



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

Doktorska disertacija

**VEČSLOJNE MEDICINSKE MATRICE Z MODIFICIRANIM SPROŠČANJEM
PENTOKSIFILINA ZA ZDRAVLJENJE KRONIČNE VENOZNE RAZJEDE**

Maribor, avgust 2018

Kandidat: Jan Stana

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem so-mentorju doc. Dr. Urošu Mavru, ki mi je s svojim strokovnim znanjem in številnimi nasveti poglavito pomagal pri izdelavi doktorske naloge. Na tem mestu bi se še posebej zahvalil dr. Tamilsalvenu Mohanu in doc. dr. Rupertu Karglu za številne konstruktivne nasvete.

Prav tako bi se rad zahvalil družini za podporo, brez katere mi ne bi uspelo dokončati doktorske naloge. Hvala celotni ekipi Laboratorija za obdelavo in preskušanje polimernih materialov, Fakultete za strojništvo, Univerze v Mariboru za vso podporo in pomoč v okviru doktorskega usposabljanja.

Prav tako se zahvaljujem vsem sodelavcem Inštituta za biomedicinske vede, Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru za vse koristne nasvete, ter pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela.

Iskreno se zahvaljujem mentorju, red. prof. dr. Vojko Flisu, dr. med. za podporo, strokovne nasvete ter, da mi je stal ob strani, ko sem to najbolj potreboval.



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

DOKTORSKA DISERTACIJA

VEČSLOJNE MEDICINSKE MATRIKE S CILJNIM SPROŠČANJEM PENTOKSIFILINA ZA ZDRAVLJENJE KRONIČNE VENOZNE RAZJEDE

Maribor, avgust 2018

Kandidat: Jan Stana, dr. med.

Mentor: red. prof. dr. Vojko Flis, dr. med

Somentor: doc. dr. Uroš Maver, mag. farm.

KAZALO

1	UVOD	1
1.1	DELOVNA HIPOTEZA	1
1.2	STANJE RAZISKAV NA PODROČJU ZDRAVLJENJA KRONIČNIH VENOZNIH RAN	1
1.2.1	KOMPRESIJSKA TERAPIJE	2
1.2.2	LOKALNA OSKRBA RAN	3
1.2.3	PREGLED OBLIŽEV ZA OSKRBO KRONIČNIH RAN	6
1.2.3.1	Klasifikacija oblog za oskrbo ran	7
1.2.3.2	Pregled sodobnih oblog za oskrbo kroničnih ran	7
1.3	PREDLAGANA NADGRADNJA ZDRAVLJENJA KRONIČNIH VENOZNIH RAN - PREDLOG NOVEGA LOKALNEGA KONCEPTA ZDRAVLJENJA	9
1.4	TEORETIČNE OSNOVE	10
1.4.1	FIZIOLOGIJA CELIENJA RAN	11
1.4.1.1	Hemostaza	11
1.4.1.2	Vnetje	12
1.4.1.3	Proliferacija	14
1.4.1.4	Remodelacija	16
1.5	PATOFIZIOLOGIJA NASTANKA KRONIČNE RANE	17
1.5.1	VPLIV KISIKA NA NASTANEK KRONIČNE RANE	17
1.5.2	VPLIV BAKTERIJ NA POTEK CELIENJA RAN	18
1.6	VENOZNA INSUFICIENCA	20
1.7	KRONIČNE VENOZNA RANE	22
1.7.1	PATOFIZIOLOGIJA NASTANKA KRONIČNE VENOZNE RANE	23
1.7.2	VLOGA TNF- α V KRONIČNEM VNETJU	25
1.8	POLISAHARIDI UPORABNI V SODOBNIH KONCEPTIH ZDRAVLJENJA KRONIČNIH RAN	28
1.8.1	HITZAN	30
1.8.2	ALGINAT	32
1.9	PENTOKSIFILIN (PTX)	34
1.9.1	FARMAKODINAMIKA IN FARMAKOKINETIKA PTX	35
1.9.2	PROTIVNETNO DELOVANJE PENTOKSIFILINA	36
1.10	CELIČNI MODELI IN TESTI	37
1.10.1	SCRATCH ASSAY	37
1.10.2	EICS (ANGL. ELECTRIC CELL-SUBSTRATE IMPEDANCE SENSING)	38
1.10.3	VEČ-KOMORNI SISTEMI ZA MERJENJE KEMOTAKSIJE	39
1.10.4	TESTIRANJE VIABILNOSTI CELIC V CELIČNIH KULTURAH	40
1.10.4.1	Testiranje celične viabilnosti z MTT tetrazoliumom	40
1.10.4.2	Določanje koncentracije ATP	41
2	EKSPERIMENTALNI DEL	42
2.1	MATERIALI	42
2.2	PRIPRAVA POLISAHARIDNIH NANOFILMOV Z VKLJUČENIM PENTOKSIFILINOM (PTX)	43
2.2.1	ČIŠČENJE SUBSTRATA	43
2.2.2	PRIPRAVA VEČSLOJNIH NANOFILMOV	43
2.2.3	NANOS ZDRAVILA PTX V VEČSLOJNE NANOFILME	44
2.3	METODE	45
2.3.1	MERITEV STIČNIH KOTOV	45
2.3.2	INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA Z OSABLJENIM TOTALNIM ODOBJEM (ANGL. ATTENUATED TOTAL REFLECTION) (ATR-IR)	46
2.3.3	PROFILOMETRIJA	47
2.3.4	KVARČNA MIKROTEHTNICA (ANLG. QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE) – QCM-D	47

2.3.5	MIKROSKOPIJA NA ATOMSKO SILO (ANGL. ATOMIC FORCE MICROSCOPY, AFM).....	48
2.3.6	IN VITRO SPROŠČANJE PTX	49
2.3.7	CELIČNI TESTI	51
2.3.7.1	Priprava ekstraktov	51
2.3.7.2	Vpliv celic na izpostavljenost eluentom	51
2.3.7.3	Testiranje viabilnosti/citotoksičnosti ob izpostavljenosti vzorcev z eluenti	52
2.3.7.4	Merjenje viabilnosti celic preko določanja aktivnosti dehidrogenaze (CellTiter 96® test, MTS) 52	
2.3.7.5	Merjenje viabilnosti celic preko določanja koncentracije ATP (CellTiter-Glo® test).....	53
2.3.7.6	Testiranje viabilnosti/citotoksičnosti pri direktnem stiku vzorcev	54
2.3.7.7	Merjenje sekrecije TNF- α	54
2.3.7.8	Izpostavljenost vzorcem iz in vitro testiranja sproščanja.....	55
3	REZULTATI	56
3.1	PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA VEČSLOJNIH MODELNIH POLIMERNIH FILMOV: DOLOČANJE NJIHOVE DEBELINE, HRAPAVOSTI, MOČLJIVOSTI, MORFOLOGIJE IN SESTAVE	56
3.2	SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA	58
3.3	CELIČNI TESTI	60
3.3.1	VPLIV VZORCEV VEČSLOJNIH MATRIC Z IN BREZ DODATKA PTX NA VIABILNOST FIBROBLASTOV	60
3.3.2	ADHEZIJA IN PROLIFERACIJA FIBROBLASTOV V DIREKTNEM STIKU Z VEČSLOJNIMI MATRICAMI	61
3.3.3	TESTIRANJE BIODOKOMPATIBILNOSTI NA KULTURI ČLOVEŠKIH KOŽNIH FIBROBLASTOV	62
3.3.4	VPLIV PRIPRAVLJENIH VEČSLOJNIH NANOFILMOV NA VNUTRANJE INDUCIRANO Z BAKTERIJSKIM LPS	62
4	DISKUSIJA.....	63
4.1	PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA MODELNIH POLIMERNIH FILMOV	64
4.2	NADZOROVANO SPROŠČANJE PTX.....	68
4.2.1	KUMULATIVNA MASA SPROŠČENEGA PTX KOT FUNKCIJA ČASA.....	68
4.2.2	ANALIZA VPLIVA INKORPORIRANE KONCENTRACIJE PTX NA SPROŠČENO KOLIČINO PTX	70
4.2.3	ODSTOTEK SPROŠČENEGA PTX KOT FUNKCIJA ČASA.	71
4.2.4	EVALUACIJA MEHANIZMOV SPROŠČANJA PTX	72
4.2.5	POVEZANOST/PRENOSLJIVOST REZULTATOV IN VITRO SPROŠČANJA PTX IZ VEČSLOJNIH NANOFILMOV V KLINIČNO PRAKSO.....	73
4.3	CELIČNI TESTI	74
4.3.1	VPLIV VZORCEV VEČSLOJNIH MATRIC Z IN BREZ DODATKA PTX NA VIABILNOST FIBROBLASTOV	75
4.3.2	ADHEZIJA IN PROLIFERACIJA FIBROBLASTOV V DIREKTNEM KONTAKTU Z VEČSLOJNIMI NANOFILMI	76
4.3.3	TESTIRANJE BIODOKOMPATIBILNOSTI NA KULTURI ČLOVEŠKIH KOŽNIH FIBROBLASTOV	77
4.3.4	VPLIV NA INFLAMACIJO INDUCIRANO Z LPSOM	78
5	ZAKLJUČEK	79
6	LITERATURA	80
7	ČLANEK NA TEMO DOKTORSKE NALOGE.....	98
8	PRILOGE	114
8.1	ŽIVLJENJEPIŠ JAN STANA	114

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Pregled osnovnih tipov obližev.	8
Tabela 2: Polimeri, ki se pogosto uporabljajo kot del obližev.	8
Tabela 3: R^2 vrednosti fitajna rezultatov sproščanja za hitro in konstantno sproščanje (kinetika ničtega reda in Korsmayer-Peppas model).	58
Tabela 4: Prikaz hipotetične mase PTX v večslojnih polisaharidnih maticah, ki bi jih lahko uporabili v klinični praksi.	59

KAZALO SLIK

Slika 1: Različni načini kompresijske terapije (8).	2
Slika 2: Aktivacija trombocitov z elektronskim mikroskopom (56).	12
Slika 3: Faza vnetja. Levo: (65) in desno: Jan Stana (foto).	14
Slika 4: Faza proliferacije. Levo: (65) in desno: Jan Stana (foto).	16
Slika 5: Faza zorenja rane. Levo: (65) in desno: Jan Stana (foto).	16
Slika 6: Funkcionalna in okvarjena venozna zaklopka (93) ter primer kronične manifestacije kronične venozne insuficience brez ulkusov (vir: Google slikovne iskanje).	21
Slika 7: Ekstravazacija levkocitov v tkivo (103).	24
Slika 8: Shematski prikaz intracelularne signalne poti TNF- α (116).	27
Slika 9: Shematski prikaz strukture oklepa raka v kateri se nahaja (134).	29
Slika 10: Pomembni polisaharidi /Knjiga T. Maver in sod.; Springer Briefs, in press/.	30
Slika 11: Hitozan (vir: Wikipedia).	31
Slika 12: Primer priprave hitozanskih oblog s vključenimi Ag nano delci.	32
Slika 13: Alginat (vir: Wikipedia).	33
Slika 14: Shematski prikaz tvorjenja alginatnih gelov (151).	33
Slika 15: Pentoksifilin (vir: Wikipedia).	35
Slika 16: Glavna metabolita PTX: a) lizofilin (M1) in b). 3,7,-dimetil-1(3-karboskipropil)ksantin (M5).	36
Slika 17: Primer izvedbe Scratch assy-a (187).	38
Slika 18: Shematski prikaz prehoda električnega toka pri nizki frekvenci (A) in pri visokih frekvencah (B) (190).	39
Slika 19: Shematski prikaz Bodenove komore (A) in Zigmondove komore (B) (194, 195).	40
Slika 20: Struktura MTT in nastalega obarvanega formazana (197).	41
Slika 21: poenostavljena shema , ki prikazuje ATP in luciferin, ki služita kot substrat luciferazi za tvorbo svetlobe (199).	42
Slika 22: Si-rezina: a) pred rezanjem v primerno obliko in b) po pripravi substratov za nadaljnje eksperimentalno delo (foto: Inštitut za biomedicinske vede, Medicina fakulteta Univerze v Mariboru).	43
Slika 23: Shematski prikaz večslojnega sistema z dodatkom PTX.	45
Slika 24: Meritev stičnega kota: a) slika naprave in b) shematski prikaz kapljic na površini in meritve SCA.	46
Slika 25: IR spektrofotometer podjetja Agilent (foto: Uroš Maver).	46
Slika 26: Profilometer podjetja Veeco (vir: Google slikovno iskanje).	47
Slika 27: Kvarčna mikrotehnica podjetja Q-Sense (vir: Q-sense).	48
Slika 28: Mikroskop na atomsko silo podjetja Keysight (foto: Uroš Maver).	49
Slika 29: Avtomatski sistem Francovih difuzijskih celic za spremljanje sproščanja iz topikalnih in transdermalnih farmacevtskih oblik (foto: Uroš Maver).	50
Slika 30: Spektrofotometer SPECTRAMAX plus 384 (vir: Google slikovno iskanje).	53
Slika 31: Luministar, BMG LabTech (vir: Google slikovno iskanje).	53
Slika 32: CASY TT števec celic (vir: Google slikovno iskanje).	54
Slika 33: Spektrofotometer Varioskan (vir: Google slikovno iskanje).	55

Slika 34: Osnovne lastnosti pripravljenih večslojnih polisaharidnih nanofilmov sestavljenih in nasprotno nabitih TMC in ALG slojev: (a) debelina posameznih slojev, (b) njihova hrapavost, (c) s pomočjo QCM-D metode določena masa slojev (204).	56
Slika 35: Vrednosti stičnih kotov.	57
Slika 36: ATR-IR spekter večslojnih polisaharidnih nanofilmov pripravljenih (a) brez in (b) z vključenim PTX v različnih koncentracijah. Spekter večslojnih polisaharidnih slojev pripravljenih na alginatni kopreni so prikazani v (b) (204).	57
Slika 37: Morfologija posameznih vzorcev ter rezultati meritev hrapavosti njihove površine s pomočjo AFM (204).	58
Slika 38: Rezultati <i>in vitro</i> sproščanja PTX: a) masa sproščenega PTX v odvisnosti od časa, b) preverjanje linearnosti odvisnosti med količino vgrajenega PTX in sproščene mase PTX, c), delež sproščenega PTX kot funkcija časa, d) 1. odvod podatkov sproščanja za vse vzorce, e) profili sproščanja PTX v prvih 360min z uporabo <i>kinetike nultega reda</i> , f) profili sproščanja PTX v časovnem intervalu od 360min do 8640min z uporabo <i>Krosmayer-Peppas</i> modela (204).	59
Slika 39: Morfologija MRC- celic izpostavljenim nerazredčenim vzorcem z dodatkom PTX (A) in vzorcem brez dodatka PTX (B) v primerjavi z kontrolo po 48 urah (C) (204).	60
Slika 40: Aktivnost dehidrogenaze kot indikator za viabilnost MRC-5 celic izpostavljenim razredčenim in ne razredčenim vzorcem z dodatkom PTX in vzorcem brez dodatka PTX po 24 urah, 48 urah in 72 urah (204).	61
Slika 41: Dehidrogenazna aktivnost (A) an število celic (B) MRC-5 fibroblastov kultiviranih na steklu, ali na večslojnih matricah z dodatkom PTX in brez dodatka PTX (204).	61
Slika 42: Morfologija MRC-5 fibroblastov po 72 urni kultivaciji na steklu in na večslojnih matricah z dodatkom PTX in brez dodatka PTX. Na sliki A je viden monosloj fibroblastov na stekleni površini. Medtem kot je prišlo do upada celične gostote fibroblastih v direktnem kontaktu z večslojnimi matricami z dodatkom PTX (B) in do tvrobe klastrov fibroblastov (C) (204).	62
Slika 43: Prikaz rezultatov biokompatibilnosti večslojnih polimernih matric z različnimi koncentracijami PTX, ter njihov vpliv na rast fibroblastov (204).	62
Slika 44: Sekretija TNF- α ob dodatku LPS, ter prisotnosti vzorcev z dodatkom PTX (levi diagram) in brez dodatka PTX (desni diagram) (204).	63
Slika 45: Shematski prikaz končnega koraka priprave večslojnega filma in njegov vpliv na porazdelitev PTX znotraj slojev. Črne puščice predstavljajo hitro sproščanje PTX, ki ne vstopi v interakcije z matičnimi polisaharidi, rdeče puščice prikazujejo kontrolirano sproščanje po 360min (204).	68

KAZALO ENAČB

(1)	48
(2)	50
(3)	50
(4)	52
(5)	65

POVZETEK

Kronične rane predstavljajo velik socialno-ekonomski problem v zahodnem svetu. Eno najpomembnejših vrst kroničnih ran predstavlja kronična venozna razjeda, ki je odgovorna za okoli 80% vseh kroničnih razjed. Nova histo-patološka spoznanja so pokazala, da je lokalno, kronično vnetje v veliki meri odgovorno za patološke procese, ki vodijo do nastanka razjede kot tudi do upočasnjene procesa celjenja. V tej študiji je predstavljen nov možen pristop k terapiji kronične venozne razjede, ki temelji na lokalnem dajanju potentne protivnetne zdravilne učinkovine, pentoksifilin (PTX). V ta namen so bile razvite ne-toksične polisaharidne večslojne medicinske obloge iz hitozana in alginata, ki zraven nadzorovanega sproščanja zdravilne učinkovine, že same pozitivno vplivajo na potek celjenja kroničnih ran. V okviru razvoja in optimizacije postopkov priprave omenjenih medicinskih oblog so bili pripravljene in okarakterizirani najprej 2D modelni večslojni nosilni materiali, ter nato še obložena 3D alginatna koprena. S pomočjo različnih analiznih metod, smo dokazali uspešno pripravo večslojnih medicinskih oblog z dodanim PTX. Z analizo *in vitro* sproščanja je bilo pokazano, da tako pripravljene medicinske obloge omogočajo nadzorovano, dvo-stopenjsko sproščanje vodotopnega PTX. S pomočjo študij na humanih kožnih celicah smo pokazali biokompatibilnost večslojnih matric z dodatkom PTX. Za konec smo na osnovi eksperimenta na humanih monocitih potrdili tudi, da so pripravljene večslojne medicinske obloge preko delovanja PTX, uspešno zavre sproščanje TNF-alfa, ki je ključen vnetni mediator pri kroničnih venoznih razjedah.

UDK-števila: 616.147.3-001.4-036.1:615.28/.454.1 (043.3)

Multilayer Polysaccharide Nanofilms for Controlled Delivery of Pentoxifyllin and Possible Treatment of Chronic Venous Ulcer

ABSTRACT

Chronic wounds represent a huge socio-economical problem in the western sociality. One of the most common types of chronic wounds, is the chronic venous ulceration, which accounts for 80% of all chronic wounds. New histo-pathological insights have revealed that chronic local inflammation, which is believed to be preferentially caused by chronic venous insufficiency, is one of the major causes for the development and poor healing of chronic wounds. In this study we represent a new approach for the treatment of chronic venous ulcers, which is based on the local application of a potent anti-inflammatory drug, pentoxifyllin (PTX). TO achieve controlled release of PTX, and hence provide an efficient and safe local treatment, a non-toxic, multi-layered polysaccharide matrix based on alginate and chitosan was developed. Besides the controlled drug release, such composition has a well-known positive effect on wound healing on its own. As part of their development, 2D model multilayer matrices, as well as functionalized 3D alginate fleece was prepared and characterized. With the help of different analytical methods, it was possible to demonstrate the successful preparation of multilayer matrices with the added PTX. By analysing the *in vitro* release, it has been shown that the prepared matrices allow a controlled release of the incorporated substance. Further analysis of the drug release profiles has shown, that a two-step release mechanism of the substance was achieved. The biocompatibility of multilayer matrixces with the added PTX was demonstrated through cellular studies on human skin derived fibroblasts. Additional cellular testing using human monocytes confirmed our hypothesis, that the controlled release of PTX is able to inhibit the secretion of TNF-alpha.

KRATICE

IL-1	interlevkin -1
IL-1α	interlevkin -1 alfa
(IL-1 β)	interlevkin 1 beta
(IL-6)	interlevkin -6
TNF-α	tumornekrotizirajoči faktor alfa
TGF-1	transformirajoči rastni faktor 1
IL-10	interlevkin 10
IL-1 Ra	antagonist receptorja interlevkin 1
TGF-1β	transformirajoči rastni faktor beta 1
IGF	insulinu podobni rastni faktor
FGF-2	fibroblastni rastni faktor 2
VEGF-A	vaskularni endotelijski rastni faktor A
VEGf	vaskularni endotelijski rastni faktor
HIF	hipoksijsko inducirani faktor
EDRF	endotelijski relaksirajoči faktor
EDHF	endotelijski hiperporalizirajoči faktor
HIF-1α	hipoksijsko inducirani faktor 1 alfa
KGF	keratinocitni rastni faktor
NGF	živčni rastni faktor
IFN-γ	interferon gama
DNK	deoksiribonukleinska kislina
RNK	ribonukleinska kislina
NADPH	nikotinamidadenin dinukleotidfosfat
ROS	reaktivne kisikove vrste
cAMP	ciklični adozinmonofosfat
TACE	tumornekrotizirajoči faktor alfa konvertirajoči encim
NF-κB	jedrni faktor kapa B
MAPK	mitogen aktivacijska proteinska kinaza
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
ERK	zunajcelična signal-regulirajoča kinaza
CEAP	klinična- etiološka-anatomska-patofiziološka klasifikacija
ICAM-1	znotrajcelična adhezijska molekula 1

VCAM-1	vaskularna adhezijska molekula 1
VLA-4	zelo pozni aktivirajoči antigen 4
LFA-1	levkocitni funkcijski antigen 1
ALG	natrijeva sol alginske kisline
TMC	N,N,N-trimetilhitozan
EICS	impedančna spektroskopija
ATR-IR	infrardeča spektroskopija z oslavljenim totalnim odbojem
QCM-D	kvarčna mikrotehnica z meritvami disipacije
SCA(H₂O)	meritev stičnih kotov
HPGD	hidroksiprostaglandin degidrogenaza
ATP	adenozintrifosfat
MMP-2	metaloproteinaza 2
MMP-9	metaloproteinaza 9
MMP-1	metaloproteinaza 1
MPP-13	metaloproteinaza 13
TRADD	z receptorjem tipa 1 za tumor nekrotizirajoči faktor povezana smrtna domena
RIP	z receptorjem interagirajočec serinske/treoninske kinaze
IKK	proteinske kinaze IκB
SOD	superoksidna dismutaza
M1	3,7-dimetil-1-(5'hidroksiheksil)ksantin
M4	3,7-dimetil-1-(4-karboksibutil)ksantin
M5	3,7,-dimetil-1(3-karboskipropil)ksantin
cAMP	ciklični adenzinmonofosfat
PGE2	Prostaglandin E ₂

1 UVOD

1.1 Delovna hipoteza

S pomočjo hitozanske / alginatne večslojne matrice lahko pripravimo primeren modelni sistem večslojne medicinske obloge, ki omogoča vezavo in ciljno (podaljšano) sproščanje terapevtske količine Zdravilne učinkovine pentoksifilin (PTX). Sproščena učinkovina PTX zavira produkcijo tumornekrotizirajočega faktorja alfa (TNF- α) v modelu vnetnih ran, s čemer zavira vzdrževanje kroničnega vnetja ter posledično omogoča hitrejše celjenje ran.

