 ± 1,56	62,3 ± 6,01	60,3 ± 10,5
Ksantan 6 % v PBS	93,2 ± 1,13	90,2 ± 2,65	96,3 ± 2,89
PO STERILIZACIJI			
HEC 3 % v vodi	111 ± 2,43	94,2 ± 3,55	81,6 ± 6,32
Ksantan 6 % v vodi	121 ± 7,07	132 ± 5,33	102 ± 8,69
LIOFILIZACIJA IN VISKOZNOST PO REHIDRACIJI			
HEC 3% v PBS, zamrznjen v zmrazovalniku	180 ± 13,4	173,7 ± 4,51	174 ± 8,37
HEC 3% v PBS, zamrznjen v liofilizatorju	202,3 ± 4,16	173,3 ± 16,25	180 ± 2,00
HEC 3 % v PBS, zamrznjen v tekočem dušiku	195 ± 16,29	168,7 ± 9,45	149 ± 7,07

vzorcev ne vpliva na reološko obnašanje HEC hidrogelov po rehidraciji, saj imajo tudi ti izražene tiksotropne lastnosti, viskoznost le teh pa je za 30-40 % večja, vendar še vedno v pričakovanih mejah (od 50 do 225 Pas), kot kažejo rezultati v Tabeli 2.

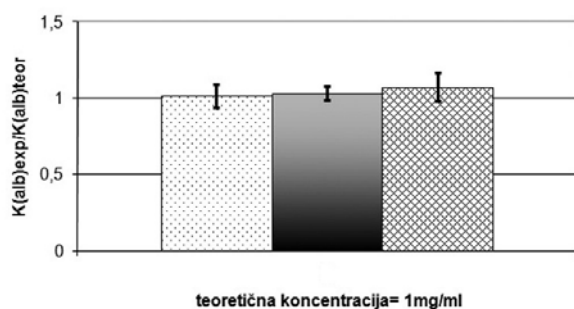
3.2 Stabilnost proteina v hidrogelu

Potrdili smo, da je vgrajen protein v 3 % HEC hidrogelu v PBS stabilen skozi daljše časovno obdobje, saj se ohrani njegova začetna koncentracija (Slika 5). Postopek izdelave hidrogela smo optimizirali do te mere, da smo dosegli homogeno porazdelitev proteina po celotnem hidrogelu ob majhni mehanski obremenitvi pri sobni temperaturi (Slika 6).



Slika 5: Spremljanje znane koncentracije albumina (1 mg/ml) v hidrogelu. $K(\text{alb})_{\text{exp}}$ je koncentracija albumina določeno iz umeritvene krivulje s HPLC analizo, $K(\text{alb})_{\text{teor}}$ pa je teoretično vgrajena koncentracija albumina, ki je bila 1mg/ml ($n=3$).

Figure 5: Monitoring of know concentration of albumin (1mg/ml) dependence on time. $K(\text{alb})_{\text{exp}}$ is concentration of albumin determined from standard curve with HPLC analysis, $K(\text{alb})_{\text{teor}}$ is theoretical concentration of built-in albumin, that was 1mg/ml ($n=3$).

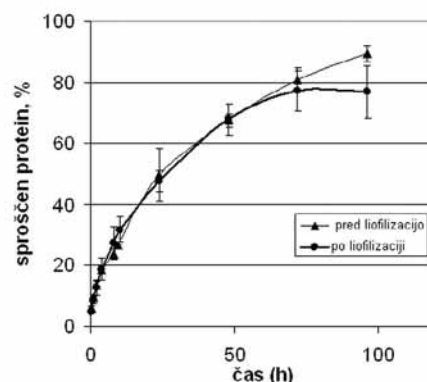


Slika 6: Koncentracije albumina na različnih mestih odvzema v hidrogelu. $K(\text{alb})_{\text{exp}}$ je koncentracija albumina določeno iz umeritvene krivulje s HPLC analizo, $K(\text{alb})_{\text{teor}}$ pa je teoretično vgrajena koncentracija albumina, ki je bila 1mg/ml ($n=3$).

Figure 6: Concentration of albumin from different places in hydrogel. $K(\text{alb})_{\text{exp}}$ is concentration of albumin determined from standard curve with HPLC analysis, $K(\text{alb})_{\text{teor}}$ is theoretical concentration of built-in albumin, that was 1mg/ml ($n=3$).

3.3 Sproščanje proteina iz hidrogelov

Za preskuse sproščanja smo razvili lastno metodo sproščanja, saj uveljavljeni modeli po farmakopejah ne posnemajo stanja v kronični rani. Metoda omogoča sproščanje proteina neposredno v medij brez bariere skozi daljši čas ob mirovanju vzorca. Sproščanje proteina iz HEC hidrogela smo spremljali 4 dni, saj sodobne obloge ne menjujemo vsakodnevno, pač pa je optimalni čas zadrževanja sodobne obloge na rani ravno 4 do 5 dni (12). Ugotovili smo, da sproščanje albumina iz HEC hidrogela poteka s Fickovo difuzijo, saj je količina sproščenega albumina sorazmerna s korenom iz časa (koeficient naklona = 9,4796, $r^2 = 0,9949$). To je bilo tudi pričakovano, saj erozija zaradi statičnosti sistema poteka zelo počasi in je njen vpliv manjši. Vseeno pa smo opazili tudi erozijo polimera, saj je kromatografski vrh pri 13 min naraščal, vendar pa se le to pri sproščanju albumina ni odražalo. V 4 dneh se je sprostil okoli 90 % vgrajenega proteina. Standardna deviacija meritev je majhna, kar odraža ponovljivost meritev. Dokazali smo, da proces liofilizacije na profil sproščanja ne vpliva, ne glede na različne načine zamrzovanja vzorcev, prav tako pa tudi ne na mehanizem sproščanja (koeficient naklona = 8,539, $r^2 = 0,9767$). Rezultati kažejo, da nekoliko povišana viskoznost rehidriranih hidrogelov (Tabela 2) ne vpliva na hitrost difuzije proteina.