1.2 Stanje raziskav na področju zdravljenja kroničnih venoznih ran

Pod pojmom kronične rane razumemo rane, ki kljub optimalni oskrbi v treh mescih ne kažejo napredka v celjenju oz. pri katerih v dvanajstih mesecih ne pride do vzpostavitve integritete kože in podkožja (1). V zahodnem svetu predstavljajo kronične rane velik socialno-ekonomski problem. Namreč, po podatkih zadnjih let se predvideva, da bo v razvitih deželah v prihodnje kar 1-1,5% prebivalstva razvilo kronično razjedo, pri čemer pa stroški, ki so povezani s terapijo kroničnih razjed, že sedaj obsegajo v povprečju 2-4% sredstev zdravstvene oskrbe (2, 3). Vzroki za nastanek kroničnih razjed so zelo različni. Med najpomembnejše dejavnike, ki vodijo do nastanka kroničnih razjed uvrščamo periferno arterijsko bolezen, diabetes melitus, venozno insuficienco, avtoimuna obolenja idr. Eden najpomembnejših in do sedaj še relativno slabo razumljenih tipov kroničnih ran predstavljajo kronične venozne razjede. V Evropi zbolijo za kronično venozno insuficienco 5% prebivalstva, 1% prebivalcev Evrope razvije kronične venozne rane, za katere je tipičen dolgotrajen potek celjenja in številne ponovitve bolezni (4, 5). Terapija kroničnih venoznih ran je zelo kompleksna in je sestavljena iz različnih elementov: kompresijske terapije, lokalne oskrbe rane in kirurške terapije površinskega venoznega sistema.

1.2.1 Kompresijska terapije

Osnovo vsakemu zdravljenju kroničnih venoznih razjed predstavlja kompresijska terapija. Primarni cilj kompresijske terapije je zmanjšati obseg edematoznih okončin, ter preprečiti komplikacije, ki so povezane s kroničnimi edemi. S pomočjo eksterne kompresije, pride do zmanjšanja premera obolelih ven in s tem do zmanjšane venoznega refluksa ter izboljšanja funkcije mišične črpalke (6). Terapijo lahko izvajamo na tri različne načine in sicer: s kompresijskimi povoji, kompresijskimi nogavicami ali pa z napravami z občasno eksterno kompresijo (**Slika 1**) (7). Martson et. al. so v študiji pokazal da se je 57% kroničnih venoznih ran, ki so bile zdravljene s eksterno kompresijsko terapijo, zacelilo v 10 tednih in 75% v 16 tednih. Negativni napovedni dejavniki za napredovanje celjenja ran so bili velikost rane ($> 20\text{cm}^2$), čas obstoja rane, ter periferna arterijska bolezen kot dodaten vzrok za nastanek rane (7).



Slika 1: Različni načini kompresijske terapije (8).

Medtem ko obstajajo številne rešitve za oskrbo kroničnih ran, je njihova učinkovitost še vedno le delna. Zato je iskanje novih pristopov še vedno izredno zanimivo, pri čemer se vse več raziskovalcev loteva iskanja rešitev predvsem na ravni patofizioloških procesov, ki privedejo do specifičnega tipa kronične rane. Ena izmed možnih razlag, za izboljšanje celjenja kronične venozne rane se tako najbrž skriva v analizi njihovega eksudata. Številne študije so pokazale, da je za začetek celjenja ran potreben tarčni vnetni odgovor (9-11). Pri miših, ki so bile zdravljene z glukokortikoidi, je bilo moč opaziti manj izrazit imunski odgovor na akutno poškodbo, kar je tudi vodilo do zakasnjene celjenja rane (12). Inicijacija vnetnega odgovora omogoča obrambo organizma pred vdorom tujkov, kot tudi odstranitev ostankov (*angl.* debris)

s površine ran. V tej fazi igrajo najpomembnejšo vlogo nevtrofilci in makrofagi. V naslednjem koraku pride do zmanjšanja intenzitete imunskega odgovora, kar omogoča napredovanje v procesu celjenja (12). Analiza eksudata kroničnih ran, ki niso bile zdravljene s kompresijo, je pokazala povišano koncentracijo proinflammatoryh mediatorjev, med katerimi izstopajo interleukin -1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) in TNF- α . Po štirih tednih zdravljenja s eksterno kompresijo, je moč zaslediti signifikantni upad v koncentraciji proinflammatoryh vnetnih mediatorjev (13). Pri analizi različnih proteinov v eksudatu ran, je bilo prav tako moč zaslediti signifikantni porast transformirajočega rastnega faktorja beta 1 (TGF- β 1), interleukina 10 (IL-10), antagonist receptorja interleukin-1 (IL-1 Ra), za katere velja, da imajo protivneten vpliv (13). Rane, ki so pred zdravljenjem imele zelo visoko koncentracijo vnetnih mediatorjev in pri katerih je med zdravljenjem prišlo do hitrega upada v koncentraciji le teh, so pokazale pozitiven potek celjenja. Podobno se je pokazalo pri ranah, pri katerih je bila izmerjena povišana koncentracija interferona gama (IFN- γ) v eksudatu (13). IFN- γ je glikoprotein s številnimi imunološkimi funkcijami, med drugim supresija številnih genov, ki so odgovorni za celični cikel, replikacijo deoksiribonukleinske kisline (DNK) in metabolizem ribonukleinske kisline (RNK) v keratinocitih (14). Pozitiven vpliv kompresijske terapije je tudi povišanje koncentracije transformirajočega rastnega faktorja-1 (TGF-1), IL-10 in IL-1 Ra, za katere velja, da inhibirajo vnetne procese (13).

1.2.2 Lokalna oskrba ran

Za kronične rane velja, da se proces njihovega celjenja navadno ustavi v vnetni oz. proliferacijski fazi celjenja. V teh fazah celjenja je značilno, da pride do prekomerne tvorbe ekstracelularnega matriksa in fibrina (15). Dodaten problem pri celjenju kroničnih ran predstavlja nekrotično tkivo, saj le to upočasni proces celjenja in inhibira migracijo keratinocitov v rani (16). S pomočjo debridmenta ran lahko odstranimo nevitalno tkivo in tako ponovno spodbudimo fiziološki proces celjenja. Pod pojem debridemnt ran danes razumemo

mehanično odstranitev adherentnega debrisa oz. nekrotičnega tkiva, kar lahko dosežemo na različne načine: z kirurškim in mehaničnim čiščenjem ran, z obliži, ki spodbujajo avtolizo (kalcijev alginat, hidrogeli, hidrokoloidi), z biokirurškimi metodami (larve) in z encimatskim čiščenjem (kolagenaze) (17, 18).

Med mehanično čiščenje ran štejemo odstranjevanje adherentnih oblog na rani s pomočjo kompres in blazinic s monofilamentnimi vlakni. Ta način odstranjevanja oblog v rani je ena najpogostejše uporabljenih metod. Omejitev čiščenja ran s kompresami oz. navlaženimi gazami predstavlja povečan riziko za lokalne infekcije, ter nelagodje, povezano z bolečino pri pacientih. Blazinice s monofilamentni vlakni postajajo v moderni oskrbi kroničnih ran vse pogostejši dodatek za mehanično čiščenje. V številnih manjših študijah je bila pokazana zadovoljiva redukcija oblog in zmanjšan občutek bolečin (19).

Za kirurški debridement potrebujemo sterilni instrumentarij, v katerega spadajo pinceta, skalpel, škarje in kirete. Pogosto je še dodatno potrebna lokalna, regionalna ali pa tudi splošna anestezija. S pomočjo kirurških posegov lahko v zelo kratkem času odstranimo večje količine nekrotičnega tkiva in s tem omogočimo hitrejše celjenje rane (20). Kirurška odstranitev inficiranega, nekrotičnega tkiva igra posebej pomembno vlogo pri obvladovanju lokalnih infekcij ran (21).

Čeprav so se v zadnjih letih metode kirurškega debridementa uveljavile v oskrbi kroničnih ran, pa obstaja relativno malo študij, ki bi sistematično vrednotile njihov učinek na potek celjenja (22). Posamezne objave opisujejo pozitiven efekt na celjenje in zmanjšane bolečin po kirurškem debridementu (21, 23). Pomembno vlogo igra kirurško zdravljenje ran pri pacientih s sindromom diabetičnega stopala, kjer radikalni debridment, ter manjše amputacije predstavljajo pomembno orožje pri obvladovanju infekcij. Čeprav še trenutno ne obstajajo randomizirane klinične študije, ki bi potrdile efekt periodičnega kirurškega čiščenja ran, pa je njihov pozitiven učinek opisan v številnih manjših študijah (16, 17).

Vlažnost ran povzroča aktivacijo endogenih avtolitičnih encimov v tkivu (metaloproteinaz, kolagenaz, elastaz, mieloperoksidaz) in fagocitov. Aktivirani avtolitični encimi v rani omogočajo selektivno in manj travmatično odstranjevanje debrisa iz ran (19). Za ta namen so primerni hidrogeli, ki zaradi svojih kemijskih lastnosti zagotavljajo veliko količino vlage v rani (7). Moderni hidrogeli lahko z dodatkom različnih aktivnih snovi (npr. rastnih faktorjev, zdravilnih učinkovin) dodatno vplivajo na potek celjenja ran. Vlaga v rani povzroči nabrekanje fibrinskih oblog in nekrotičnega tkiva, kar dodatno spodbuja fagocitozo. V primerjavi z ranami, ki so neposredno izpostavljene okolici, celijo rane, katerim zagotavljamo dovoljšno količino vlage, približno 50% hitreje. Pri »suhih« ranah pride do izsušitve kolagenskega matriksa in okoliškega tkiva, ter s tem do tvorbe čvrstih krast. Keratinociti, ki so nujni za re-epitelizacijo ran, lahko migrirajo samo preko vitalnega tkiva, ki jim zagotavlja potrebna hranila in kisik. Da pride do re-epitelizacije krast, morajo keratinociti izpodriniti le to, da bi lahko migrirali proti centru rane, za kar je potrebno veliko več časa in energije (24).

Za odstranitev zelo čvrstih oblog v rani, ki niso primerne za kirurško terapijo, se lahko poslužimo encimatskih gelov. Že več stoletij so se v namen čiščenja ran uporabljali različni rastlinski ekstrakti, ki s svojimi proteolitičnimi encimi razgrajujejo obloge na ranah. Od leta 1960 naprej obstajajo številni znanstveni članki, ki opisujejo pozitiven efekt encimatskega debridementa. Najpogosteje uporabljena encima sta koagulaza in papain (25). Koagulaze so zmožne razgrajevanja kolagenskih in elastinskih oblog, medtem pa niso sposobne razgrajevanja fibrina (26). *In vivo* študije so pokazale, da koagulaze izboljšajo tvorbo endotelnih celic in pospešujejo migracijo keratinocitov (25, 27). S pomočjo *in vitro* modelov ran je bilo moč pokazati, da je učinkovitost debridementa močno odvisna od koncentracije encima (28). Zaradi pozitivnega vpliva na celjenje (in posledično tudi na čas terapije oz. po možnosti tudi hospitalizacije) imajo geli z dodatkom koagulaze tudi pozitiven ekonomski učinek v primerjavi s uporabo konvencionalnih obližev (29).

Skozi stoletja je tudi znano, da aplikacija ličink muh *Lucilia sericata* na določene kronične rane, izboljša njihovo celjenje. V slini ličink se nahajajo encimi, ki razgrajujejo nekrotično tkivo in fibrinske obloge v rani. Klinične študije so pokazale, da pri terapiji z medicinskimi ličinkami pride do hitrejše odstranitve debrisa v primerjavi s avtolitičnim čiščenjem rane (30, 31). Velika pomanjkljivost te terapije ostajajo bolečine, ki se pogosteje pojavljajo pri pacientih in pogosteje pogojujejo prekinitve terapije.

1.2.3 Pregled obližev za oskrbo kroničnih ran

Materiale za oskrbo ran so v različnih oblikah uporabljali že pred dvema tisočletjema, medtem ko je bila teorija celjenja in oskrbe ran postavljena šele pred dobrimi stotimi leti (32). Za oskrbo kroničnih ran, so se v preteklosti uporabljali številni različni materiali rastlinskega in živalskega izvora, ki so zmanjšali bolečine, ustavili krvavitev, absorbirali eksudat in izboljšali tvorbo granulacijskega tkiva.

Kontaminacija ter infekcija kroničnih ran predstavljata tudi v zahodnem svetu velik problem. Že v 19. stoletju je prišlo do prvih izboljšav na področju higiene in obdelave materialov, ki so bili uporabljeni v oskrbi kroničnih ran. Pomemben napredek na tem področju je predstavljalo delo Listerja v letu 1867, ki je bombažne obloge obdelal s karbolno kislino in s tem dosegel redukcijo števila bakterij v rani (33). Malo za tem so sledili prvi kompleksnejši povoji. Gemgee je za izboljšanje antiseptičnega delovanja, bombažnim oblogam dodal jod in tako proizvedel prve večkomponentne obloge za oskrbo ran (33). S dodatkom parafina je v dvajsetih letih prejšnjega stoletja prišlo do izboljšanja proti-adhezivnih lastnosti bombažnih obližev in s tem olajšanja oskrbe opeklin (33). Spoznanje, da rane v vlažnem okolju celijo bolje, je vodilo v drugi polovici prejšnjega stoletja do razvoja okluzivnih oblog, ki s pomočjo kombinacije različnih materialov omogočajo dodatno regulacijo vlage v rani in absorpcijo prekomernega eksudata (34). Globlje razumevanje patofizioloških procesov nastanka kroničnih ran je doprineslo do velikega napredka v razvoju obližev za oskrbo kroničnih ran (35).

1.2.3.1 Klasifikacija oblog za oskrbo ran

Trenutno je na tržišču veliko število različnih oblog, ki so prilagojene vedno bolj specifični oskrbi posameznih tipov kroničnih ran. Vedno večjemu številu oblog in vedno novim inovacijam na tem področju sledijo tudi vedno nove klasifikacije. Tako lahko obloge razdelimo glede na njihovo funkcijo v oblogi, na tiste, ki spodbujajo debridement, antimikrobne obloge, okluzivne obloge, absorpcijske obloge, ter adhezivne obloge. Glede materialov, iz katerih so obloge, ločimo hidrokolidne obloge, alginatne obloge, kolagenske obloge, obloge iz poliuretanske pene oz. filma, in hidrofobne protimikrobne obloge. Glede na njihove fizikalne lastnosti ločimo kreme, filme, pene, gele in vlakna (33). Obloge ki so v direktnem kontaktu s površino rane imenujemo primarne obloge. Za izboljšanje absorpcije eksudata ob hkratni zaščiti rane, se poslužujemo sekundarnih povojev, ki niso v direktnem stiku z rano in samo prekrivajo primarne povoje (33).

1.2.3.2 Pregled sodobnih oblog za oskrbo kroničnih ran

Prelomnico v oskrbi kroničnih ran predstavlja spoznanje, da rane, pri katerih vzdržujemo vlažno okolje celijo dvakrat hitreje, kot pa rane, ki tvorijo kraste. To spoznanje je vodilo do razvoja in uporabe vedno novih materialov, ki vse bolj nadomeščajo tradicionalne povoje kot so npr. bombažne komprese (33). Razumevanje patofiziologije kroničnih ran nam omogoča vse boljšo oskrbo ran. Tako se danes lahko poslužujemo različnih materialov, ki s pomočjo svojih lastnosti optimalno spodbujajo proces celjenja. Za specialiste, ki se ukvarjajo s oskrbo pacientov to pomeni, da se morajo v različnih fazah celjenja posluževati različnih oblog, ter poznati njihove lastnosti. **Tabela 1** zajema pregled osnovnih tipov obližev, ki so trenutno v uporabi, medtem ko **Tabela 2** prikazuje najbolj pogosto uporabljane materiale za pripravo obližev v uporabi.

Tabela 1: Pregled osnovnih tipov obližev.

Tipi obližev	Materiali	Lastnosti obližev
Hidrokoloidni obliži	hidrofilna karboksimetilceluloza v kombinaciji s hidrofobnim pektinom	<ul style="list-style-type: none"> • Ohranja konstanto okolje v rani (36) • Interakcija s eksudatom in tvorba (36) • Znižanje pH in s tem inhibicija rasti (37) • Z znižanjem pH pride do aktivacije proteoličnih encimov (35)
Hidrogeli	poli(metakrilat), polivinilpirolidine; z dodatkom kolagena, alginata, peptidov in polisaharidov	<ul style="list-style-type: none"> • Omogočajo hidracijo (38) • Pospešujejo avtolitične procese v rani in s tem omogočajo čiščenje (35) <ul style="list-style-type: none"> • Zmanjšujejo bolečino
Obliži s poliuretanske pene	poliuretan	<ul style="list-style-type: none"> • Vzdržujejo optimalno vlago v rani (38) • Stimulirajo angiogenezo (37) • Zmanjšujejo hipergranulacijo (38)
Tankoslojni obliži	poliuretan	<ul style="list-style-type: none"> • Permeabilni za vlago • Primerni za površinske rane s malo eksudata • Bariera pred bakterijami
Alginatni obliži	alginat, alginska kislina	<ul style="list-style-type: none"> • Absorbirajo veliko količino tekočine (39) • Tvorijo gel, ki spodbuja čiščenje ran (39) • S sproščanjem Ca izboljšajo tvorbo krvnih strdkov (39)

Tabela 2: Polimeri, ki se pogosto uporabljajo kot del obližev.

Polimeri	Kemična struktura	Lastnosti
Hitosan in derivati	Hitozan z različnimi stopnjami deacetilizacije	D-glukosamin, N-acetil-D-glukosamin
Hialuronska kislina in derivati	Natrijev hialuronat s visoko molekularno težo HA geli	A-1,4-D-glukoronska kislina, β -1,3-N-acetil-D-glukosamin,
		<ul style="list-style-type: none"> • Spodbija hemostazo(40) • Antimikrobni efekt (40) • Spodbuja tvorbo granulacijskega tkiva(41) • Spodbuja angiogenezo in re-epitelizacijo (40) • Strukturna molekula ekstracelularnega matriksa • Spodbuja migracijo in diferenciacijo mezenhimskih in epitelnih celic • Spodbuja tvorbo kolagena • Angiogeneza • Modulacija vnetnih procesov

Celuloza in derivati	Obloge iz celuloze Celulozne pene z dodatkom kolagena Karboksimetilna celuloza v obliki koprene ali gela	β -1,4 vezana D-glukoza	<ul style="list-style-type: none"> • Absorpcija eksudata • Spodbuja migracijo fibroblastov in sproščanje rastnih faktorjev • Inhibicija rasti bakterij
Alginat	Alginatni hidrogel Alginatna koprena	B-D-manuronat in α -L-glukoronat	<ul style="list-style-type: none"> • Formacija hydrogela preko izmenjave ionov • Absorpcija eksudata • Spodbuja avtolitično čiščenje rane • Redukcija števila bakterij v rani
Kolagen and Gelatin	Kolagenski obliži Kolagenske alginatne pene	Protein	<ul style="list-style-type: none"> • Zavirajo vnetni odgovor • Redukcija števila bakterij • Stimulacija granulacijskega tkiva
Poliuretan	Poliuretanski film Poliuretanska pena	1,6-Heksandisocianat, 1,4-Butandiol	<ul style="list-style-type: none"> • Absorpcija prekomernega eksudata • Zaviranje hipergranulacije

1.3 Predlagana nadgradnja zdravljenja kroničnih venoznih ran - predlog novega lokalnega koncepta zdravljenja

Trenutna terapija kroničnih venoznih razjed temelji na kirurški oz. minimalno invazivni sanaciji obolelega površinskega venoznega sistema, kompresijski terapije, ter lokalne oskrbe kronične razjede. Kljub naraščajočemu znanju glede patofiziologije nastanka venozne razjede in njegovi povezanosti z vnetjem, se temu pomembnemu etiološkemu dejavniku za nastanek kronične razjede, trenutno posveča zelo malo pozornosti. Številni materiali, ki so namenjeni lokalni oskrbi ran se osredotočajo na absorpcijo prostega eksudata, lokalne redukcije števila bakterij, ter spodbujanja avtolitičnih sposobnosti rane. Novejši materiali, skušajo dodatno reducirati proste radikale in produkte kroničnega vnetja, ter oksidativnega stresa, ter s tem izboljšati potek celjenja kroničnih ran (42). Pomembna pomanjkljivost teh materialov je, da aktivno ne vplivajo na procese vnetja, ki stojijo za nastankom razjed, temveč samo odstranjujejo posledice, ki jih

je vnetje povzročilo. Lokalno terapijo razjed, lahko dopolnjujejo tudi številni različni preparati *per os*, ki imajo pozitiven učinek na potek celjenja. Med drugim spadajo med to skupino zdravil flavonoidi, rutozidi, pentoksifilin (PTX), ter glikozaminoglikani (43). Med naštetimi, je PTX (natančnejši opis sledi v poglavju 1.9. *Pentoksifilin*) eden izmed preparatov z največjim potencialom, saj ima s svojim protivnetnim delovanjem pomemben vpliv na samo etiologijo nastanka kronične venozne razjede. V eksudatu kroničnih venoznih ran, je povišana koncentracija TNF- α , ki predstavlja enega od osrednjih vnetnih citokinov (13). PTX, kot neselektivni inhibitor fosfodiesteraze zavira nastanek TNF- α in s tem inhibira vnetni proces, ki poglavitno vpliva na upočasnen potek celjenja. V številnih študijah je bilo pokazano, da se z oralno aplikacijo PTX skrajša čas, ki je potreben za celjenje ran (44, 45). Ne glede na pozitivne učinke PTX, ki so bile pokazane v študijah, pa obstajajo tudi določene omejitve sistemskega (*per os* dajanje) zdravljenja s PTX. Pomembna omejitev terapije so gastroenterološki neželeni učinki, ki se pogosteje pojavljajo ob višjih dozah (43). Pri starejših bolnikih, ki se dodatno zdravijo s antikoagulantami oz. inhibitorji agregacije trombocitov, je dodatna aplikacija pentoksifilina, zaradi njegovega inhibitornega učinka na agregacijo trombocitov, kontraindicirana. Lokalna aplikacija zdravila, bi pomembno vplivala na znižanje neželenih učinkov, pri višjih koncentracijah PTX, ki imajo boljši vpliv na celjenje kroničnih ran (43, 44). Prav tako je dodatna vrednost lokalne aplikacije, zmanjšan rizik krvavitev ob sočasni terapiji z antikoagulantami.

1.4 Teoretične osnove

Številni različni koncepti opisujejo patofiziološke procese, ki stojijo za nastankom kroničnih venoznih razjed. Skupno vsem je, da insuficienca površinskega venoznega sistema, ki je lahko posledica okvare zaklopk ali pa tromboze globokega venskega sistema, vodi do sprememb v tkivu, ki so posledica kroničnega vnetnega procesa (46).

Histopatološke in imunohistološke preiskave so pokazale, da so lezije, ki so značilne za različne stopnje kronične venozne insuficience, posledica dolgotrajnega vnetnega odgovora in ne nekroze, ki je eden poglavitnih vzrokov za nastanek razjed pri periferni arterijski okluzivni bolezni (47, 48).

1.4.1 Fiziologija celjenja ran

Fiziološki proces celjenja je eden izmed ključnih za vzdrževanje homeostaze telesa. Pri tem gre za kompleksne večstopenjske procese, ki ob poškodbi omogočajo ponovno vzpostavitev integritete kože in podkožja, ki je bistvena za vzdrževanje homeostaze tekočine v telesu in preprečitve infekcij. Fiziološki proces celjenja rane večinoma razdelimo v štiri stopnje, čeprav nekatera literatura uvodno fazo hemostaze, obravnava ločeno od samega procesa celjenja.