Slika 7: Profil sproščanja jajčnega albumina iz neliofiliziranega 3 % HEC hidrogela (pred liofilizacijo) in rehidriranega 3 % HEC (po liofilizaciji) ($n = 3$).

Figure 7: Release profile of egg albumin from 3% HEC hydrogel before and after lyophilization ($n = 3$).

6 Sklep

Hidrogeli z vgrajenimi učinkovinami, ki aktivno posegajo v celjenje ran, predstavljajo napredek v terapiji kroničnih ran. Razvili smo hidrogel, v katerega je mogoče vgraditi proteinsko učinkovino (npr. proteazni inhibitor), ki ga hidrogel po nanosu na rano več dni nadzorovano sprošča. Dostavljen inhibitor proteaz bi pomagal povrniti ravnovesje med prekomerno aktivnimi proteazami in premalo izraženimi rastnimi dejavniki v kronični rani, kar bi zmanjšalo vnetni proces ter omogočilo boljše in hitrejše celjenje kronične rane.

7 Literatura

1. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery* 2005; 23 (2): 37-42
2. Tremel A, Cai N, Tirtaatmadja N, Huges BD, Stevens GW, Landman KA, O'Connor AJ. Cell migration and proliferation during monolayer formation and wound healing. *Chem Eng Sci* 2009; 64 (2): 247-253
3. Boateng JS, Matthews KH, Stevens H, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci* 2008; 97 (8): 2892-2923
4. Schmidt R. Topical delivery of α - Antichymotrypsin for wound healing, Doktorsko delo, Fakultat für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians- Universität München, München, 2005
5. Zhang S, Uludag H. Nanoparticulate systems for growth factor delivery. *Pharm Res* 2009; 26: 1561-1580
6. Kiritsy CP, Lynch SE. Role of growth factors in cutaneous wound healing. *Critical reviews in oral biology and medicine* 1993; 4 (5): 729-760
7. Rayment AE, Dargaville T, Shooter G, George G, Upton Z. Attenuation of protease activity in chronic wound fluid with bisphosphonate-functionalised hydrogels. *Biomaterials* 2008; 29 (12):1785-1795
8. Cegnar M, Kos J, Kristl J. Cystatin incorporated in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: development and fundamental studies on preservation of its activity. *Eur J Pharm Sci* 2004; 22 (5): 357-364
9. Huang G, Gao J, Hu Z, St.John JV, Ponder BC, Moro D. Controlled drug release from hydrogel nanoparticle networks. *J Contr Rel* 2004; 94: 303-311
10. Cegnar M, Kristl J, Kos J. Oblikovanje nanodelcev s proteini = Designing of protein-loaded nanoparticles. *Farm Vestn* 2003; 54 (1): 37-46
11. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS* 1991; 285 (2): 213-219
12. Cegnar M, Baumgartner S, Kristl J. Vlažna oskrba rane s sodobnimi oblogami. *Med Razgl* 2007; 46 (3): 235-247
13. Ovington LG. Advances in wound dressings. *Clin Dermatol* 2007; 25: 33-38
14. Baumgartner S, Pavli M, Kistl J. Effect of calcium ions on the gelling and drug release characteristics of xanthan matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69 (2): 698-707
15. Matthews KH, Stevens HNE, Auffret AD, Humphrey MJ, Eccleston GM. Lyophilised wafers as a drug delivery system for wound healing containing methylcellulose as a viscosity modifier. *Int J Pharm* 2005; 289 :51-62
16. Bouwstra JA, Junginger HE. Hydrogels. In: Swarbrick J, Boylan JC. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York: Marcel Dekker. 2002; 441-465.
17. Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov Today* 2002; 7: 569-78
18. Baumgartner S, Lahajnar G, Sepe A, Kristl J. Quantitative evaluation of polymer concentration profile during swelling of hydrophilic matrix tablets using ¹H NMR and MRI methods. *Eur J pharm biopharm* 2005; 59 (2): 299-306
19. Bildstein L et al. Freeze-drying of squalenoylated nucleoside analogue nanoparticles. *Int J Pharm* 2009; 381 (2): 140-145
20. Fear G, Komarnytsky S, Raskin I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 2007; 113 (2): 354-368
21. Mourey TH, Leon JW, Bennett JR, Bryan TG, Slater LA, Stephen TB. Characterizing property distributions of polymeric nanogels by size-exclusion chromatography. *J Chromat A* 2007; 1146: 51-60
22. Kristl J, Kočevar J, Šmid-Korbar J, Mlekuž S, Gašperlin M. Ocenitev viskoelastičnih lastnosti hidrogelov želatine z oscilacijsko metodo. *Farm Vestn* 1993; 44: 171- 183
23. Hiemstra C, Zhong Z, van Steenberg MJ, Hennink WE, Feijen J. Release of model proteins and basic fibroblast growth factors from in situ forming degradable dextran hydrogels. *J Contr Rel* 2007; 122: 71-78
24. Smith T, Kennedy J, Higginbotha C. The rheological and thermal characteristics of freeze-thawed hydrogels containing hydrogen peroxide for potential wound healing applications. *J Mech Behav of Biomedical Mat* 2009; 2 (3): 264-271
25. Rupprecht H. Basic physico-chemical principles of freeze- drying –lyophilization. *Farm Vestn* 1993; 44: 193-213
26. Rošic R. Proučevanje hidrogelov za vlažno celjenje ran z vgrajenim modelnim proteinom: diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2009