1.4.1.1 Hemostaza

Za prvo fazo celjenja ran je značilno, da pride do hemostaze ter do formacije začasnega zunajceličnega matriksa. Ob prekinitvi integritete kože in podkožja pride tudi do poškodbe krvnega in limfnega sistema. V prvi fazi celjenja skuša telo omejiti vpliv na homeostazo telesa, ter tako predvsem preprečiti izgubo krvi, kar najhitreje doseže z vazokonstrikcijo, ki lahko traja nekaj minut. Pod fiziološkimi pogoji vzdržuje žilni endotelij relativno nizki tonus. Za to se odgovorni prostaciklini, endotelijski relaksirajoči faktor (EDRF), ter endotelijski hiperporalizirajoči faktor (EDHF), ki jih sensitizira zdrav žilni endotelij. Ob poškodbi pride do prekinitve sinteze teh faktorjev, ter do sproščanja endotelina in endotelijskega konstriksijskega faktorja, kar povzroči vazokonstrikcijo (49). Vazokonstrikcija lahko traja nekaj minut in ima za posledico znižanje pH ter povečano glikolizo, kar vodi do relaksacije gladkih mišic žilne stene in vdora različnih krvnih celic v rano (50). Poškodbe žilnega endotelija vodijo do izpostavljenosti kolagena v žilni steni, kar povzroči aktivacijo ekstrinzičnega dela koagulacijske kaskade. V naslednjem koraku vodi adhezija, aktivacija in agregacija

trombocitov, do aktivacije intrinzične koagulacijske kaskade. Tako pride do formacije strdkov, ki v prvi fazi služijo zamašitvi žilja in s tem zaustavijo krvavitev. Dodatno pa služijo fibrin, fibronektin, vitronektin in trombospodin, ki se nahajajo v strdkih, kot začasni zunajcelični matriks in s tem omogočajo migracijo celic v poškodovano območje (51). Aktivacija trombocitov (**Slika 2**) in limfocitov vodi do sproščanja kemokinov in rastnih faktorjev, ki vodijo v nastanek vnetnega odgovora preko interleukin-1 alfa (IL-1 α), interleukin-1 beta (IL-1 β), (IL-6) in (TNF- α), izzovejo stimulacijo sinteze kolagena ((TGF- β) ter inzulinskega rastnega faktorja (IGF), fibroblastni rastni faktor 2 (FGF-2), vodijo do transformacije fibroblastov v miofibroblaste (TGF- β), spodbujajo angiogenezo preko FGF-2, vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja A (VEGF-A), hipoksijsko inducirane faktorja 1 alfa (HIF-1 α) in TGF- β , ter spodbujajo re-epitelizacijo preko epidermalnega rastnega faktorja (EGF), FGF-2 in IGF (7, 52). Metabolizem arahidonske kisline, ter produkcija eikosanoidov vodita do dodatne kemotakse nevtrofilcev v rano (53). Ta korak je poglobljen za nadaljevanje celjenja. Fibrinogen, ki se nahaja v rani in ki povezuje trombocite v »kompaktno tvorbo«, služi kasneje kot matriks za makrofage in fibroblaste (54) (55).



Slika 2: Aktivacija trombocitov z elektronskim mikroskopom (56).

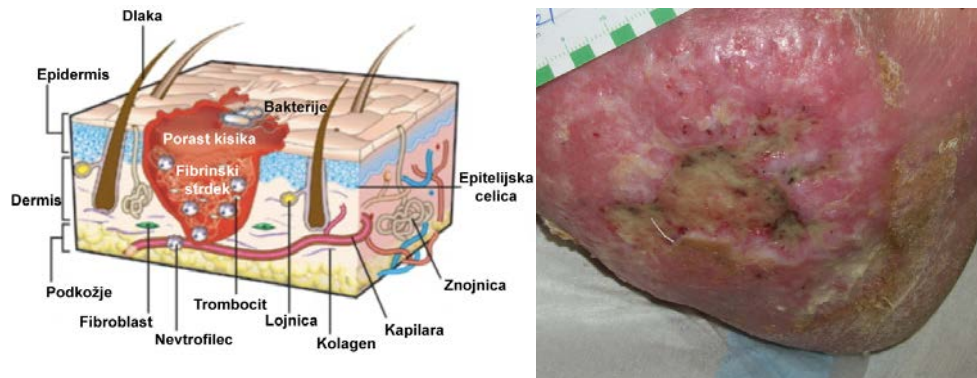
1.4.1.2 Vnetje

Faza vnetja (**Slika 3**) se prične že fazi homesotaze. Normalno lahko vnetje razdelimo na zgodnjo fazo vnetja, za katero je značilen vdor nevtrofilcev na mesto poškodbe (oz. prekinjene integritete), in pozno fazo vnetja, ki je definirana s transformacijo monocitov v makrofage (57). Pod vplivom aktivacije komplementa, degranulacije trombocitov, ter različnih proteinov, ki jih

sintetizirajo bakterije pride nekaj minut po poškodbi do migracije nevtrofilcev na mesto poškodbe, kjer lahko ostanejo 2-5 dni. Za to fazo celjenja rane je značilno povečana permeabilnost kapilar in kopičenje celic v zunajceličnem matriksu (54). Migracija nevtrofilcev na mesto poškodbe je izrednega pomena, saj s pomočjo fagocitoze in sekrecijo protimikrobnih substanc (kationski peptidi, eikosanoidi), ter proteinaz (elastaze, katepsin G, proteinaza 3, urokinazni plazminogeni aktivator) preprečujejo infekcije in omogočajo odstranjevanje nekrotičnega tkiva. Nevtrofilci služijo kot rezervoar različnih kemokinov (TNF- α , IL-1 β , IL-6), ki imajo vpliv na nadaljnji potek vnetja (58). V različnih živalskih modelih je bilo pokazano, da je za fiziološki proces celjenja izrednega pomena število nevtrofilcev na mestu poškodbe, kot tudi njihova sposobnost fagocitoze. Starejše laboratorijske podgane, pri katerih je zmanjšana migracija nevtrofilcev na mesto poškodbe, ter zmanjšano sposobnost fagocitoze, so pokazale upočasnen potek celjenja (59). Pomembna lastnost nevtrofilcev, je njihov vpliv na fenotip, ter vrsto citokinov, ki jih secernirajo makrofagi, ter s tem na potek ter sprožitev pridobljenega imunskega odgovora (60).

Tri dni po poškodbi pride do povečanja koncentracije makrofagov, ki spodbujajo vnetni proces s fagocitozo patogenov in celičnega odmrlega tkiva, ter sekrecijo rastnih faktorjev, kemokinov in citokinov. Makrofagi opravljajo številne naloge, med katerimi so najpomembnejše obramba telesa pred patogeni, odstranjevanje apoptotičnih celic, ter spodbujanje proliferacije in vzpostavitve integritete tkiva (61). Vloga makrofagov na potek celjenja še ni popolnoma razumljena. V novejših študijah je bilo dokazano, da se makrofagi pojavljajo v različnih fenotipih, za katere je značilno, da poglavito vplivajo na potek celjenja. Pri miših obstajajo cirkulirajoči monociti v pro-vnetni obliki, z ekspresijo limfocitnega antigenega kompleksa 6 (Ly6C) v visoki koncentraciji in protivnetni monociti z nizko ekspresijo Ly6C. V zgodnji fazi po poškodbi tkiva so makrofagi iz živalskih modelov z mišmi pokazali višjo ekspresijo Ly6C, kar je posledica akutnega vnetnega odgovora. V pozni fazi vnetja, ko se v rani pričinja proliferacija, so izolirani makrofagi pokazali nižjo stopnjo ekspresije Ly6C, kar govori v prid

vloge makrofagov v iniciaciji proliferacije tkiva (61) (62). Podobno se tudi pri ljudeh monociti pojavljajo kot »pro-vnetni monociti« CD14^{lo} in »protivnetni monociti« CD14^{hi} (63). Makrofagi imajo poleg vloge pri fagocitozi in prezentacije antigenov, dodaten pomen kot potenten rezervoar rastnih faktorjev, med drugim PDGF, TGF- β , FGF, IL-1, IL-6 in TNF- α , ki stimulirajo rast fibroblastov, ter sintezo ekstracelularnega matriksa (64).



Slika 3: Faza vnetja. Levo: (65) in desno: Jan Stana (foto).

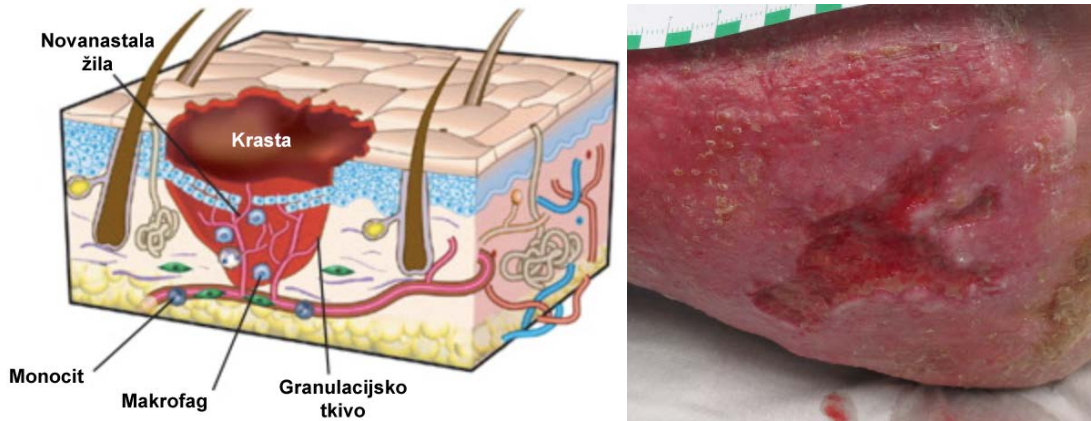
1.4.1.3 Proliferacija

V fazi proliferacije (**Slika 4**) je glavni fokus tvorba granulacijskega tkiva in tvorbe kapilar. Dva do tri dni po poškodbi omogoča fibrin, ki v rani nastane kot produkt hemostaze, ter PDGF in TGF- β , ki se sprostita iz trombocitov in makrofagov, migracijo fibroblastov na poškodovano območje. Pod normalnimi pogoji telo potrebuje 14 dni za tvorbo granulacijskega tkiva. Pod vplivom citokinov, kot sta TGF- β in IFN- γ pride do sekrecije kolagena, fibronektina, ter drugih elementov zunajceličnega matriksa, ki predstavljajo osnovo, za zmanjšanje nastalega defekta in povečanje mehanične čvrstosti rane (66).

Osnova za re-epitelizacijo rane predstavljajo keratinociti na robu rane, ter keratinocitne matične celice, ki se nahajajo v rastnih foliklih, ter znojnicah (67). Aktivacijo procesa re-epitelizacije sprožijo številne signalne molekule, ki jih na robu rane sproščajo tako epitelne, kot tudi ne-epitelne celice (EGF, keratinocitni rastni faktor (KGF), IGF-1, živčni rastni faktor (NGF)) (52). Prekinitev kontaktne inhibicije in fizične tenzije na dezmosomih in hemidezmosomih, povzroči nastanek lipidnih mediatorjev, ter aktivacijo membranskih kinaz (npr. SRC kinaza), kar

povzročajo povečano permeabilnost membrane za ione, kot je kalcij. Vdor ionov v celico predstavlja signal za celice na obrobju rane, za reorganizacijo tonofilamentov v celici in iniciacijo migracije celic (68, 69). Migracijo keratinocitov opisuje angleška beseda »shuffling«, ki opisuje sposobnost keratinocitov, da se pod vplivom kemotakse (IL-1) pričnejo preko nastalega fibronektina premikati v smer centra rane (68). Posamezni keratinociti se premikajo preko nastalega citoskeleta s pomočjo lamelipodialnega plazenja, za katerega je značilna sinteza aktina znotraj nastajajočih izrastkov v celici in pričvrstitve na molekule zunajceličnega matriksa preko integrinov. Procesi, ki so odgovorni za spremembe v citoskeletu so medirani preko RhoGTPaz (RHO, Rac, Cdc42) (70). Stik med migrajočimi keratinociti povzroči inhibicijo GTPaze in prekinitve sinteze aktina v filopodijih, ki so nadomeščeni z intercelularnimi adhezijskimi molekulami (68).

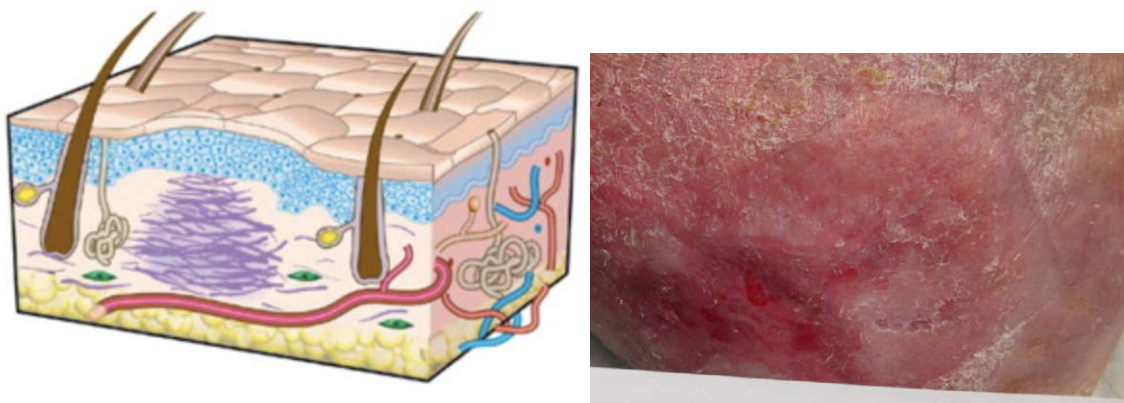
Z proliferacijo fibroblastov in migracijo keratinocitov, se poveča potreba tkiva po kisiku in nutrientih, ki jih telo zagotovi s pomočjo angiogeneze v novonastalem tkivu. Angiogeneza poteka v več stopnjah in se prične že praktično v fazi vnetja, kjer pride do povečane permeabilnosti žilne stene, ter povečane koncentracije makrofagov v rani. Začetek nastanka novega žilja omogočajo rastni faktorji (VEGF, PDGF, bFGF), ter serinska proteaza trombin (71). V prvem koraku pride do vezave teh rastnih faktorjev na endotelij obstoječega žilja, kar povzroči aktivacijo znotrajcelične aktivacijske kaskade. Posledično pride do sproščanja proteolitičnih encimov iz aktiviranih endotelialnih celic, ki razgrajujejo bazalno membrano in s tem omogočijo migracijo celic. Proces migracije in proliferacije endotelialnih celic v rani imenujemo »brstenje«. Endotelialne celice se orientirajo v smeri površinskih adhezijskih molekul, integrinov ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha5\beta1$). Metaloproteinaze, ki jih endotelialne celice sproščajo med migracijo in proliferacijo, omogočajo razgradnjo okolnega tkiva in s tem omogočajo brstenje teh celic v rano. Tako tvorjene cevke se med seboj povežejo in tvorijo kapilarno mrežo, ki se kasneje dodatno organizira v arterije in vene. Tem se poveča tudi stabilnost stene, in sicer z vključitvijo pericitov in gladkih mišičnih celic v steno novo nastale žile (57, 70).



Slika 4: Faza proliferacije. Levo: (65) in desno: Jan Stana (foto).

1.4.1.4 Remodelacija

Zadnja faza celjenja se začne približno 21 dni po nastanku rane in lahko traja do enega leta. Faza remodelacije je prikazana na **Slika 5**. Za to fazo je značilno, da pride do prekinitve tvorbe, ter začetka apoptoze granulacijskega tkiva. Za rano na koncu procesa remodelacije je značilno, da več ne vsebuje celic in žilja (61). Tako pride tudi do sprememb v ekstracelulernem matriksu s povečanjem premera kolagenskih filamentov in povečanja deleža kolagena 1 v primerjavi z kolagenom 3. Dodatno pride do degradacije hialuronske kisline in fibronektina (53). Spremembe fenotipa fibroblastov v miofibroblaste, v katerih pride do dispoziacije aktinskih filamentov omogoča kontrakcijo rane in s tem zmanjšanje površine nastajajoče brazgotine. Kasneje pride tudi do zmanjšanja pretoka krvi v rano in znižanja metabolne aktivnosti v rani, ko v končni fazi popolnoma ustavi (57)



Slika 5: Faza zorenja rane. Levo: (65) in desno: Jan Stana (foto).

1.5 Patofiziologija nastanka kronične rane

Rane imajo različno etiološko zasnovo, med katere uvrščamo periferno arterijsko okluzivno bolezen, venozno insuficienco, ter post-trombotični sindrom, sindrom diabetičnega stopala in nevropatične rane. Ne glede na etiologijo nastanka pa govorimo o kroničnih ranah šele, če v treh mesecih od nastanka rane, ne pride do vzpostavitve integritete kože (72).

1.5.1 Vpliv kisika na nastanek kronične rane

Zmanjšan parcialni tlak kisika (pO_2) v tkivu, je eden najpomembnejših vzrokov za patološki proces celjenja ran. Zmanjšan parcialni tlak kisika v tkivu opisuje pojem hipoksija, medtem ko ishemija označuje zmanjšan parcialni tlak kisika in zmanjšano koncentracijo nutrientov v tkivu. Zmerna hipoksija predstavlja signal za začetek adaptivnih procesov v celicah, ki zagotavljajo, da se tkivo prilagodi nižjemu pO_2 , medtem ko izrazita hipoksija povzroči celično smrt. V kliniki velja dejstvo, da padec parcialnega pritiska kisika v tkivu pod 30mmHg povzroči evidentno zakasnjeno celjenje. V živalskih modelih je znižanje parcialnega tlaka kisika v ušesu zajcev iz normalnega 40-45mmHg na 28-30mmHg vodilo do evidentne redukcije celjenja. Edemi, ki se pogosto pojavljajo pri starejših ljudeh, igrajo pomembno vlogo v nastanku hipoksije v tkivu. Tekočina, ki se nabira v edematoznem tkivu, povzroči, da pride do povečanja razdalje med posameznimi kapilarami in s tem do povečanja razdalje, preko katere poteka difuzija kisika (73).

V kroničnih ranah obstaja moteno ravnotežje med porabo, ter dostopnostjo kisika. Za to moteno ravnotežje so v veliki meri odgovorni 1) zmanjšana dostopnost kisika zaradi periferne okluzivne bolezni, 2) povečana poraba kisika metabolno »bolj« aktivnega tkiva v rani, ter 3) povečana sinteza ROS (reaktivne kisikove vrste) in redukcijske kisikove (redoksne) signalne poti (74).

Mitohondrijska respiracija, ki je odgovorna za 90% porabe kisika v telesu, omogoča aerobni metabolizem glukoze in sintezo adenozin trifosfata (ATP). Med procesom celjenja se močno

poveča poraba ATP, za kar je odgovorno hipermetabolno stanje celic v rani. Dodaten vir ATP predstavljajo med drugim tudi trombociti, kar vodi do povečane koncentracije zunajceličnega ATP. Zunajcelični ATP, ki se sprosti kot posledica hipoksije ali vnetja, se lahko direktno veže na purinergične receptorje, oz. se lahko po fosfohidrolitičnemu metabolizmu veže na adenozijske receptorje. Tako predstavlja ATP pomembno signalno molekulo, ki lahko modulira vnetni odgovor in ima pomemben vpliv na angiogenezo in re-epitelizacijo (75). Kisik igra pomembno vlogo pri sintezi in polimerizaciji kolagena, ki novonastalemu žilju omogoča zadostno mehanično čvrstost (76). Zorenje kolagena je odvisno od pO_2 kisika v tkivu. Hidroksilacija prolina je od kisika odvisen encimatski proces in je v veliki meri omejujoč faktor pri sintezi kolagena. Polovična maksimalna sinteza kolagena (K_m z uporabo enačbe Michaelis-Menton) je pri pO_2 20-25mmHg in V_{max} pri vrednosti 250mmHg (74).

Velik delež porabe kisika v rani je posledica aktivacije nikotinamidadenin dinukleotidfosfat (NAPDH) oksidaze v fagocitih, ter sinteze ROS v rani. Povečani koncentracija O_2^- in H_2O_2 služita zaščiti telesa pred bakterijskimi infekcijami in spodbujata fagocitozo (76). Koncentracija O_2 , ki zagotavlja polovično maksimalno ROS produkcijo (K_m) je 45-80mmHg, za doseganje maksimalne produkcije ROS je potreben $pO_2 >300$ mmHg (77). Iz tega je razvidno, da je stopnja oksigenacije tkiva pomemben napovedni dejavnik, za tveganje infekcij kirurških ran (78). Sinteza ROS pa ne igra samo pomembne vloge pri obrambi telesa, temveč predstavlja pomembno signalno pot. V tekočinah ran, ki se nahajajo v fazi celjenja se nahajajo povečane koncentracije H_2O_2 (79). V hipoksičnem tkivu, pride zaradi pomankanja O_2 do motene redoksnе signalne poti, ki ima za posledico moteno delovanje številnih rastnih faktorjev (PDGF, VEGF, KGF, IGF, TGF- β), ter vpliva na številne molekularne procese (npr. kemotaksa levkocitov, celična motiliteta, funkcija integrinov idr.) (80, 81).

1.5.2 Vpliv bakterij na potek celjenja ran

Zaradi defekta kože in podkožja, ki je značilen za kronične rane, je moten obrambni mehanizem telesa pred vdorom bakterij. V 48 urah po nastanku rane, pride do kolonizacije rane z bakterijami (73). Pomembno je razlikovanje med kolonizacijo in infekcijo ran. Kolonizacija ran z bakterijami je definirana kot prisotnost razmnožujočih se bakterij, ki ne povzročajo lokalne oz. sistemske infekcije (82). Prekomerno število bakterij na površini ran povzroča vnetje in s tem povečano produkcijo citokinov. Pogosto, ne pride do invazije bakterij v globlje ležeče tkivo, s čimer tudi ne pride do nastanka kliničnih in sistemskih znakov infekcije. Tako je lahko zakasnen potek celjenja edini znak, za prekomerni razrast bakterij v rani (83). Vpliv, ali pride do kolonizacije ali do infekcije rane, imajo številne interakcije med pacientom in bakterijami, med drugim količina bakterij na gram tkiva, virulenca in patogenost organizmov, ter imunski odgovor pacienta (82). Če ne pride do zmanjšanja števila bakterij, se lahko razvije kronično vnetje, ki je eden najpomembnejših vzrokov za nastanek kroničnih ran. Pomembnost kritične kolonizacije ran, ki jo uvrščamo med kolonizacijo in infekcijo ran, so pokazale novejšje študije iz katerih je razvidno, da je odmrtje transplantata pri presaditvi kože veliko pogostejše pri ranah, kjer število bakterij presega $100.000/\text{mm}^2$ (73).

Nasprotno pa so rane, pri katerih je bilo v okolici zmanjšano število bakterij pokazale hitrejši proces celjenja. Iz tega je razvidno, da je lahko kritična kolonizacija ran zadosten vzrok, da pride do nastanka kronične rane (73). Vrste bakterij, ki se nahajajo na površini se pogosto razlikujejo med akutnimi in kroničnimi ranami. Med tem ko se na površini akutnih ran pogosteje nahajajo Gram pozitivne bakterije, se na kroničnih ranah pogosto pojavljajo različne bakterije, med katerimi so najpogostejše *S. Aureus*, *P aeruginosa* in β -hemolizirajoči *streptokoki* (84).

Novejša spoznanja kažejo, da bakterije v kroničnih ranah ne živijo v prosti planktonski obliki, temveč se povezujejo v biofilme. Biofilmi tako predstavljajo kompleksne združke bakterij, ki so obdane z ekstracelularnim polisaharidnim matriksom. Tako organizirani biofilmi bakterijam omogočajo številne preživitvene prednosti. Ekstracelularni polisaharidni matriks lahko vodi 1)

do lokalne znižane koncentracije protimikrobnih preparatov, ter nezmožnosti doseganja terapevtskih koncentracij, 2) naturalizacijo določenih protimikrobnih učinkovin (v biofilmu se učinkovitost protimikrobne učinkovine izgubi), 3) zaščito pred dehidracijo in UV-žarčenjem. Dodatno se bakterije v biofilmih organizirajo glede na stopnjo metabolizma, tako da se znotraj posameznih kolonij bakterije nahajajo v stanju povečanega in zmanjšanega metabolizma. Bakterije, ki so metabolno neaktivne so tudi veliko manj občutljive za antibiotično terapijo. Znotraj biofilma je olajšana komunikacija med posameznimi bakterijami, pri katerih hitreje in pogosteje prihaja do razvoja rezistenc proti posameznim antibiotikom (85, 86).

V primerjavi z akutnimi kirurškimi ranami, je v eksudatu kroničnih ran veliko višja koncentracija pro-vnetnih citokinov, proteaz, ter zmanjšana koncentracija rastnih faktorjev. S tem povezana degradacija fibronektina in drugih gradnikov zunajceličnega matriksa, je ena od razlag za zakasnjeno epitelizacijo, ki jo opažamo pri kroničnih ranah (13, 87).

1.6 Venozna insuficienca

Venozna insuficienca je relativno pogosto obolenje z zelo raznoliko simptomatiko, ki sega od asimptomatičnih, ektatičnih, majhnih ven, ki pogosto predstavljajo samo estetske težave, do izrazitih histopatoloških sprememb kože in podkožja, vse do nastanka razjed (88). Glede na izraženost sprememb obstajajo različne klasifikacije bolezni, med katerimi sta najpomembnejša klasifikacija po Widmerju in CEAP klasifikacija (89).

Glede na to, da gre za bolezen z zelo raznoliko izraženostjo kliničnih sprememb, ni presenetljivo, da obstajajo številne različne teorije o etiologiji obolenja. Danes velja dejstvo, da sta za nastanek kronične venozne insuficiencie v veliki meri odgovorna venozni refluks, kot posledica okvar venoznih zaklopk (**Slika 6**) in venozna hipertenzija. Venozna hipertenzija ima za posledico reološke spremembe, ki v prvi meri vodijo do aktivacije levkocitov in do diapedeze le-teh preko stene ven, kjer pride do sproščanja encimov in remodelacije žilne stene in venoznih

zaklopk (90) (**Slika 6**). Ta teorija je podkrepljena s histopatološkimi spoznanji, ki kažejo, da pri kronični venozni insuficienci pride do izrazitega remodeliranja ekstracelularnega matriksa, z zmanjšano količino elastina in moteno diferenciacijo kolagena v steni površnih ven (91). Druga teorija, ki skuša razložiti nastanek kronične venozne insuficience temelji na prekomerni ekspresiji kislega fibroblastnega rastnega faktorja in s tem povezani mitogeni aktivaciji proteinske kinaze, ter na aktivaciji različnih encimov, ki vodijo v remodelacijo ekstracelularnega matriksa v steni varikoznih ven (92). Prekomerna ekspresija sintaze dušikovega oksida (NOS), TGF- β in CD68⁺ monocitov/makrofagov, so dodatne spremembe, ki jih pogosteje najdemo pri bolnikih z kronično venozno insuficienco (92).



Slika 6: Funkcionalna in okvarjena venozna zaklopka (93) ter primer kronične manifestacije kronične venozne insuficience brez ulkusov (vir: Google slikovne iskanje).

Ne glede na različne teorije, ki se pojavljajo v povezavi z nastankom in potekom kronične venozne insuficience, postaja vse pomembnejše preiskovanje genetskih sprememb, ki bi lahko bile odgovorne za nastanek obolenja. Markovič in sod. so z analizo celotnega človeškega genoma uspeli pokazati, da se ekspresija genov signifikantno razlikuje med ljudmi, pri katerih je diagnosticirana venozna insuficienca in ljudmi, ki nimajo venoznega refluksa. Skupina je dodatno uspela pokazati, da je pri pacientih z venozno insuficienco povečana ekspresija gena za hidroksiprostaglandin dehidrogenazo (HPGD) (90). Ta gen kodira protein iz družine alkohol

dehidrogenaznih proteinov, ki so vključeni v metabolizem prostaglandinov in imajo s tem pomemben vpliv na vnetni odgovor v telesu (93). HPGD encim pretvarja 15-hidroksilno skupino v prostaglandin v keto skupino in s tem zmanjša njihovo aktivnost. Ena od možnih razlag, zakaj pri pacientih z kronično venozno insuficienco pride do povečane ekspresije tega gena je, da telo s tem skuša ublažiti vnetni odgovor, ki je posledica motene hemodinamike (90). Pomembna je tudi ekspresija gena kolagena 13 α 1 in kolagena 27 α 1, ki je znižana pri pacientih z kronično venozno insuficienco (90). Pacientih s kronično venozno insuficienco, ki razvijejo kronične rane, imajo pogosteje polimorfizme v genih, ki kodirajo proteine vključene v metabolizem železa (npr. FPN 1, HFE), vnetni odgovor in apoptozo. Pomembno vlogo genetskih sprememb potrjuje tudi delo Gematija in sod., ki so pokazali, da so pri težkih oblikah venozne insuficience pogostejši polimorfizmi HFE, FPN 1, MMP 12 in FXIII genov. Avtorji te študije so pokazali, da imajo polimorfizmi v genu FXIII vpliv na čas celjenja, FXIII in MMP12 na velikost rane (94). Pri pacientih, ki kronične rane razvijejo že pri nižji starosti, so prisotne mutacije v genu HFE. Te mutacije so odgovorne za modificirano stabilnost depozitov feritina, ter efcienco hepcidinskega regulatornega sistema, kar vodi do povečanega efluksa železa (95). Gen FPN1 kodira številne transmembranske proteine, ki so v veliki meri odgovorni za transport železa iz celic. Polimorfizmi v tem genu lahko vodijo do prekomernega transporta železa iz celic, kar lahko vodi do povečanega oksidativnega stresa in destrukcije tkiva (94).

1.7 Kronične venozna rane

Kronične venozne rane nastanejo kot posledica venozne insuficience in se nahajajo med gležnjem in kolenom. Kronične venozne razjede predstavljajo 60-80% vseh kroničnih ran (96). Prevalenca kroničnih venoznih razjed znaša med 0,18 in 1%, pri populaciji nad 65 letom starosti je prevalenca 4% (97, 98). Še vedno ni raziskano, zakaj se pri nekaterih pacientih kronična venozna insuficienca v zadnjem stadiju manifestira z destrukcijo tkiva, medtem ko se pri drugih

pacientih kaže samo kot estetično moteča dilatacija površinskega venoznega sistema (**Slika 6**). Eden prvih, ki je povezal kronično venozno stazo z nastankom razjed na spodnjih okončinah je bil John Homas. Njegova razlaga etiologije je temeljila na premisi, da moten odtok krvi preko površinskega venoznega sistema povzroči moten dotok krvi v kapilare, kar vodi do hipoksije v koži in podkožju (87). To hipotezo bi naj dodatno podkrepilo spoznanje, da v koži pacientov z kronično venozno insuficienco pride do nastanka arterio-venoznih povezav, ki bi naj dodatno povečale hipoksijo v tkivu. Novejše študije po pokazale, da v tkivu ne pride do hipoksije in do nekroze, temveč v veliki meri do apoptoze, ki je odgovorna za destrukcijo tkiva (87).

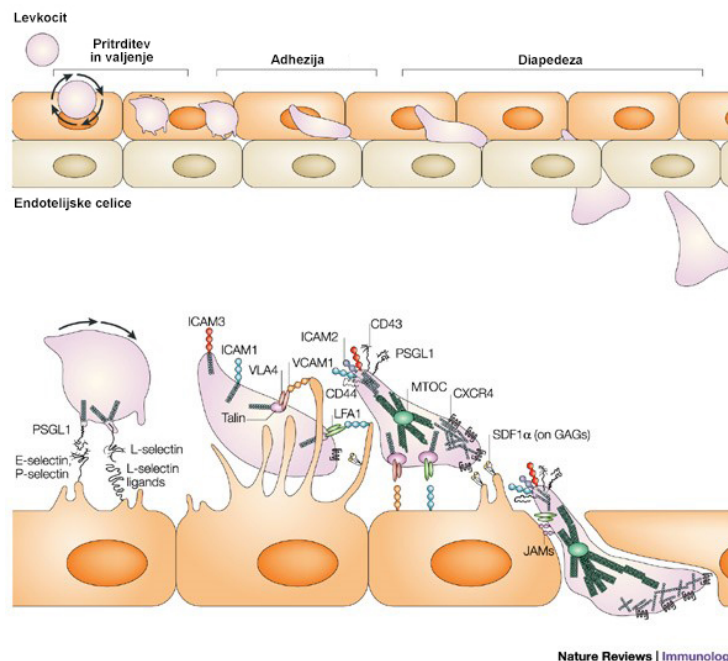
1.7.1 Patofiziologija nastanka kronične venozne rane

Nova histopatološka in imunološka spoznanja so pokazala, da so za različne stopnje kronične venozne insuficience značilne spremembe v tkivu, ki kažejo na kronični vnetni proces. Kronično vnetje, ki izhaja iz površinskega žilja kože, vodi fibrosklerotičnega preoblikovanja kože in podkožja, kar je predstopnja nastanka razjed (99). Pri pacientih, ki so v preteklosti zboleli za kronično venozno razjedo, so histopatološke preiskave kože in podkožja pokazale visoko koncentracijo levkocitov v dermisu, medtem ko so pri pacientih z lipofasciosklerozo koncentracije levkocitov nižje (100). Nadaljnje histopatološke analize so pokazale, da so celice, ki so v veliki meri odgovorne za lipofasciosklerotične spremembe in nastanek razjed, T-limfociti in makrofagi (101).

Čeprav trenutno ne poznamo natančnega patofiziološkega mehanizma, ki stoji za nastankom kroničnih venoznih razjed, obstajajo številne teorije, ki pripisujejo pomembno vlogo kroničnemu vnetju. Različne skupine opisujejo povečano kopičenje levkocitov pri pacientih z kronično venozno insuficienco (46, 47). Venozna hipertenzija vpliva na aktivacijo nevtrofilcev, ter povišano koncentracijo L-selektina, (101). Coleridge Smith in sod. so preučevali stopnjo aktivacije nevtrofilcev v povezavi z kronično venozno insuficienco. Njegova skupina je

pokazala, da pride pri pacientih z kronično razjedo do povečane ekspresije nevtrofilne elastaze, ki je pomemben marker aktivacije nevtrofilcev (102).

Spremembe v strižnih silah, ki nastanejo kot posledica spremembe reologije v površinskem venoznem sistemu, igrajo pomembno vlogo pri nastanku in vzdrževanju kroničnega vnetnega procesa. Pod pojmom strižnih sil razumemo tangencialno silo s katero kri deluje na površino endotelija. Zmanjšana hitrost pretoka krvi v venoznem sistemu vodi do zmanjšanja strižnih sil in s tem do aktivacije levkocitov, kar se kaže v tvorbi pseudopodijev na površini levkocitov (87). Na površini endotelialnih celic pride do ekspresije ICAM-1 (intracelularna adhezijska molekula- 1), VECAM-1 (vaskularna adhezijska molekula – 1), E-selektin, I-selektini služijo kot adhezijske molekule na katere se vežejo specifični membranski receptorji na površini levkocitov, kot so VLA-4 (zelo pozni aktivirajoči antigen 4) in LFA-1 (levkocitni funkcijski antigen-1) (87) (Slika 7).



Slika 7: Ekstravazacija levkocitov v tkivo (103).

Tako v eksudatu, kot tudi v tkivu kroničnih venoznih ran, je povišana koncentracija številnih vnetnih citokinov, med katerimi so najpomembnejši IL-1, IL-6, TNF- α (13, 104). Pomembno spoznanje, ki govori v prid lokalnemu vnetnemu procesu, je dejstvo, da nasprotno kot v

eksudatu ran, v plazmi pacientov ni moč določiti povišanih koncentracij vnetnih citokinov (104). Kot odgovor telesa na kronično vnetje se v tekočini ran poveča ekspresija metaloproteinaznega inhibitorja 1 (TIMP-1) in TIMP-2, ki skušata zmanjšati aktivnost metaloproteinaze 2 (MMP-2) in metaloproteinaza 9 (MMP-9) (105). Nasprotno, pa je pri pacientih, kjer je pod vplivom kompresijske terapije prišlo do znižanja vnetnih citokinov v eksudatu ran, prišlo do izboljšanja celjenja (13, 106, 107).

Kronično vnetje vodi tudi do povečane ekspresije proteolitičnih encimov. MMP so skupina encimov, ki jih uvrščamo med eksopeptidaze in so v telesu zadolžene za številne različne naloge. Med drugim so MMP vključene v morfogenezno in metabolizem biološko aktivnih peptidov in hormonov, regulacijo celičnega cikla, proliferacijo, migracijo in adhezijo različnih celic, ter metabolizem antibiotikov (108). MMP-2 in MMP-9, ki jih v veliki meri povezujemo z razgradnjo tkiva, sta encima, ki sta najpogosteje povišana v ranah, ki stagnirajo v celjenju (109, 110), kar dodatno potrjuje tezo, da sta kronično vnetje in povečana proteolitična aktivnost v venoznih ranah poglavitna problema, ki onemogočata celjenje. Metaloproteinaza 1 (MMP-1) in metaloproteinaza 13 (MMP-13) sta metaloproteinazi, ki sta povezani z nastankom granulacijskega tkiva in s celjenjem rane. Metaloproteinaze so nujne za fiziološki proces celjenja, saj omogočajo migracijo fibroblastov, kot tudi keratinocitov, ter so izrednega pomena v procesu angiogeneze. Moteno razmerje med metaloproteinazami in njihovimi inhibitorji, ki so posledica dolgotrajnega (kroničnega) vnetja, vodi do motenj v normalnem fiziološkem procesu celjenja ran (104, 105, 110).

1.7.2 Vloga TNF- α v kroničnem vnetju

TNF- α je celična signalna molekula (citokin), ki igra poglavitno vlogo v sistemske vnetnem odgovoru. Producirajo ga različne celice, med drugim, makrofagi, nevtrofilci, mastociti, eozinofilci, CD4⁺ limfociti in keratinociti. Primarna vloga TNF- α v telesu je njegovo endogeno

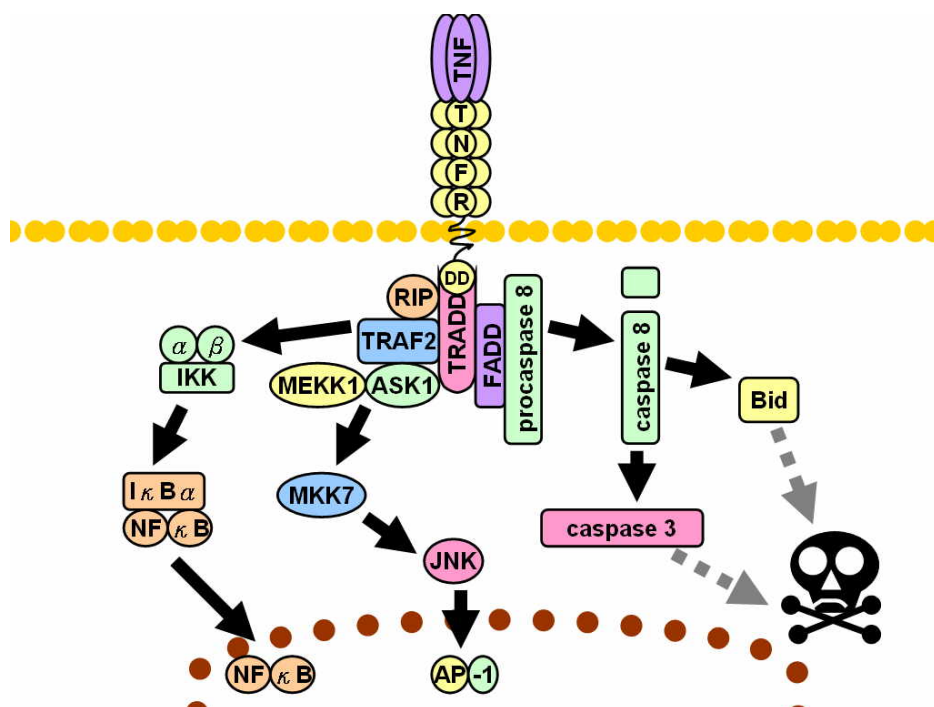
piogeno delovanje, sprožitev apoptoze, kaheksije, ter stimulacija vnetja, inhibicija tumorske geneze in virusne replikacije (111).

Celice tvorijo TNF kot 233 aminokislin dolg tip II transmembranski protein, ki je organiziran v stabilne homotrimere (112). Pod vplivom proteolitičnega delovanja metaloproteinaze TNF- α konvertirajoči enicim (TACE) pride do nastanka topnega TNF- α , ki več ni vezan na celično membrano (113). Med drugim se TNF- α veže na dva različna tipa receptorjev, TNF-Rp55 (TNFR1) in TNF-Rp 75 (TNFR2). Ekspresija TNFR1 je prisotna v večini tkiv v telesu, medtem kot ja je TNFR2 receptor prisoten praktično samo na imunskih celicah. TNFR1 stimulirajo tako netopni homotrimeri na celični površini, kot tudi topna oblika TNF- α (113). Vezava liganda na receptor povzroči konformacijske spremembe v receptorju, ki vodijo do disociacije inhibitornega proteina SODD iz intracelularne domene. Ta disociacija omogoči vezavo s TRADD (z receptorjem tipa 1 za tumor nekrotizirajoči faktor povezana smrtna domena), pri katerem gre za adaptacijski protein, ki je eden ključnih proteinov v procesu apoptoze. Ta se veže na prosto domeno, ki služi kot platforma za nadaljnje vezave proteinov. V naslednjem koraku lahko pride do treh različnih poti (111, 114) (**Slika 8**):

- **Aktivacija (NF)- κ B:** nadaljnja vezava TRAF2, ter proteinske kinaze I κ B IKK, vodi do aktivacije z receptorjem interaktivno serin/treonin kinazo RIP kinaze. Tako pride do fosforilacije inhibitornega proteina I κ B α , ki je normalno vezan na (NF)- κ B in onemogoča njegovo translokacijo. Po fosforilaciji inhibitornega faktorja, pride do translokacije, kjer pride do transkripcije različnih proteinov (ciklooksigenaza-2, IL-6), ki so odgovorni za preživetje in proliferacijo celic, vnetni odgovor in anti-apoptotične faktorje.
- **Aktivacija mitogen aktivacijske protein-kinazne poti (MAPK):** Vezava TNF- α povzroči aktivacijo treh pomembnih MAPK poti: 1) močno aktivacijo c-Jun N-terminalne kinazne (JNK) skupine, 2) zmeren odgovor p38-MAPK, ter 3) šibko

aktivacijo ekstracelularne signal-regulirajoče kinaze (ERK). Aktivacija TRAF 2/Rac povzroči aktivacijo MLK2/MLK3 kinaze, ki fosforilira MKK7, ter tako vodi do aktivacije JNK. Aktiviran JNK translocira v celično jedro in povzroči transkripcijo različnih proteinov, ki so povezani z diferenciacijo, proliferacijo in apoptozo (115).

- **Indukcija celične smrti:** Pomembnost te signalne poti, je v primerjavi z ostalimi signalnimi potmi, ki povzročajo celično smrt (Fas), manj pomembna. Ob aktivaciji TNFR1 lahko pride do vezave FADD na TRADD, kar vodi do povišanja koncentracije cisteinske proteaze kaspaze-8. Visoke intracelularne koncentracije kaspaze-8 imajo avtoproteolitični delovanje in vodijo do programirane celične smrti.



Slika 8: Shematski prikaz intracelularne signalne poti TNF- α (116).

In vitro študije so pokazale, da vezava TNF- α na receptor Rp-55 povzroči aktivacijo superoksidne dismutaze (SOD) ter citotoksičnost, medtem ko vezava na Rp-75 povzroča proliferacijo timocitov in citotoksičnih T celic (117). V nižjih koncentracija TNF- α stimulira celjenje, saj stimulira vnetje in produkcijo rastnih faktorjev, ki jih producirajo makrofagi. V tkivu, ki je dalj časa izpostavljeno visokim koncentracijam TNF- α , pride do upočasnitve

celjenja, saj pride do supresije sinteze ekstracelularnega matriksa, TIMP in do povečane sinteze MMP-2 in MMP-9 (114).

Dodatna spoznanja o vlogi TNF- α na proces celjenja, nam nudijo živalske študije. »angl. Knock-out« miši kažejo hitrejše celjenje in re-epitelizacijo v primerjavi z »angl. wild-type« mišmi. Histološke analize tkiva, so pri knock-out miših pokazale zmanjšano infiltracijo tkiva z nevtrofilci in makrofagi, zmanjšano ekspresijo ICAM-1, VCAM-1, E-selektinov, ter povečano sintezo kolagena (117). Podoben trend je moč opaziti tudi pri ljudeh, pri katerih obstaja polimorfizem za alel TNFA-308A, ki je povezan z povišano produkcijo TNF- α . Pri teh ljudeh pride do dvakrat pogostejše tvorbe kronične venozne razjede, kot pri ljudeh, ki nimajo tega polimorfizma (118).

1.8 Polisaharidi uporabni v sodobnih konceptih zdravljenja kroničnih ran

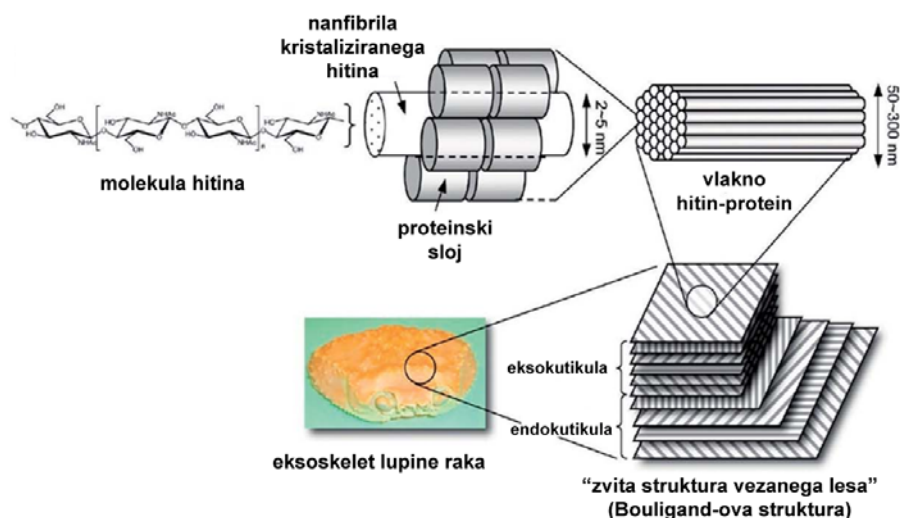
Polisaharidi so polimerne strukture ogljikovih hidratov. Med polisaharide štejemo tako sladkorje, ki so med sabo povezani z glikozidno vezjo, kot tudi, molekule, ki vsebujejo polimerne saharidne strukture, ki so med seboj povezane z kovalentno vezjo z aminokislinami, peptidi, proteini, lipidi, ter drugimi molekulami (119).

V naravi nastopajo polisaharidi kot strukturne molekule ali pa kot molekule za shranjevanje energije. Celuloza je najpogostejši polisaharid najden v naravi in se nahaja v stenah rastlin, najdemo pa jo tudi v morskih algah. (119), v katerih sta tudi **alginat**, agar in karagen. Celulozo sestavljajo glukozne enote, ki so med seboj povezane z β -1,4-glikozidnimi vezmi, zato so molekule celuloze linearne. Agar je nerazvejan polisaharid, ki ga najdemo predvsem v stenah alg *Gelidium spp* in *Gracilaria spp*. Agar se uporablja v prehrabni industriji, ter za pripravo gelov za različne analizne metode kot je elektroforeza.

Zaradi njihovih edinstvenih lastnosti je moč različne polisaharide uspešno implementirati za izdelavo polimernih materialov za oskrbo kroničnih ran (33, 38). Lastnosti posameznih

polimerov - polisaharidov (veliko razmerje med površino in volumnom, edinstvene fizikalno-kemijske in biološke lastnosti, vključno z biokativnostjo), ter edinstvene funkcionalnosti posameznih nano-struktur, uvršča te polisaharide tudi med idealne kandidate za pripravo polimernih nosilcev zdravil (120-122).

Zaradi odličnih kemičnih lastnosti, velike biokompatibilnosti in relativno dobre dostopnosti (npr. pridobivanje iz oklepa raka kot kaže **Slika 9**), se **hitin** in njegovi derivati uspešno uporabljajo za pripravo različnih nanomaterialov za biosenzorje (123, 124), materiale uporabne v tkivnem inženirstvu (125, 126), ter tudi kot nosilce zdravil (127, 128). Sestavljen je iz enot N-acetil-D-glukoza-2-amina, ki so med seboj povezane z β -1,4 glikozidnimi vezmi. Po zgradbi je zelo podoben celulozi, le da ima na C2 atomu namesto hidroksilne skupine(-OH) vezano N-etanoilamino skupino (-NHCOCH₃). Glikozidno vez v hitinu lahko cepimo z kislom hidrolizo, poleg tega pa se odcepi še vez med dušikom (N) in ogljikom (C), tako da nastaneta dva produkta: 2-D-glukozamin in očetna kislina. Med verigami hitina prihaja to tvorbe velikega števila vodikovih vezi, ki dajejo hitinski strukturi veliko trdnost. Zaradi opisanih dobrih fizikalnih lastnosti se hitin in njegovi derivati uporabljajo tudi za izdelavo nove generacije nosilnih materialov za dostavo antibiotikov (129, 130), protiglivičnih zdravil (131), protivnetnih zdravil (132), ter protitumorskih zdravil (128, 133).



Slika 9: Shematski prikaz strukture oklepa raka v kateri se nahaja (134).

Alginat je zaradi svojih kemijskih lastnosti in bio-kompatibilnosti uporaben v oskrbi kroničnih ran, saj zmanjšuje bakterijsko kontaminacijo na površini ran (preko spremembe pH in vezavo bakterij, s čemer se odstranijo iz rane), vzdržuje fiziološko vlažno okolje v rani in omogoča absorpcijo prekomernega eksudata v rani (135, 136). Je linearen polimer, sestavljen iz homogenih odsekov (1-4)- β -D- manuronske kisline in L-guluronske kisline in odsekov, kjer se kislini izmenjujeta. Biokompatibilnost, netoksičnost, biorazgradljivost in nizka cena so lastnosti, zaradi katerih je alginat zelo uporaben material za pripravo dostavnih sistemov za nadzorovano sproščanje zdravil (119).

Pregled pomembnih polisaharidov je predstavljen na **Slika 10**.

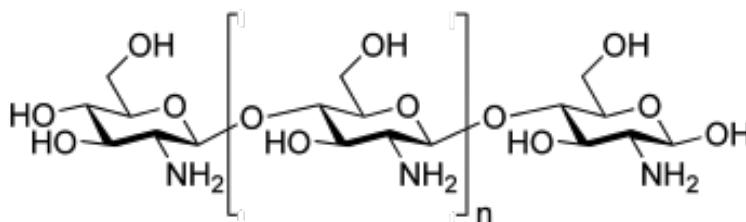
POLYSACCHARIDES			
Shramba energije	Strukturni	Kisli	Bakterijski
Škrob Glikogen	Celuloza Hemiceluloza Lignin Pektin Hitin	Hondroitin sulfat Dermatan sulfat Hialuronska kislina Heparin Heparan sulfat Keratan sulfat Alginska kislina	G+ Dekstran Kefiran <i>Alphaproteobacteria</i> Gelan, G- Bakterijska celuloza <i>Betaproteobacteria</i> Kurdlan, Velan <i>Gammaproteobacteria</i> N-acetilheparozan, Bakterijski alginat, Ksantan

Slika 10: Pomembni polisaharidi /Knjiga T. Maver in sod.; Springer Briefs, in press/.

1.8.1 Hitozan

Hitin, celuloza in škrob predstavljajo tri, v naravi najbolj razširjene polimerne ogljikove hidrate (polisaharide). Hitin predstavlja eno najpomembnejših strukturnih molekul eksoskeleta rakov, školjk, ter gob in plesni. **Hitozan** se pridobiva iz hitina s pomočjo N-acetilacije z alkalnimi spojinami (137) (**Slika 11**). Tako hitin, kot tudi hitozan sta biokompatibilna, biološko razgradljiva in ne-toksična (40). Makromolekule hitozana so sestavljene iz glukozaminskih in N-acetilglukozaminskih enot, ki so med seboj povezane z 1-4 glukozidnimi vezmi. Pri pH, ki je nižji od pKa vrednosti aaminskih skupin v hitozanu, se le-te protonirajo in hitozan postane

topen v vodi. Obratno, se pri pH, ki je višji od pKa, aminske skupine deprotonirajo in hitozan postane netopen v vodi.

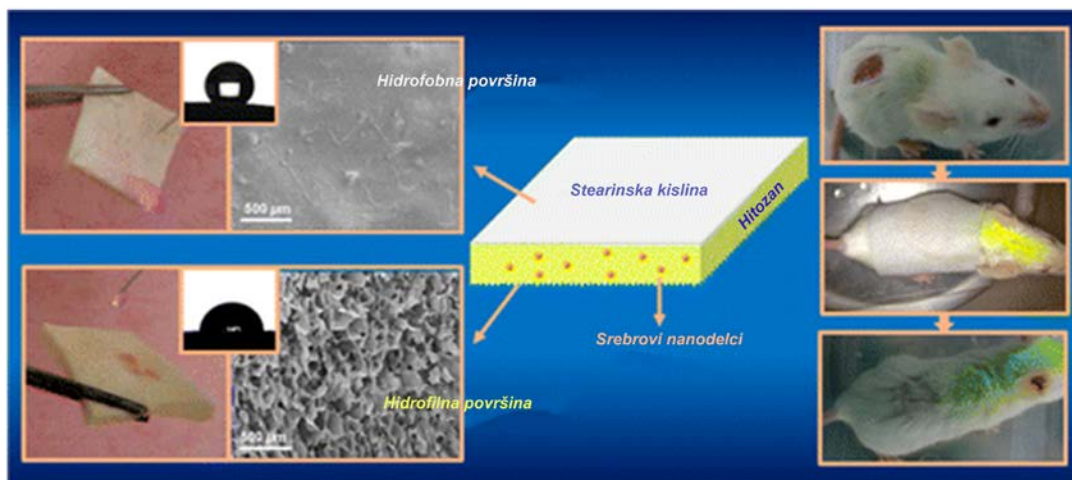


Slika 11: Hitozan (vir: Wikipedia).

Vpliv hitozana in njegovih derivatov na celjenje kroničnih ran je bil raziskan v številnih različnih študijah. Wiegand in sod. so primerjali vpliv različnih molekulskih mas hitozana s konstantno stopnjo deacetilizacije. Rezultati te študije so pokazali, da ima hitozan z višjo molekulsko maso negativni vpliv na proliferacijo in preživetje celic *in vitro* (138). Drugače velja za stopnjo deacetilizacije hitozana. Hitozan z višjo stopnjo deacetilizacije (89%) bolje vpliva na proliferacijo fibroblastov v primerjavi z hitozanom z nižjo stopnjo deacetilizacije (139). Pomembna lastnost materialov, ki se uporabljajo v oskrbi kroničnih ran je njihova protimikrobna aktivnost (140). Za protimikrobne lastnosti hitozana je pomembna interakcija med pozitivno nabito aminsko funkcionalno skupino, ki se nahaja v hitozanu in negativno nabito celično steno bakterij, kar povzroči povečano permeabilnost celične stene in s tem moteno homeostazo bakterij (141, 142). Protikrobno delovanje hitozana je bolj izraženo pri delovanju proti Gram pozitivnim bakterijam (143).

Vpliv hitozana na celjenje akutnih ran je bil raziskan na številnih različnih živalskih modelih. V začetnih fazah celjenja ran, ki so bile zdravljene s hitozanom, je prišlo do povečanega števila vnetnih celic (144, 145), kasneje pa tudi do izboljšane tvorbe granulacijskega tkiva in hitrejšega celjenja ran (146). Tudi na živalskih modelih je bil potrjena zveza med molekulsko maso in stopnjo deacetilizacije in njun pomemben vpliv na potek celjenja ran. Najvišja stopnja re-epitelizacije je bila, nasprotno kot v *in-vitro* študijah, dosežena pri hitozanu z visoko molekulsko maso in visoko stopnjo deacetilizacije (147). Burkatovskaya in sod. so primerjali

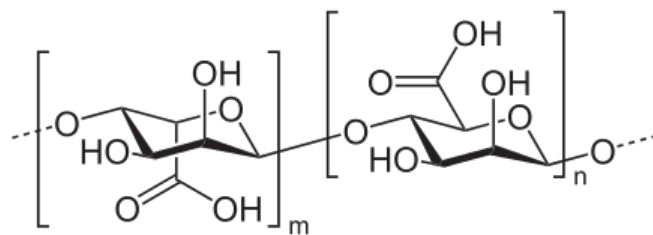
protimikrobno delovanje HemCom™, ki je sestavljen iz hitozan acetata, z alginatom in srebrovim sulfatnim azidom. Akutne rane laboratorijskih miši so bile kontaminirane s *P. aeruginosa* in *P. mirabilis*. Preživetje miši, ki so bile zdravljene z hitozan acetatom so imele 100% preživetje, v primerjavi z drugima skupinama, kjer je bilo preživetje med 25-100% (148). Klinične študije, v katerih so spremljali vpliv hitozana na celjenje ran so pokazale pozitiven učinek hitozana na potek celjenja. Donorska mesta za transplantacijo kože, ki so bila obravnavana z N-karboksibutil hitozanom so pokazala boljšo organizacijo ekstracelularnega matriksa, povečano revaskularizacijo in zmanjšano število vnetnih celic v primerjavi s kontrolno skupino (149, 150). Primer uporabe nanodelcev iz hitozana je prikazan na **Slika 12**.



Slika 12: Primer priprave hitozanskih oblog s vključenimi Ag nano delci.

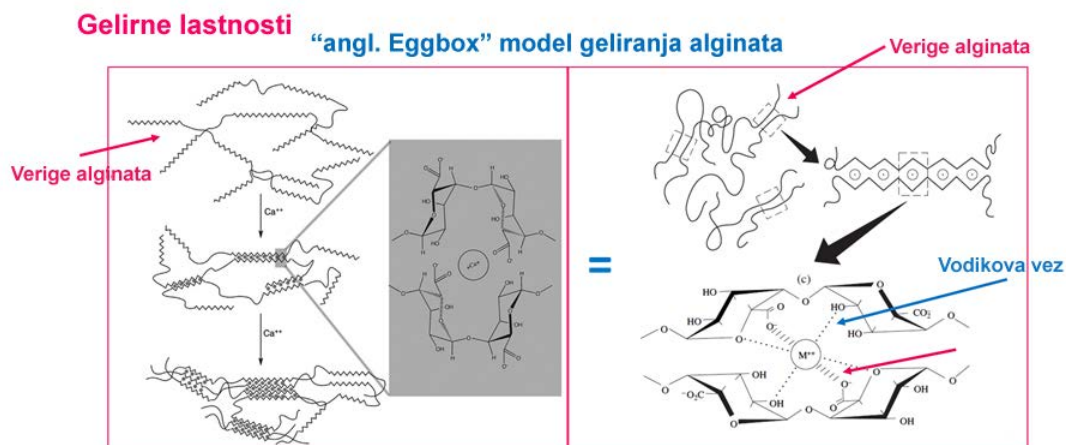
1.8.2 Alginat

Alginat je linearen, nerazvejan polisaharid, sestavljen iz monomernih enot β -D-manuronske (M) in α -L-guluronske (G) kisline, povezanih z 1,4 glikozidno vezjo (**Slika 13**). V naravi se nahaja v celični steni rjavih alg. Alginat je leta 1883 odkril Edward Stenford, komercialna proizvodnja alginata se je pričela leta 1927. Današnja svetovna letna proizvodnja znaša približno 50000 ton. 30% letne proizvodnje alginata se uporabi v prehrabni industriji, medtem ko se ostali del alginata uporablja predvsem v farmacevtskih in dentalnih aplikacijah, ter na področju priprave funkcionalnih materialov za oskrbo ran (151).



Slika 13: Alginat (vir: Wikipedia).

Alginat kaže veliko sposobnost tvorjenja gelov pri nizkem pH-ju s pomočjo vodikovih vezi, ter s pomočjo interakcije med alginatom in dvovalentnimi (Ca, Sr in Ba) ali trivalentnimi ioni (Fe (III) in Al), ki povzročijo zamreženje med posameznimi stranskimi verigami (**Slika 14**). Do ionske izmenjave prihaja predvsem med α -L-guluronsko kislino in okolico. Tako prihaja v alginatih, z višjo vsebnostjo α -L-guluronske do izrazitejšega zamreženja in posledično do tvorbe viskozne gela (152, 153). Dodatno vlogo na kvaliteto nastalega gela imajo še viskoznost tekočine v okolici, molekulska masa alginata, ionska moč ter pH vrednost okolja (154).



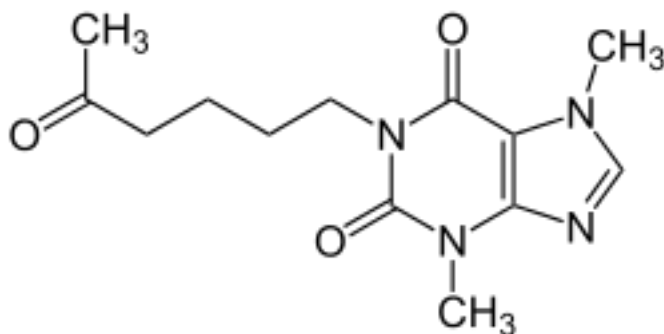
Slika 14: Shematski prikaz tvorjenja alginatnih gelov (151).

Alginatni viskozni geli na rani med drugim spodbujajo avtolitično čiščenje rane in zmanjšujejo nivo bakterijske kontaminacije. Alginatne obloge v rani s pomočjo ionske izmenjave povzročijo zvišanje nivoja kalcija, kar deluje hemostatsko (136). Dodatni pozitiven učinek povišane koncentracije Ca^+ je stimulacija rasti fibroblastov v rani (155).

Tako kot hitozan se tudi alginat uspešno uporablja za dostavne sisteme zdravil. Konkretnije, ti dostavni sistemi omogočajo zakasnjeno sproščanje zdravilnih učinkovin. Tako je alginat pogosta pomožna snov v tabletah (156), mikrokapsulah (157, 158), implantatih (159), ter sistemih za topikalno dostavo zdravil (160).

1.9 Pentoksifilin (PTX)

PTX (**Slika 15**) je derivat metilksantina in spada v skupino neselektivnih inhibitorjev fosfodiesteraze. Zaradi izboljšanja reoloških lastnosti krvi, se je v preteklih desetletjih uporabljal predvsem v terapiji *Caludicatio intermitans*, pri cerebrovaskularnih obolenjih, ter v terapiji kroničnih venoznih razjed (161). PTX je zelo dobro vodotopen, pri čemer njegova topnost znaša pri 37°C znaša 191mg/ml. Do zmanjšanja viskoznosti krvi in plazme pride v veliki meri zaradi zmanjšanja koncentracije fibrinogena v plazmi, povečanja fleksibilnosti eritrocitov in zmanjšanja agregacije trombocitov ter eritrocitov (162, 163). Dodatna učinka zmanjšanja aktivacije nevtrofilcev ter izboljšanje fleksibilnosti eritrocitov, vodita do izboljšane mikrocirkulacije, predvsem v področjih, ki se nahajajo distalno hemodinamsko relevantnih, makroangiopatičnih sprememb (164). Kot neselektivni inhibitor fosfodiesteraze, ima PTX tudi protivnetni in antioksidativni učinek. Za njegov antioksidativni učinek je v prvi vrsti odgovorna inhibicija nevtrofilcev, ki v aktiviranem stanju producirajo superoksidge preko NADPH oksidaze (165). Znižanjem plazemske koncentracije TNF- α , IL-6 in IL-1 ima dodaten protivnetni učinek (166) (167, 168).



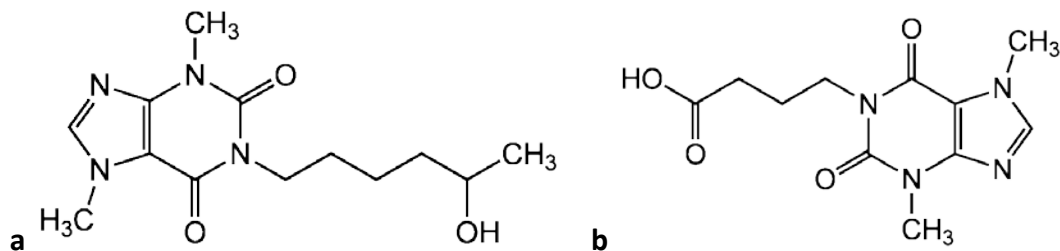
Slika 15: Pentoksifilin (vir: Wikipedia).

1.9.1 Farmakodinamika in farmakokinetika PTX

PTX je dobro topna v vodi in se po *per os* aplikaciji v terapevtskih dozah zelo dobro absorbira iz črevesja (95%). Iz literature je razvidno, da je varna dnevna doza PTX 2000 mg (169).

Pri višjih koncentracijah PTX pride do saturacije absorpcije preko črevesa, zaradi česar tudi ne pride do dodatnega porasta plazemske koncentracije (170). Po absorpciji iz gastrointestinalnega trakta pride do obsežnega metabolizma prve stopnje, kar zmanjša bio-dostopnost na 20% (171).

PTX se v človeškem telesu metabolizira v vsaj 7 ne-konjugiranih metabolitov. Glavne metabolite lahko razdelimo v hidroksi metabolite, 3,7-dimetil-1-(5'hidroksiheksil)ksantin (M1) oz. lizofilin, in dva metabolita karboksilne kisline, 3,7-dimetil-1-(4-karboksibutil)ksantin (M4) in 3,7,-dimetil-1(3-karboskipropil)ksantin (M5) (169). Najvišje plazemske koncentracije po oralni aplikaciji dosemeta metabolita M1 in M5 (172) (**Slika 16**). Zaradi svojega protivnetnega delovanja, je M1 v fokusu številnih študij. Pri pacientih, ki se zdravijo z visokimi koncentracijami IL-2, lahko sočasna aplikacija M1 privede do zmanjšanja neželenih učinkov (173). Novejše klinične raziskave so pokazale, da ima terapija z M1 pozitivne učinke pri terapiji akutnih poškodb pljuč in zmanjša nastanek akutnega respiratornega distresnega sindroma (170). Prav tako ima M1 pozitiven učinek na potek nekaterih avtoimunih obolenj, med drugim na diabetes melitus tip 1 (174). Medtem, ko se PTX v jetrih metabolizira v vse ostale metabolite, pa pride pod vplivom karbonilne reduktaze v eritrocitih do redukcije PTX v lizofilin (172).



Slika 16: Glavna metabolita PTX: a) lizofilin (M1) in b). 3,7,-dimetil-1(3-karboskipropil)ksantin (M5).

1.9.2 Protivnetno delovanje pentoksifilina

PTX modulira kaskado vnetja s inhibicijo več različnih citokinov na nivoju transkripcije v celičnem jedru (175). PTX zavira nastanek TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 in IL-10 (176). Kot nespecifični inhibitor znotrajcelične fosfodiesteraze, zavira metabolizem cikličnega adenozinmonofosfata (cAMP) v celicah in s tem zvišuje koncentracijo le tega (169, 175, 177). Povišan nivo znotraj celičnega cAMP je v veliki meri odgovoren za protivnetno delovanje PTX; povišan intracelularni cAMP namreč znižuje aktivacijo fagocitov, produkcijo superoksidnih anionov, ter sproščanje lizosomskih encimov iz polimorfonukleranih celicah (169). Ne glede na omenjen mehanizem delovanja pa je potrebno dodati, da inhibicija cAMP fosfodiesteraze ni v celoti odgovorna za številna kompleksna delovanja PTX v telesu. Zanimiva je primerjava delovanja PTX z teofilinom (oba sta ksantinska derivata), saj obe substanci v enaki meri inhibirata delovanje fosfodiesteraza, pa vendarle je inhibicija metabolizma polimorfonukleranih celic izrazitejša pri aplikaciji PTX (169). Ena izmed možnih razlag je, da PTX inducira nastanek prostaciklinov, kar dodatno zvišuje nivo intracelularnega cAMP (169, 178). Inhibicija delovanja naravnih celic ubijalk (NK-celic) je povezana s vplivom PTX na povečano sintezo prostaglandina E₂ (PGE₂) (179). Dodaten mehanizem, s katerim PTX znižuje koncentracijo TNF- α , je preko stimulacije tvorbe TGF β (169). Stopnja inhibicije TNF- α je odvisna od koncentracije PTX (180). V *in vitro* lipo-polisaharidnem modelu PTX znižuje nivo jedrnega faktorja (NF)- κ B, ki je potreben za sintezo proimflamatornih faktorjev (177). Histološke analize tkiva miši po izpostavitvi PTX so pokazale, da ta signifikantno znižuje

število makrofagov v tkivu. Povišana koncentracija makrofagov v daljšem časovnem obdobju povzroči povečano razgradnjo ekstracelularnega matriksa, kar dodatno prispeva k vzdrževanju kroničnega vnetja (181).

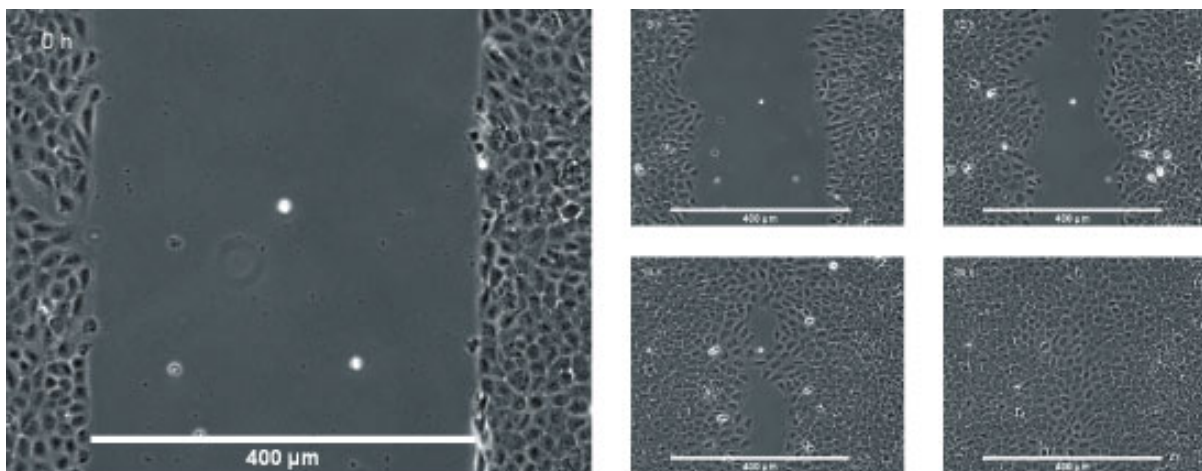
1.10 Celični modeli in testi

Trenutno ne obstaja nobena dvojno slepa randomizirana klinična študija, s katero bi bil dokazan pozitiven učinek, ki ga imajo različne medicinske obloge v terapiji kroničnih ran. V predkliničnem testiranju različnih oblog za oskrbo kroničnih ran, so v prvi meri testirani fizikalni parametri kot so sposobnost absorpcije tekočine, sposobnost prepustnosti vlage/zraka, vodotestnost, viskoznost, sposobnost hidracije in podobno. Za oceno uspešnosti posamezne obloge v kliniki pa obstaja občutno manj dobro merljivih parametrov. Med pogosto uporabljene parametre tako uvrščamo meritve površine rane, ter spremembe velikosti rane v časovni enoti, čas, ki je potreben, da se rana zaceli, zmanjšanje površine, bakterije na površini rane, ter splošno izboljšanje življenjske kvalitete bolnika. Prav ti parametri so velikokrat, in to predvsem zaradi svoje slabe definiranosti, ter številnih različnih pristranskosti, velika ovira številnim kliničnim študijam (182). Celični modeli predstavljajo alternativo tako živalskim modelom, kot tudi kliničnim študijam in omogočajo hitrejše testiranje različnih materialov pod nadzorovanimi pogoji. Trenutno obstaja več celičnih modelov, ki omogočajo spremljanje migracije celic (183). Ti bodo na kratko predstavljeni v sledečih poglavjih.

1.10.1 Scratch assay

Najpreprostejši med njimi je »scratch assay«, ki omogoča spremljanje hitrosti migracije monoslojne populacije celic (**Slika 17**). Ključna pomanjkljivost samega testa je očitna že iz same definicije, saj je brez dodatnih nadgradenj tehnike težko ločiti med migracijo in proliferacijo celic oz. določiti njun prispevek. Ta metoda sicer temelji na spoznanju, da ob

nastanku nove vrzeli na monosloju celic, celice, ki se nahajajo na robu vrzeli pričnejo z migracijo proti vrzeli, dokler ne pride do vzpostavitve integritete mono-sloja. Prednost te metode predstavlja predvsem preprost način in nizki stroški izvedbe (184). V prid tej metodi govori tudi, da v določeni meri posnema migracijo celic, ki se dogaja v telesu po poškodbi. Ob poškodbi žilnega endotela v telesu pričnejo celice na robu poškodbe z migracijo, dokler ne pride do vzpostavitve integritete endotela (185). S pomočjo mikroskopije, lahko dodatno opazujemo vpliv medcelične komunikacije na migracijo (184). To metodo je tudi moč kombinirati z gensko transfekcijo in s tem opazovati vpliv eksogenov na migracijo posameznih celic (186). Ne glede na enostavno izvedbo pa obstajajo določene pomanjkljivosti. Tako ni možno simulirati kemotaksije, saj ne moremo vzpostaviti gradienta med posameznimi signalnimi molekulami. Prav kemotaksija pa ima pri celjenju ran pomembno vlogo.



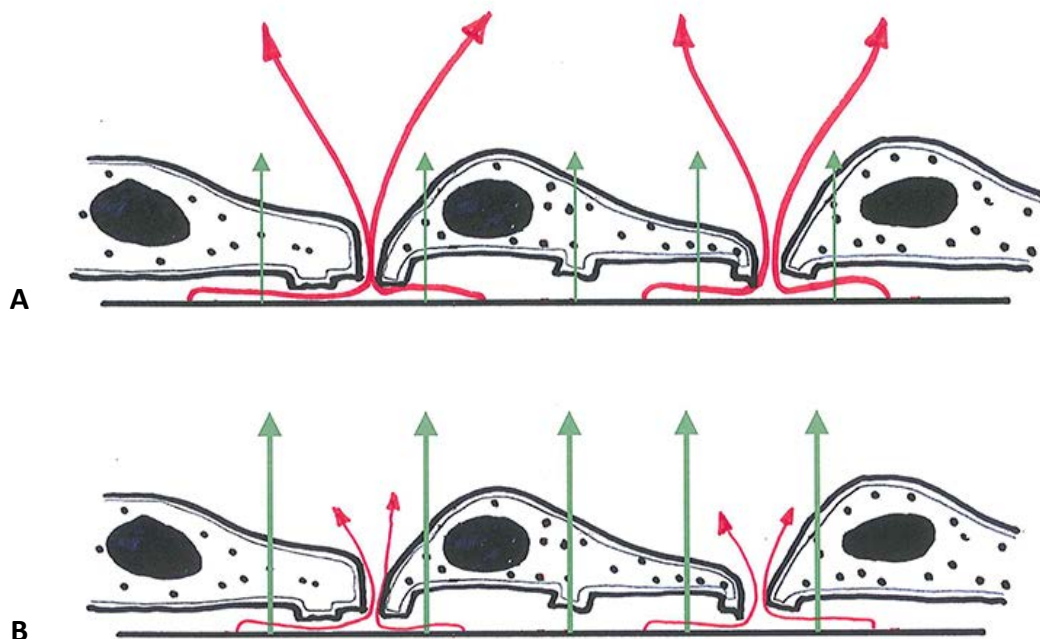
Slika 17: Primer izvedbe Scratch assay-a (187).

1.10.2 EICS (angl. Electric cell-substrate impedance sensing)

EICS (Electric cell-substrate impedance sensing) je metoda, pri kateri s pomočjo merjenja impedance, spremljamo rast celic v celičnih kulturah (**Slika 18**). Tako lahko merimo spremembe motilitete celic, morfološke spremembe in spremembe citoskeleta. Izmenični toka (I), ki teče preko elektrode na kateri rastejo celice, povzroči nastanek potenciala (V) na elektrodi. S pomočjo Ohmovega zakona $Z=V/I$ lahko tako določimo impedanco na elektrodi (188). Pri tem igra veliko vlogo frekvenca električnega toka na elektrodi. Pri nizkih frekvencah

(<2000Hz) teče večina toka v raztopino med posameznimi celicami, medtem kot pa pri visokih frekvencah (> 40,000 Hz), električni tok v veliki meri prehaja preko celic v raztopino.

Metoda je primerna za določanje vpliva izpostavljenosti celic toksinom, migracije celic in pritrdjenosti celic na površino (183). Vpliv toksinov na rast celic lahko merimo na dva načina. S pomočjo elektrode, ki ni v celoti prerasla s celicami lahko po dodatku toksina, spremljamo vpliv toksina na motiliteto celic. Druga možnost je, da elektrodom, ki so v celoti prerasle s celicami, dodamo toksin in nato spremljamo spremembe v impedanci, iz katerih je moč sklepati na preživetje celic na površini elektrode (189). Različne študije so pokazale, da polovične inhibicijske koncentracije določene z EICS metode, korelirajo z standardnimi biokemijskimi metodami (189)

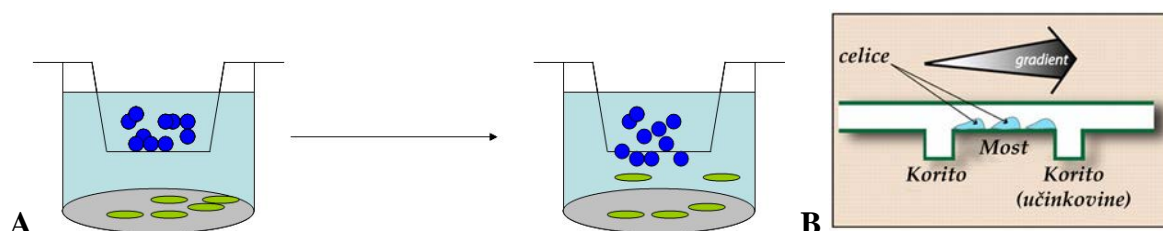


Slika 18: Shematski prikaz prehoda električnega toka pri nizki frekvenci (A) in pri visokih frekvencah (B) (190).

1.10.3 Več-komorni sistemi za merjenje kemotaksije

»Boyden-ove celice« predstavljajo uveljavljeno metodo, ki je namenjena testiranju vpliva kemotakse na hitrost celične migracije (191). Prvi, ki je uporabil to metodo, za določanje kemotakse je bil Boyden leta 1962. Metoda temelji na principu dveh komor, ki so med seboj

ločene z filtrom. V zgornjo komoro so nameščene celice, medtem, ko pa je v spodnji komori raztopljena substanca, ki povzroča kemotakso (**Slika 19A**). Velikost celic določa velikost por v filtru med obema komorama (192). S pomočjo nanosov različnih molekul ekstracelularnega matriksa (kolagena, elastina idr.) na membrano, ki loči obe komori, lahko dodatno posnemamo *in-vivo* pogoje. Danes obstajajo številne različne modifikacije te metode. Horizontalno ležeče komore (Zigmondove komore) omogočajo dodatno integracijo svetlobne mikroskopije, ki omogoča opazovanje migracije celic pod vplivom kemotaksije v realnem času (193) (**Slika 19B**).



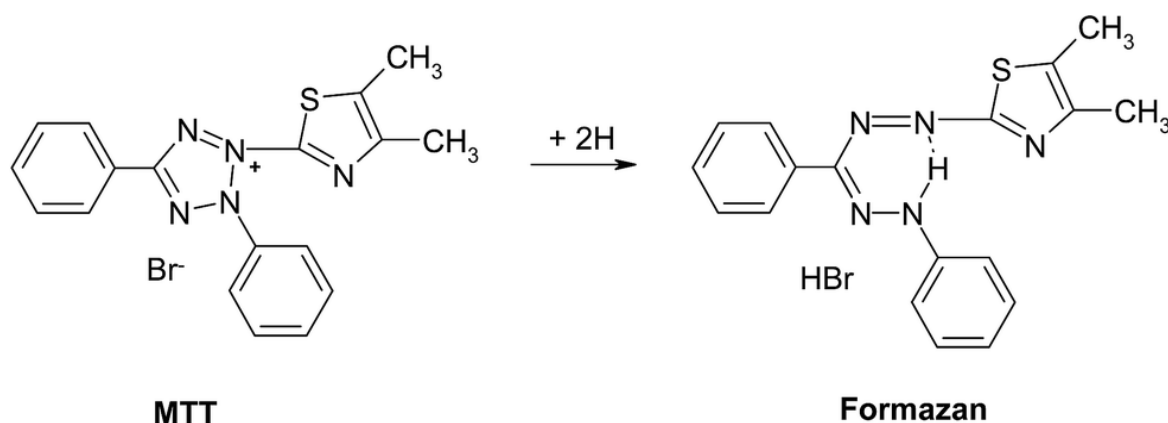
Slika 19: Shematski prikaz Bodeneve komore (A) in Zigmondove komore (B) (194, 195).

1.10.4 Testiranje viabilnosti celic v celičnih kulturah

1.10.4.1 Testiranje celične viabilnosti z MTT tetrazoliumom

Redukcija MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5,-difeniltetrazolium bromid) predstavlja eno prvih metod za določanje celične viabilnosti, ki se še danes pogosto uporablja kot del različnih celičnih modelov (196). Osnovni reagent je pripravljen v fiziološki raztopini, ki je kasneje dodana celičnim kulturam v končni koncentraciji 0,2-0,5 mg/ml in inkubacijskim časom med 1 do 4 ur in predstavlja substrat, ki se obarva. Žive celice pretvarjajo MTT v vijolično obarvan formazan, kar lahko kvantificiramo z meritvijo absorbance pri 570 nm, pri kateri ima ta spojina svoj maksimum. Ker je osnoven mehanizem delovanja povezan z metabolno aktivnostjo, torej z živim celicami, pri mrtvih več ni prihaja do pretvorbe MTT v formazan, tako je redukcija MTT sorazmerna s številom živih celic znotraj celične kulture. Natančen celični mehanizem redukcije MTT v formazan sicer ni natančno poznan, predvideva pa se, da med reakcijo pride do prenosa elektronov na MTT s pomočjo NADH oz. podobnih znotrajceličnih redukcijskih

molekul (197). Ob redukciji MTT pride do nastanka in nalaganja netopnega formazana tako znotraj celice, kot tudi v okolici celic (**Slika 20**). Da lahko izmerimo absorbanco je potrebno formazan raztopiti, za kar uporabljamo različna topila (npr. isopropanol ali dimetilformamid). Ob dodatku teh topil pride do tvorbe topnega formazana, s čemer se tudi prekine morebitna še potekajoča reakcija pretvorbe MTT, prav tako pa se na ta način minimizira morebiten vpliv barvila fenol rdeče, ki je navadno dodano celičnemu mediju (198). Intenziteta nastale barve je med drugim odvisna od koncentracije MTT, dolžine inkubacije, števila živih celic ter njihove metabolne aktivnosti.



MTT

Formazan

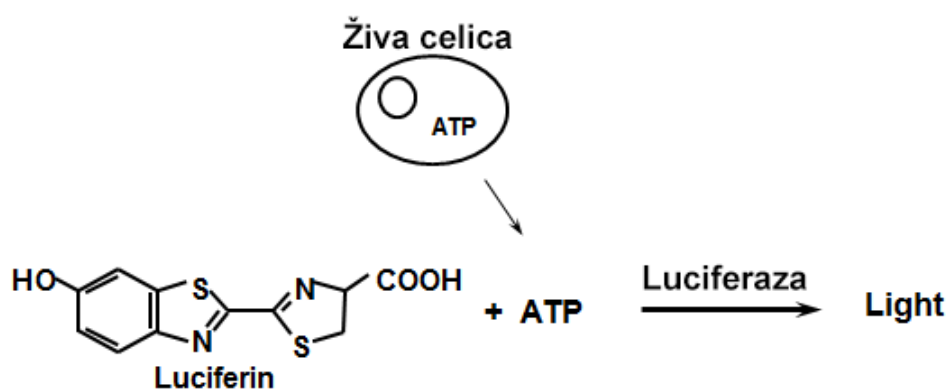
Slika 20: Struktura MTT in nastalega obarvanega formazana (197).

1.10.4.2 Določanje koncentracije ATP

Določanje koncentracije ATP je prav tako uveljavljena metoda za določanje celične viabilnosti. Celice, ki izgubijo integriteto celične membrane, izgubijo tudi sposobnost sinteze ATP, tako da pod vplivom endogene ATPaze hitro pride do degradacije preostalega ATP v citoplazmi in posledično je torej prisotnost ATP dober indikator prisotnosti živih celic.

Reagent s katerim določamo koncentracijo ATP vsebuje detergent, ki lizira celično steno, inhibitorje ATPaze, ki preprečijo razgradnjo prisotnega ATP v celicah, luciferin, ki služi kot eden izmed substratov za končno barvno reakcijo ter stabilno obliko encima luciferaze, ki ob prisotnosti ATP pretvarja luciferin v oksiluciferin. Stranski produkt te reakcije je nastanek svetlobe, kar lahko izmerimo. Poenostavljena reakcijska shema je prikazana na **Slika 21**(199). Določanje ATP je najhitrejša in najbolj občutljiva metoda določanja celične viabilnosti, in

hkrati tudi metoda, ki je najmanj podvržena artefaktom, katerim je podvrženo določanje celične viabilnosti s pomočjo MTT. Glavni vir artefaktov pri tej metodi predstavljajo reakcije različnih molekul z samim barvilom oz. direktno z encimi, ki so vključeni v redukcijo MTT. Tako je naprimer v literaturi opisano, da določeni flavunoidi v odsotnosti celic do določene mere sami metabolizirajo MTT (200). Do nastanka konstantnega svetlobnega signala pride približno 10 min po dodatku reagenta (201).



Slika 21: poenostavljena shema, ki prikazuje ATP in luciferin, ki služita kot substrat luciferazi za tvorbo svetlobe (199).

2 Eksperimentalni del

2.1 Materiali

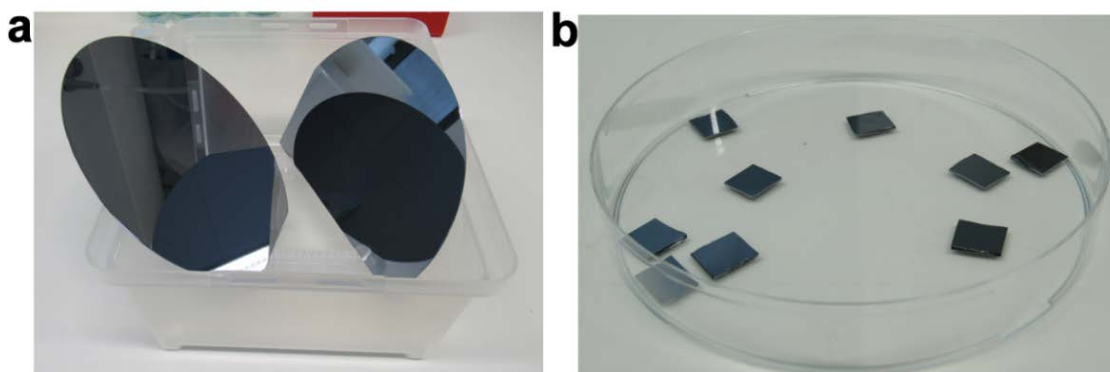
N,N,N-trimetilhitozan klorid (TMC 66, M_w : 90 kDa, stopnja acetilacije (DA): 32%, stopnja substitucije (DS: 66%)) z medicinsko stopnjo čistosti je bil kupljen pri Kitozyme S.A. (Herrstal, Belgija). Natrijeva sol alginatne kisline (ALG) in tablete fosfatne pufrne soli (angl. phosphate buffered saline, PBS) so bile kupljene pri Sigma-Aldrich (Maribor, Slovenija). Ultra čista voda ($18,2 \text{ M}\Omega$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$) iz ELGA Purelab® Flex 2 sistema (Lane End, VB) je bila uporabljena za pripravo vseh vzorcev. Vsi senzorji za kvarčno mikrotehniko (QCM senzorji) prevlečeni z SiO_2 (QSX303) so bili kupljeni pri LOT-Oriel, Nemčija. Vse kemikalije so bile uporabljene brez nadaljnjih modifikacij. Za testiranje varnosti, viabilnosti in protivnetnega učinka so bile uporabljene različne celične linije, med drugim celične kulture humanih kožnih fibroblastov

(ATCC-CCL-110, Detroit 551, in ATCC-CCL-171, MRC-5, oboji iz LGC Standards, VB) in THP-1 monociti (Cell Line Services, Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Gibco, ZDA).

2.2 Priprava polisaharidnih nanofilmov z vključenim pentoksifilinom (PTX)

2.2.1 Čiščenje substrata

Silicijeve plošče (Si-wafers, Topsisil, Nemčija) s površinsko orientacijo (100) so bile narezane v velikosti 1 x 1 cm in so bile uporabljene kot osnovni substrat za pripravo večslojnih nanofilmov (Slika 22). Plošče so bile najprej očiščene z etanolom in splahnjene z ultra čisto vodo, ter nato potopljene v ti. raztopino »piranja«, ki je sestavljena iz H_2O_2 in H_2SO_4 (35%) v volumskem razmerju 1:3 za eno uro. Na ta način očiščene Si-ploščice so bile za eno uro potopljene v ultra čisto vodo, nato še enkrat splahnjene s svežo ultra čisto vodo in posušene z N_2 plinom visoke čistosti (99.999%). Tako pripravljene Si-plošče so bile uporabljene za pripravo večslojnih TMC in ALG nanofilmov.



Slika 22: Si-rezina: a) pred rezanjem v primerno obliko in b) po pripravi substratov za nadaljnje eksperimentalno delo (foto: Inštitut za biomedicinske vede, Medicina fakulteta Univerze v Mariboru).

2.2.2 Priprava večslojnih nanofilmov

Za pripravo večslojnih filmov smo uporabili ti. imenovano tehniko »spin-coating«. V ta namen smo za pripravo prvega sloja na Si-ploščo s pipeto nanесли 50 μ L raztopine TMC (0,1 masne

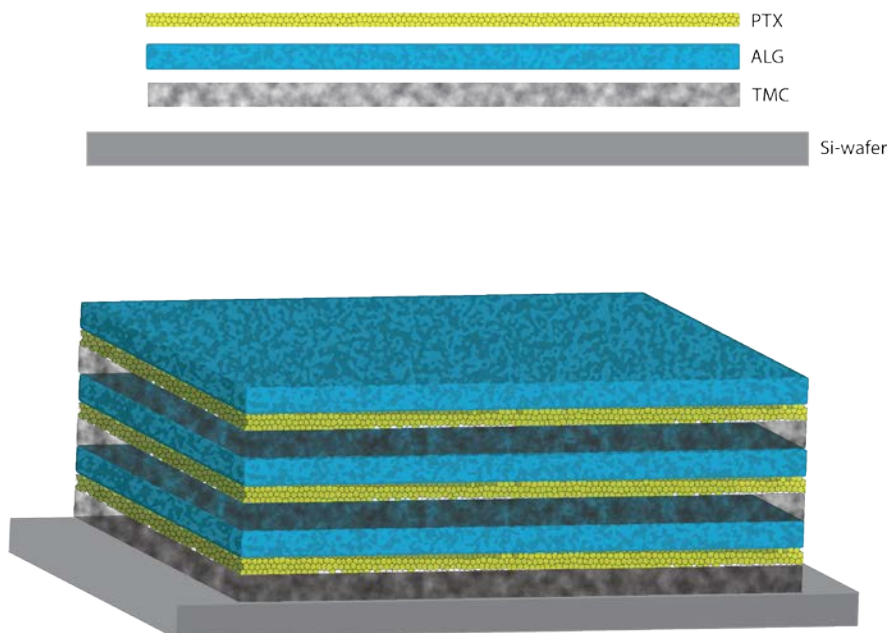
%, raztopljen v 150 mM NaCl). Pogoji spin-coatanja tega za pripravo tega in nadaljnjih slojev so bili naslednji: Si-plošče z nanosom so bile rotirane z rotacijsko hitrostjo 3000 vrtljajev na minuto in pospeškom 2500 rpm/s za 30s. Na tako pripravljen sloj TMC je bilo nato odpipetiranih 50 μ L raztopine ALG (0,1 ut.%, raztopljen v 150mM NaCl). Tudi priprava tega sloja je potekala pod zgoraj zapisanimi pogoji. V nadaljevanju sta bila ustvarjena še dva takšna dvosloja, torej TMC/ALG. Za lažje razumevanje strukture pripravljenih nanofilmov, je bila vsakemu posameznemu nanešenemu sloju (TMC ali ALG) dodeljena zaporedna številka sloja - 1, 2, 3, ki določa v katerem dvosloju se nanaša posamezni nanosloj (npr. 3TMC, 2ALG in tako naprej).

2.2.3 Nanos zdravila PTX v večslojne nanofilme

PTX je bil nanešen v posamezni dvosloj s pomočjo kapljanja. Na vsak sloj TMC je bilo odpipetirano 50 μ L raztopine PTX, ki je bil raztopljen v ultra čisti vodi, in sicer v različnih koncentracijah (5, 10, 15, 20 mg/ml). Vzorci so bili nato sušeni 2h pri 40°. Takoj po sušenju je bil nanje nanešen sloj ALG kot je opisano v poglavju 2.1.1.2.. Enak postopek je bil ponovljen, dokler niso bili ustvarjeni trije dvosloji enake sestave (**Slika 23**). V zadnjem koraku je bilo na vzorce odpipetirano 50 μ L ultra čiste vode. Nanofilmi s tem nanosom so bili rotirani pod pogoji, ki so opisani v poglavju 2.1.1.2. Za pripravo vzorcev, ki bi bili bolj podobni realnim vzorcem za uporabo v klinični oskrbi ran, so bile Si- plošče nadomeščene z alginatnimi koprenami (SeaSorb, Coloplast, Danska), velikosti 1 x 1 cm², ki se tudi sicer uporabljajo v oskrbi kroničnih ran. Posamezni dvosloji so bili na tej alginatni kopreni pripravljeni po enakih korakih kot so opisani v poglavju 2.1.1.2. Nanos PTX v posamezne dvosloje na tej podlagi je potekal po korakih opisanih v poglavju 2.1.1.3..

Imena posameznih vzorcev predstavljajo število posameznih dvoslojev in število slojev PTX (xTMC, yALG, zPTX), kot tudi posamezno koncentracijo PTX v posameznem vzorcu (npr.

3TMC3ALG3PTX_15 predstavlja vzorec s tremi dvopsloji TMC/ALG, ter tremi sloji PTX s koncentracijo 15mg/ml).

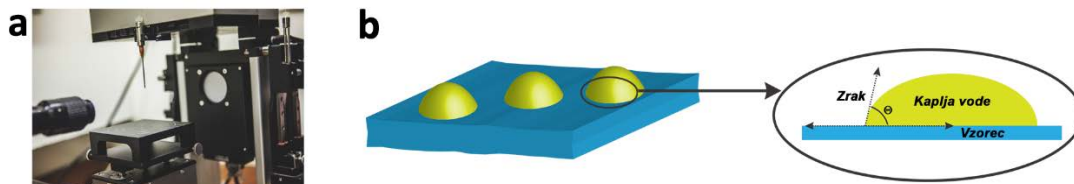


Slika 23: Shematski prikaz večslojnega sistema z dodatkom PTX.

2.3 Metode

2.3.1 Meritev stičnih kotov

Stični koti posameznih slojev TMC in ALG so bili merjeni s pomočjo naprave Dataphysics OCA 15⁺ (Dataphysics, Nemčija). Volumen kapljic, ki smo jih s to napravo merili, je bil 3 μ l. Vse meritve so bile izvedene pri sobni temperaturi (23 ± 1 °C). Določitev stičnih kotov je bila izvedena s pomočjo analize več kapljic na posameznem vzorcu, ki je bila izvedena z programsko opremo proizvajalca (verzija programske opreme SCA 20). Za vsak substrat so bile izvedene tri meritve z tremi posameznimi kapljicami. Iz dobljenih rezultatov, je bila izračunana povprečna vrednost, ki je bila uporabljena kot končni rezultat. Slika aparature in metoda določitve stičnega kota sta prikazani na **Slika 24**.



Slika 24: Meritev stičnega kota: a) slika naprave in b) shematski prikaz kapljic na površini in meritve SCA.

2.3.2 Infrardeča spektroskopija z oslavljenim totalnim odbojem (angl. *attenuated total reflection*) (ATR-IR)

Infrardeča (IR) spektroskopija je oblika absorpcijske spektroskopije, ki meri absorbanco (lahko tudi transmisijo oz. prepustnost) infrardeče svetlobe (označeno na osi y), glede na valovno dolžino ali frekvenco nihanja vezi med atomi, ki je značilna za vsako spojino (označeno na osi x). Med različnimi IR tehnikami je za študij ploskovnih vzorcev posebno primerna metoda z oslavljenim totalnim odbojem (ATR-IR). Slednja zaradi tesnega stika med preiskovanim substratom, kot so npr. tanki filmi in ATR kristalom (diamant v našem primeru), omogoča snemanje spektrov z visoko intenziteto. Za izvedbo te metode smo uporabili aparat Agilent Cary 630 FTIR (**Slika 25**) z diamantnim ATR modulom in območjem skeniranja $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ v korakih po 1 cm^{-1} . Vsak vzorec oz. vsak nov sloj je bil izmerjen na treh različnih mestih in v osmih ponovitvah posamezne meritve.



Slika 25: IR spektrofotometer podjetja Agilent (foto: Uroš Maver).

2.3.3 Profilometrija

S pomočjo profilometra DEKTAK 150 Stylus Profiler podjetja Veeco (Plainview, NY, ZDA) (Slika 26) je bila izmerjena debelina TMC in ALG slojev. Za izvedbo meritev je bila določena dolžina meritve vzorca 1000 μm in čas meritve 3 s. Uporabljena diamantna igla je imela premer 12,5 μm , določena sila je bila 3 mg z resolucijo 0,333 μm /vzorec, medtem ko je bilo uporabljeno meritveno območje 6,5 μm . Za profil so bili določeni hribi in doline. Za izvedbo meritve debeline vzorcev s ti. metodo »step-height« (oz. »višina koraka«), je bilo najprej potrebno spraskati TMC/ALG sloj s površine vzorcev. Debelina je bila izmerjena na treh različnih mestih. Meritve so bile izvedene po vsakem nanosu sloja bodisi TMC ali ALG.



Slika 26: Profilometer podjetja Veeco (vir: Google slikovno iskanje).

2.3.4 Kvarčna mikrotehtnica (anlg. Quartz crystal microbalance) – QCM-D

Masa oz. natančneje sprememba mase posameznega nanešenega sloja je bila določena s pomočjo ti. kvarčne mikrotehtnice (QCM-D, model E4) podjetja Q-Sense, Gothenburg, Švedska (Slika 27). Ob spremembi mase pizoelektričnega kristala, do katere je prišlo zaradi dodajanja/odvzemanja materiala na površini kristala, lahko naprava simultano zazna spremembe v frekvenci resonance (ΔF) in energiji stresanja (ΔD) kristala. Oba podatka sta ključna za napovedovanje morebitnih interakcij med posameznimi sloji oz. komponentami v njih. D v imenu sicer pomeni disipacija. Po definiciji gre za spremembe (izgubo) trenja, ki vodijo to dušenja oscilacije kristala kvarčne mikrotehtnice. To dušenje je direktno povezano z

viskoelastičnimi lastnostmi materiala v nanosu. Za trden adsorbiran sloj (kot v našem primeru), ki je v celoti sklopljen s oscilacijo kristala, lahko uporabimo ti. Sauerbrey-eva enačbo (202) (1):

$$\Delta m = C \frac{\Delta f_n}{n} \quad (1)$$

kjer Δf_n pomeni spremembo frekvence, C je Sauerbrey-eva konstanta (znaša $0.177 \text{ mg} \cdot \text{Hz}^{-1} \cdot \text{m}^2$ za 5 MHz kristal), n je oznaka višjega harmonika osnovne oscilacije ($n = 1, 3, 5, \text{itn.}$), in Δm predstavlja spremembo mase kristala zaradi adsorbiranega sloja.

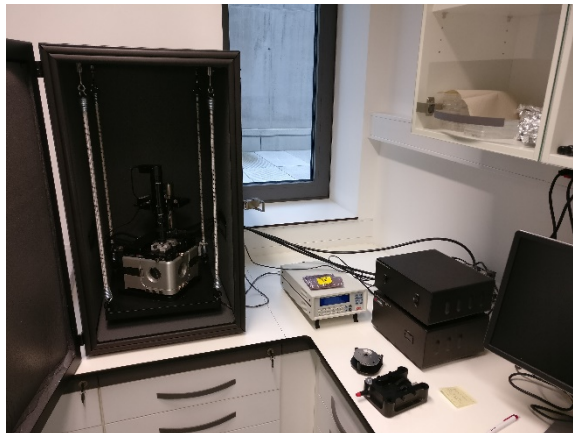


Slika 27: Kvarčna mikrotehnica podjetja Q-Sense (vir: Q-sense).

2.3.5 Mikroskopija na atomsko silo (angl. atomic force microscopy, AFM)

Morfologijo površine in hrapavost vzorcev z različnim končnim slojem v oblogi smo ovrednotili z mikroskopom na atomsko silo Keysight Technologies AFM 7500 (Keysight, Santa Barbara, ZDA) (Slika 28). Za meritve smo uporabili ti. način »merjenja z dinamično silo« (angl. tapping mode). Pred slikanjem vzorcev pod mikroskopom so bili vsi vzorci posušeni z N_2 plinom visoke čistosti (99,999%). V namen skeniranja vzorcev so bile uporabljene AFM konice iz silicija (ATEC-NC-20, Nanosensors, Nemčija) z resonančno frekvenco 210 – 490 kHz in konstanto sile $12 - 110 \text{ N m}^{-1}$. Vse meritve so bile izvedene pri

sobni temperaturi (23 ± 1 °C). Velikost posnetih slik vzorcev je znašala $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ in $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ z resolucijo 2048 x2048 pikslov. Vse slike so bile obdelane z programsko opremo Gwyddion, ki je prosto dostopen program.

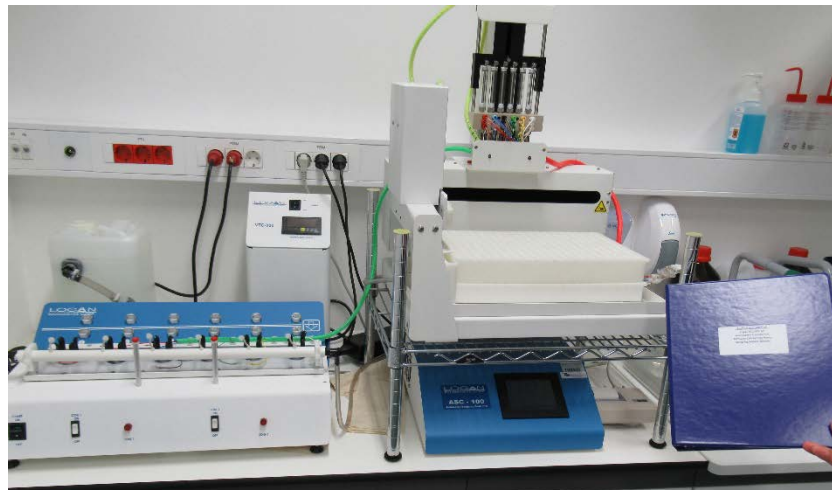


Slika 28: Mikroskop na atomsko silo podjetja Keysight (foto: Uroš Maver).

2.3.6 *In vitro* sproščanje PTX

Za izvedbo študije *in vitro* sproščanja zdravila je bil uporabljen sistem Francovih difuzijskih celic za avtomatsko merjenje sproščenega zdravila iz topikalnih in transdermalnih farmacevtskih oblik (Logan System 912-6, Somerset, ZDA) (**Slika 29**). Vzorci, na katerih je predhodno bilo nanešeno zdravilo v željeni koncentraciji, so bili postavljeni v Francove difuzijske celice. Predel za merjenje sproščene substance je bil napolnjen s PBS pufrom (pH 7,4) in je bil segret na telesno temperaturo (37 ± 1 °C). Med sproščanjem je bila tekočina mešana z magnetnim mešalom s hitrostjo 50 rpm. Količina sproščenega PTX je bila merjenja preko šestih dni. V določenih časovnih intervalih (1, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 1440, 2880, 4320, 5760, 7200 in 8640 min) je bila iz meritvenih celic odvzeta tekočina, v kateri je s pomočjo spektrofotometrije (Cary 60 UV-Visible Spectrophotometer, Agilent, Nemčija) bila določena količina sproščenega/raztopljenega PTX pri absorbanci 256 nm. Odvzeti vzorci so bili nadomeščeni s svežim PBS. Zaradi odvzema vzorca, ter nadomeščanja medija, ki je imel za posledico redčitev vzorca, so bili zagotovljeni ti. »sink pogoji« (angl. sink conditions), s čemer smo zagotovili ustreznost metode. Ob preračunavanju koncentracij smo uporabljali Beer-

Lambertov zakon, po katerem lahko izmerjeno absorbanco pretvorimo v koncentracijo raztopljenega PTX z uporabo umeritvene krivulje. Vse meritve so bile izvedene v treh paralelkah.



Slika 29: Avtomatski sistem Francovih difuzijskih celic za spremljanje sproščanja iz topikalnih in transdermalnih farmacevtskih oblik (foto: Uroš Maver).

Z namenom določitve kinetike sproščanja PTX iz večslojnih matrik, sta bila uporabljena dva različna farmakološka modela, in sicer *kinetika ničelnega reda*, ki je opisana v formuli (2), ter modificiran *Korsmayer-Peppas* model, ki je predstavljen s formulo (3).

Kinetika ničelnega reda:

$$M_t = M_0 + k_0 t \quad (2)$$

kjer M_t predstavlja količino sproščenega zdravila v časovni enoti t , M_0 predstavlja začetno količino zdravila, raztopljenega v raztopini (najpogosteje je $M_0 = 0$) in k_0 je konstanta sproščanja kinetike ničelnega reda in je opredeljena z enoto koncentracija/čas.

Modificiran Korsmayer-pappas model:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n + b \quad (3)$$

kjer M_t predstavlja delež sproščenega zdravila v časovni enoti t , M_∞ predstavlja celotno količino zdravila v sistemu, k predstavlja konstanto izmerjenega sproščanja zdravila, n predstavlja

difuzijski eksponent in b količino sproščenega zdravila, ki je povezan z nenadno sprostitvijo zdravila (angl. burst effect).

2.3.7 Celični testi

2.3.7.1 Priprava ekstraktov

Ekstrakcija je bila izvedena v skladu z standardom ISO 10993-5 in ISO 10993-12 (10993-5 AAI. Biološka evalvacija medicinskih naprav –Poglavje 5: testiranje *in-vitro* citotoksičnosti. 2009. 10993-12 I Biološka evaluacija medicinskih naprav – Poglavje 12: priprava vzorcev in referenčni materiali. 2007) z inkubacijo 3 cm² materiala na ml medija celične kulture za 24h pri 37°C.

2.3.7.2 Vpliv celic na izpostavljenost eluentom

MRC-5 humani fibroblasti (ATCC-CCI-171) so bili kultivirani v ti. »Minimal Essential« mediju z dodatkom Earl-ove soli (MEM, Gibco, ZDA), 10 ut.% fetalnega govejega seruma (FBS – angl. foetal bovine serum, GE Health Sciences, VB), 2 mM L-glutamina, 1 ut.% raztopine penicilina/streptomicina pri 37°C in v atmosferi s 5 ut.% CO₂. THP-1 humani monociti pridobljeni od podjetja Cell Line Services, Roswell Park memorial Institute (RPMI, Gibco, ZDA) so bili kultivirani v mediju 1640, z dodatkom 10 ut.% FBS, 2mM L-glutamina, in 1 ut.% raztopine penicilina/streptomicina.

MRC-5 celice so bile izpostavljene eluentom, ki so bili v razmerju 1:2, 1:5, 1:10 in 1:20 razredčeni z MEM z dodatkom 10 ut.% FBS. THP-1 celice so bile izpostavljene eluentom, ki so bili v razmerju 1:2, 1:5, 1:10 in razredčeni v razmerju 1:20 z RPMI 1640 z dodatkom 10 ut.% FBS.

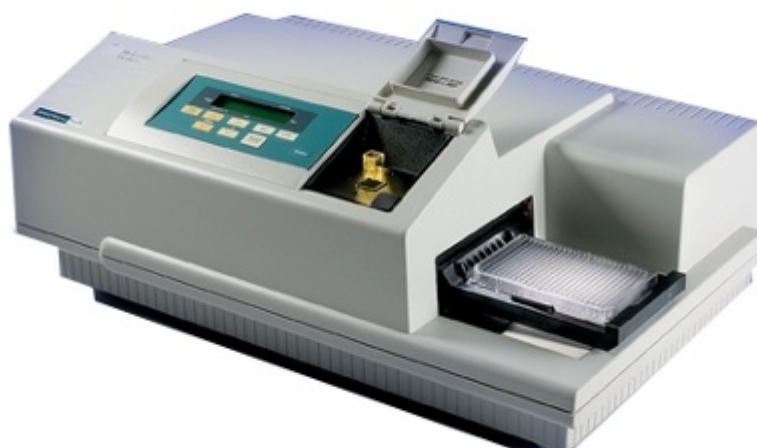
2.3.7.3 Testiranje viabilnosti/citotoksičnosti ob izpostavljenosti vzorcev z eluenti

Celice MRC-5 so bile nagojene v P96 plošči in sicer v različnih gostotah nanosa celic na posamezen vodnjak plošče, ki je bila različna glede na predviden čas izpostavitve. Celice smo nanesli 24h pred izpostavitvijo eluatom. Celična gostota je znašala 16,000/vodnjak za 24 ur, 13,000/vodnjak za 48 ur, 11,000/vodnjak za 72 ur. Zagotovitev različnih gostot celic v različnih časovnih obdobjih je nujna za zagotavljanje subkonfluentnih rastnih pogojev (torej, da celice ne tvorijo koherentnega monosloja čez celotno površino) za testiranje citotoksičnosti. Kot pozitivna kontrola meritvam viabilnosti, so bile celice izpostavljanje 2 μ l EtOH (70 ut.%) z dodatkom Tritona X100 (v razmerju 1:1) za 10 min. Po 24 urni izpostavljenosti celic eluentom, je bila njihova viabilnost določena s pomočjo merjenja aktivnosti dehidrogenaze (CellTiter 96® test, Promega, ZDA) in koncentracije ATP (CellTiter-Glo® test, Promega, ZDA).

2.3.7.4 Merjenje viabilnosti celic preko določanja aktivnosti dehidrogenaze (CellTiter 96® test, MTS)

Test je bil uporabljen v skladu z navodili proizvajalca. Raztopini MTS in PMS sta bili odmrznjeni, 100 μ l PMS raztopine je bilo zamešano z 2 ml MTS raztopine. 20 μ l tako pripravljene MTS/PMS raztopine je bilo nato dodane v vsaki vodnjak na P96 plošči. Te plošče so bile nato inkubirane 2h pri 37 \pm 1° v atmosferi 5 ut.% CO₂ v celičnem inkubatorju. Absorbanca je bila izmerjena pri valovni dolžini 490 nm (na napravi SPECTRA MAX plus 384, Molecular devices, ZDA) (**Slika 30**). Paralelno so bile meritve MTS potrjene s pomočjo mikroskopije. Viabilnost celic je bila določna s pomočjo naslednje formule (4):

$$\text{Dehidrogenazna aktivnost (\%)} = 100 \times \frac{A_{\text{vzorec}} - A_{\text{vzorec}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{blank}}} (\text{pri } 490 \text{ nm}) \quad (4)$$



Slika 30: Spektrofotometer SPECTRAMAX plus 384 (vir: Google slikovno iskanje).

2.3.7.5 Merjenje viabilnosti celic preko določanja koncentracije ATP (CellTiter-Glo® test)

Za določanje koncentracije ATP je bil uporabljen CellTiter-Glo® test v skladu z navodili proizvajalca. Plošče P96 so bile 30 min izpostavljanje sobni temperaturi (23 ± 1 °C) preden je bil dodan CellTiter-Glo® reagent v razmerju 1:1 (glede na količino raztopine za celično kulturo v posameznem vodnjaku). Plošče so bile na 2 minute stresane, ter inkubirane za dodatnih 10 minut pri sobni temperaturi (23 ± 1 °C) preden je bila vsebina v posameznih vodnjakih prenesena na mikrotitrsko ploščo, ki so bile primerne za merjenje luminiscence. Luminiscenca vzorcev je bila določena s pomočjo naprave Luministar (BMG LabTech, ZDA) (**Slika 31**).



Slika 31: Luministar, BMG LabTech (vir: Google slikovno iskanje).

2.3.7.6 Testiranje viabilnosti/citotoksičnosti pri direktnem stiku vzorcev

MRC-5 celice (400,000 celic za 24 ur, 332,500 celic za 48 ur in 266,000 po 72 ur izpostavljenosti) so bile nanešene na stekleno površino (kontrola za optimalno celično rast), na večslojne matrice z vključenim PTX, ter matrice brez dodatka PTX. Po 24 urah, 48 urah in po 72 urah so bile celice opazovane pod svetlobnim mikroskopom. Po 72 urah so bile celice prenešene v nove petrijevke, kjer je celicam najprej bila določena aktivnost dehidrogenaze (kot zgoraj v poglavju 2.3.7.4). Število celic je bilo določeno s pomočjo CASY TT števca (Innovatis, Roche, Švica) (**Slika 32**).



Slika 32: CASY TT števec celic (vir: Google slikovno iskanje).

2.3.7.7 Merjenje sekrecije TNF- α

100.000 THP-1 celic je bilo nanešeno na P12 mikrotiterske plošče, katerim so bili nato za 24 ur dodani eluenti v različnih koncentracijah brez in v kombinacijah z vnetnim stimulusom, in sicer preko dodatka 50 ng/ml bakterijskega lipopolisaharida (LPS, *Escherichia coli* 055:B5, Sigma, Nemčija). Sekrecija citokina je bila merjena s pomočjo TNF- α ELISA seta IBD Bioscience, OptEIA™, ZDA) v skladu z navodili proizvajalca. Na kratko, posamezne plošče so bile prevlečene z anti TNF- α protitelesom, nato so bile izpostavljene standardom in vzorcem (v primerni razredčitvi), inkubirane z biotiniziranim detekcijskim protitelesom in na streptavidin vezano hrenovo peroksidazo. Na koncu je bil dodan še peroksidazni substrat

tetrametilbenzidin. Z dodatkom 2N žveplene kisline je prišlo do prekinitve reakcije. Absorbanca je bila izmerjena ob valovni dolžini 450nm z korekturo pri valovno dolžini 570 nm z SPECTRA MAX plus 384 photometer (BMG LabTech, ZDA) (Slika 30).

2.3.7.8 Izpostavljenost vzorcem iz *in vitro* testiranja sproščanja

Za izvedbo testiranja biokompatibilnosti (po ISO 10993-5 standardu) z človeškimi fibroblasti (ATCC-CCL-110, Detroit 551, LGC Standards, VB), so bile uporabljene raztopine vzorcev, odvzetih ob zelenih časovnih intervalih med testiranjem *in-vitro* sproščanja PTX. Te so bile inkubirane z fibroblasti v P96 mikrotitrskih ploščah. Vsak vodnjak plošče je bil najprej napolnjen z suspenzijo, ki je vsebovala 60,000 celic. Po 24 urah, ko je prišlo do pritrditve fibroblastov na površino, je bil vsakemu vodnjaku dodan posamezen vzorec kot je opisano zgoraj. Uporabljena raztopina je bila razredčena z celičnim medijem (angl. »Advanced Dulbecco modified Eagle« medij (ADMEM, Gibco, Grand Island, NY, ZDA)) v razmerju 1:2, kateremu je bil še dodan 5 ut.% FBS. Citotoksični efekt je bila opazovan po 24 urni inkubaciji pri 37°C in on izpostavitvi atmosferi, ki je vsebovala 5 ut.% CO₂. Celična viabilnost je bila določena s pomočjo redukcijske reakcije z tetrazolijevo soljo MTT (3(4,,5,-dimetiltiazolil1-2)-2,5difeniltetrazolium bromid (203). Absorbanca je bila določena pri valovni dolžini 570 nm na napravi Varioskan (ThermoFisher, Nemčija) (Slika 33).



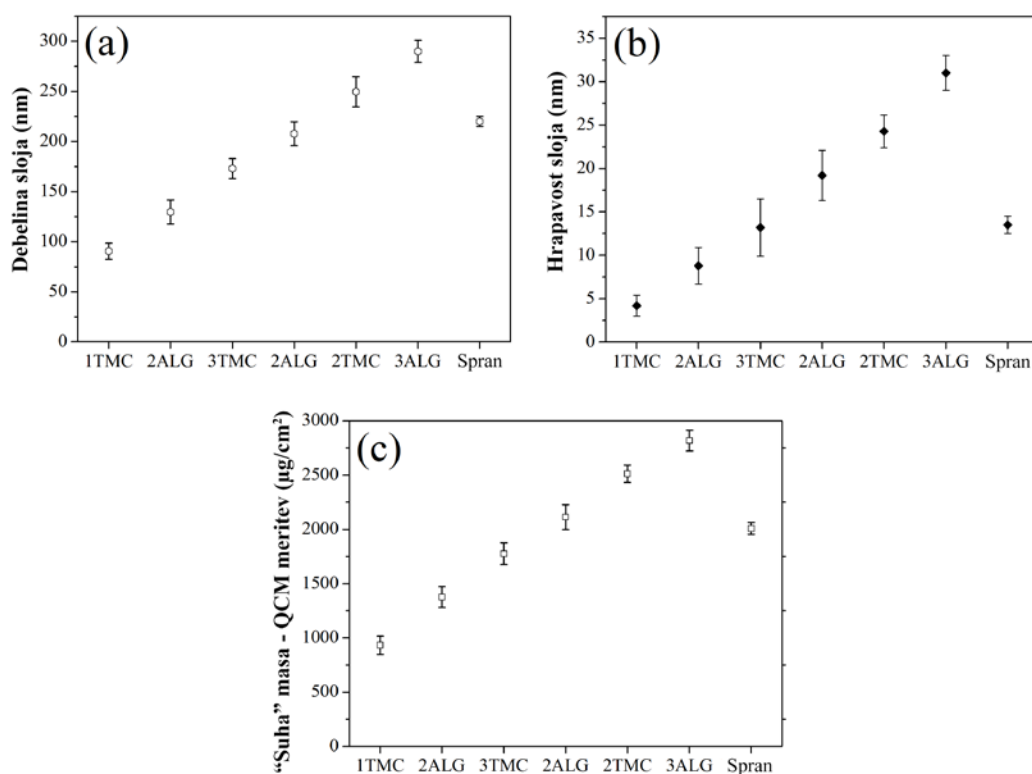
Slika 33: Spektrofotometer Varioskan (vir: Google slikovno iskanje).

3 Rezultati

3.1 Priprava in karakterizacija večslojnih modelnih polimernih filmov:

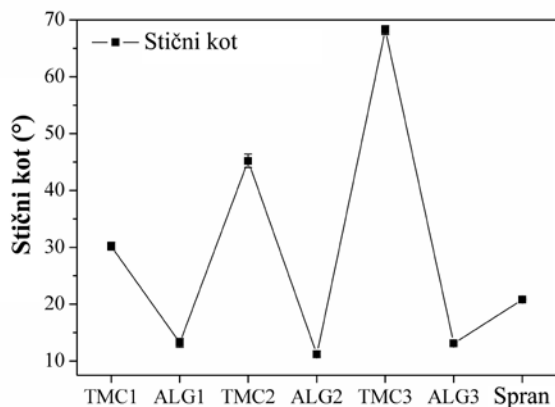
določanje njihove debeline, hrapavosti, močljivosti, morfologije in sestave

Slika 34 prikazuje izmerjene debeline posameznih slojev, njihovo hrapavost (oboje določeno s pomočjo profilometrije), ter suho maso posameznih slojev po nanosu s pomočjo »spin coatinga«. Dodatno je bila določena tudi masa posameznih slojev po spiranju.



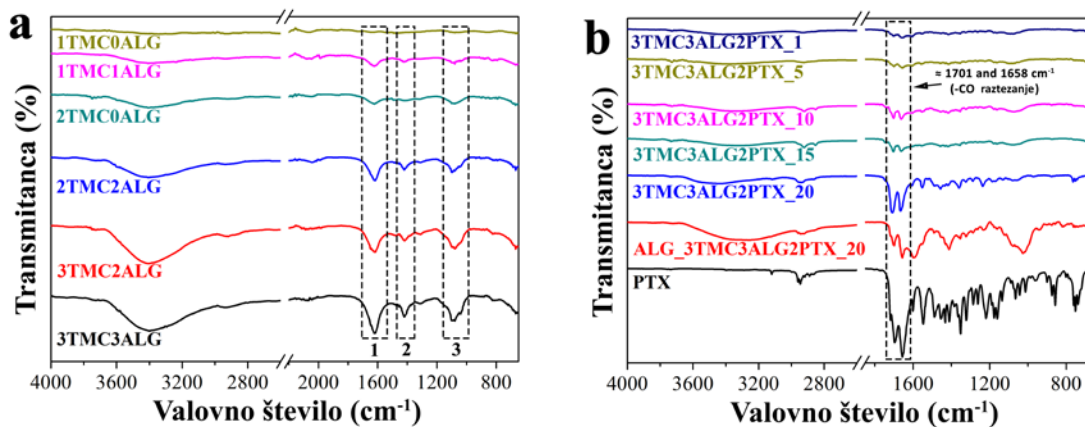
Slika 34: Osnovne lastnosti pripravljene večslojne polisaharidne nanofilme sestavljenih in nasprotno nabitih TMC in ALG slojev: (a) debelina posameznih slojev, (b) njihova hrapavost, (c) s pomočjo QCM-D metode določena masa slojev (204).

S pomočjo meritve stičnih kotov posameznih slojev TMC oz. ALG je bila okarakterizirana površina slojev, ter dodatno potrjena prisotnost posameznega sloja po »spin coatingu«. **Slika 35** prikazuje rezultate meritev stičnih kotov.



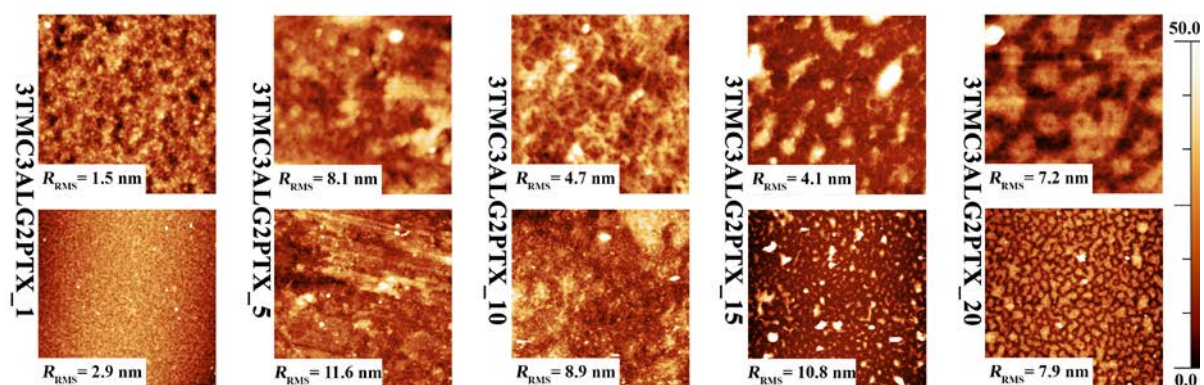
Slika 35: Vrednosti stičnih kotov.

Rezultati ATR-IR meritev večslojnih nanofilmov pripravljenih na silicijevih ploščah brez in z dodatkom PTX so prikazani na Slika 36. Iz analize spektrov je razvidno (Slika 36a), da sta prisotna dva vrhova, značilna za TMC (1~1564 cm^{-1} za N-H, in 2~1479 cm^{-1} za C-H)(42), ter en, ki je značilen za ALG (3~1024 cm^{-1} za C-O)(43). Hkrati pa na Sliki 36b vidimo karakterističen vrh za PTX, s čemer smo tudi potrdili prisotnost PTX v vseh pripravljenih vzorcih, neodvisno od koncentracije.



Slika 36: ATR-IR spekter večslojnih polisaharidnih nanofilmov pripravljenih (a) brez in (b) z vključenim PTX v različnih koncentracijah. Spekter večslojnih polisaharidnih slojev pripravljenih na alginatni kopreni so prikazani v (b) (204).

Rezultati meritev morfologije površine večslojnih polisaharidnih nanofilmov z vključenim PTX so prikazani na Slika 37. Iz rezultatov je razvidno, da povečana koncentracija PTX povzroči povečano hrapavost površine slojev.



Slika 37: Morfologija posameznih vzorcev ter rezultati meritev hrapavosti njihove površine s pomočjo AFM (204).

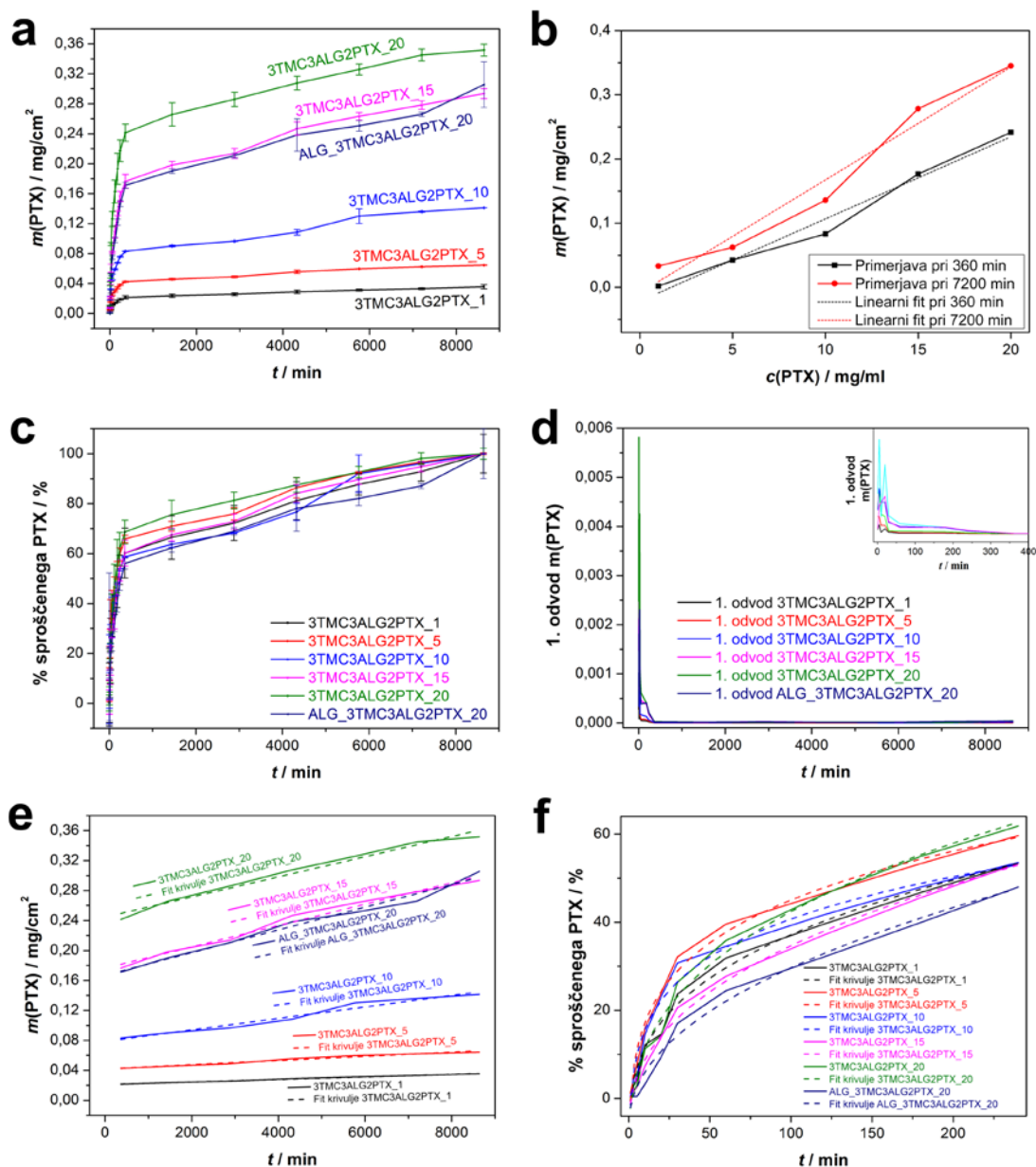
3.2 Sproščanje pentoksifilina

Rezultati *in vitro* sproščanja PTX v različnih koncentracijah so prikazani na **Slika 38**.

Tabela 3 prikazuje R^2 vrednosti posameznih vzorcev za območje s hitrim sproščanjem PTX in za območje s konstantnim sproščanjem PTX, ki so opisani s kinetiko ničelnega reda in spremenjenim Korsmayer-Peppas modelom.

Tabela 3: R^2 vrednosti fitajna rezultatov sproščanja za hitro in konstantno sproščanje (kinetika ničtega reda in Korsmayer-Peppas model).

Vzorec/ R^2 vrednost	Hitro sproščanje (Korsmayer-Peppas model)	Konstantno sproščanje (kinetika nultega reda)
<i>3TMC3ALG2PTX_1</i>	0.98617	0.9954
<i>3TMC3ALG2PTX_5</i>	0.98726	0.97407
<i>3TMC3ALG2PTX_10</i>	0.97587	0.96388
<i>3TMC3ALG2PTX_15</i>	0.99158	0.98109
<i>3TMC3ALG2PTX_20</i>	0.98387	0.97533
<i>ALG_3TMC3ALG2PTX_20</i>	0.98111	0.98021



Slika 38: Rezultati *in vitro* sproščanja PTX: a) masa sproščenega PTX v odvisnosti od časa, b) preverjanje linearnosti odvisnosti med količino vgrajenega PTX in sproščene mase PTX, c), delež sproščenega PTX kot funkcija časa, d) 1. odvod podatkov sproščanja za vse vzorce, e) profili sproščanja PTX v prvih 360min z uporabo *kinetike nultega reda*, f) profili sproščanja PTX v časovnem intervalu od 360min do 8640min z uporabo *Krosmyer-Peppas* modela (204).

V **Tabela 4** so prikazane mase PTX, ki jih je teoretično možno vključiti v večslojne polisaharidne matrice, ki bi jih uporabili v klinični praksi.

Tabela 4: Prikaz hipotetične mase PTX v večslojnih polisaharidnih matrikah, ki bi jih lahko uporabili v klinični praksi.

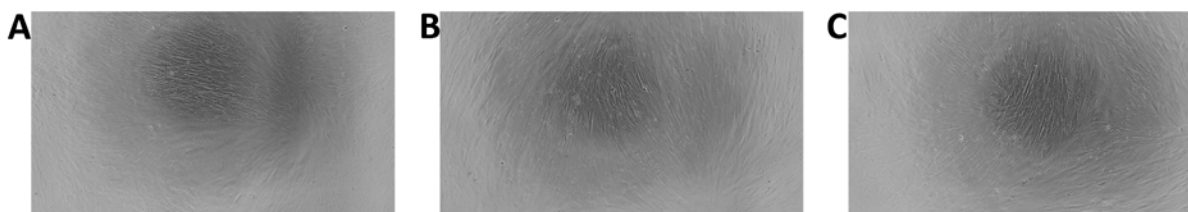
Vzorec/Velikost hipotetičnega obliža	1 cm x 1 cm [mg]	10 cm x 10 cm [mg]
--------------------------------------	------------------	--------------------

<i>3TMC3ALG2PTX_1</i>	0.535	53.5
<i>3TMC3ALG2PTX_5</i>	0.967	96.7
<i>3TMC3ALG2PTX_10</i>	2.120	212.0
<i>3TMC3ALG2PTX_15</i>	4.402	440.2
<i>3TMC3ALG2PTX_20</i>	5.275	527.5
<i>ALG_3TMC3ALG2PTX_20</i>	4.581	458.1

3.3 Celični testi

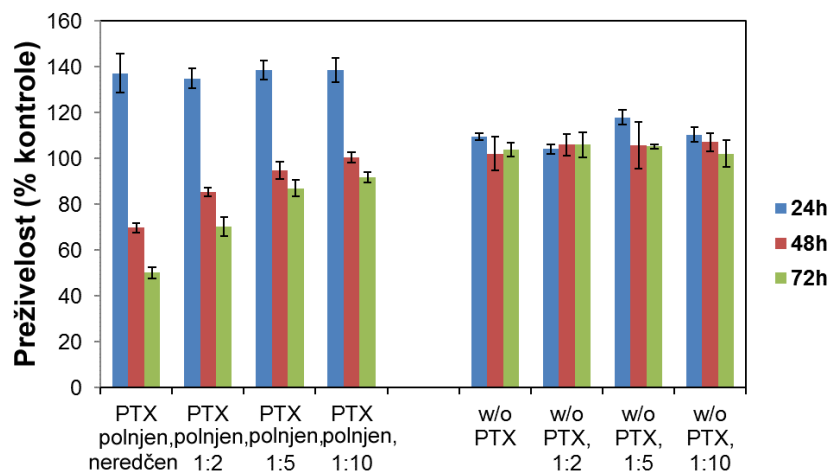
3.3.1 Vpliv vzorcev večslojnih matric z in brez dodatka PTX na viabilnost fibroblastov

MRC-5 celice, ki so bile izpostavljene vzorcem z dodatkom PTX in vzorcem brez dodatka PTX, v primerjavi z kontrolo niso pokazale sprememb v gostoti celic kot tudi ne v morfologiji celic (Slika 39).



Slika 39: Morfologija MRC- celic izpostavljenim nerazredčenim vzorcem z dodatkom PTX (A) in vzorcem brez dodatka PTX (B) v primerjavi z kontrolo po 48 urah (C) (204).

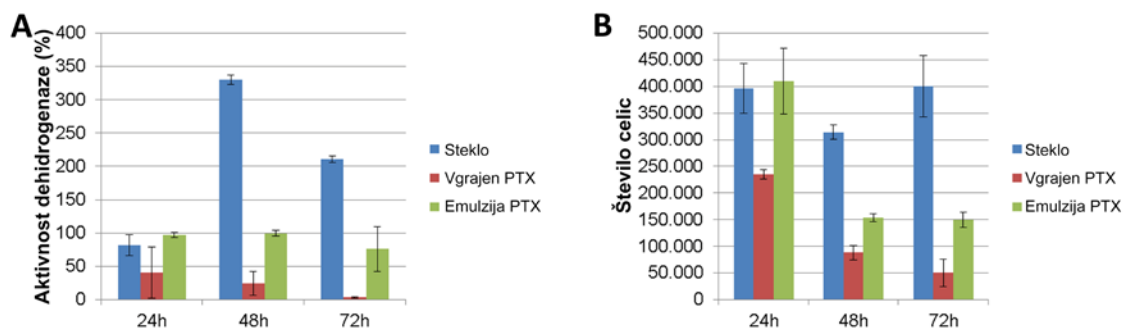
Meritve dehidrogenazne aktivnosti, kot indikatorja celične viabilnosti, so bile nespremenjene v celicah izpostavljenim vzorcem brez dodatka PTX (Slika 40). Celice, ki so bile izpostavljene vzorcem z dodatkom PTX so pokazale dvofazno reakcijo. Po 24 urah je prišlo do porasta viabilnosti celic pri vseh razredčitvah, medtem ko je prišlo po 48 in 72 urah do upada viabilnosti. Razlika med viabilnostjo celic med celicami, ki so bile izpostavljene vzorcem z dodatkom PTX in vzorcem brez PTX je bila večja po 72 urah, kot pa po 48 urah.



Slika 40: Aktivnost dehidrogenaze kot indikator za viabilnost MRC-5 celic izpostavljenim razredčenim in ne razredčenim vzorcem z dodatkom PTX in vzorcem brez dodatka PTX po 24 urah, 48 urah in 72 urah (204).

3.3.2 Adhezija in proliferacija fibroblastov v direktnem stiku z večslojnimi matricami

Ob direktnem stiku fibroblastov z večslojnimi matricami z dodatkom PTX, pride do upada celične gostote. Upad je bil zmeren po 24 urah, ter izrazit po 72 urah. Te spremembe je tudi možno zaslediti ob meritvah dehidrogenaze aktivnosti kot indikatorja celične viabilnosti (**Slika 41A**), kot tudi ob štetju števila celic (**Slika 41A**). Na **Slika 42** so tudi vidne tipične morfološke spremembe, ki sledijo tem rezultatom. Medtem ko fibroblasti, ki so bili kultivirani na steklu, kažejo tipično »razvlečeno/podaljšano« obliko (**Slika 42A**), je prišlo pri celicah, ki so bile v direktnem stiku z večslojnimi matricami do tvorbe celičnih klastrov, ki pa niso tipične za to vrsto celic (**Slika 42B**).



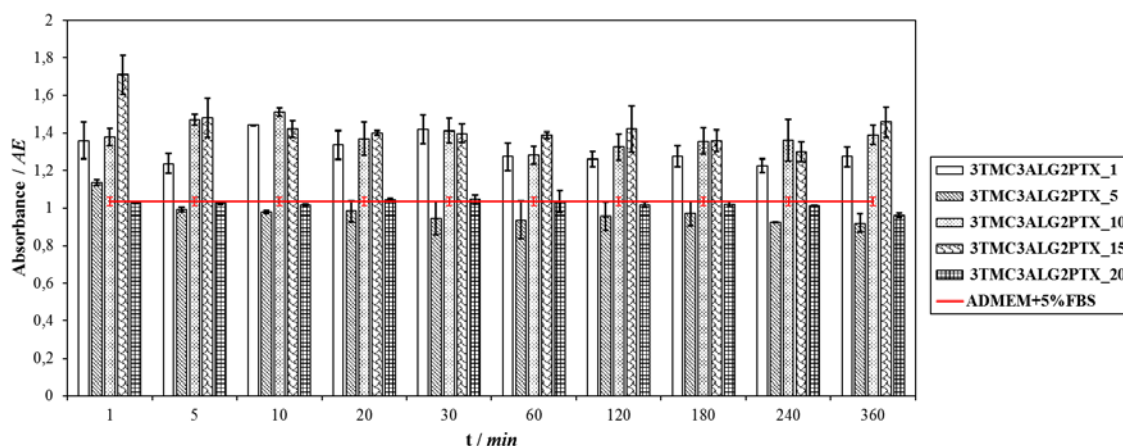
Slika 41: Dehidrogenazna aktivnost (A) an število celic (B) MRC-5 fibroblastov kultiviranih na steklu, ali na večslojnih matricah z dodatkom PTX in brez dodatka PTX (204).



Slika 42: Morfologija MRC-5 fibroblastov po 72 urni kultivaciji na steklu in na večslojnih matricah z dodatkom PTX in brez dodatka PTX. Na sliki A je viden monosloj fibroblastov na stekleni površini. Medtem kot je prišlo do upada celične gostote fibroblastih v direktnem kontaktu z večslojnimi matricami z dodatkom PTX (B) in do tvorbe klastrov fibroblastov (C) (204).

3.3.3 Testiranje biokompatibilnosti na kulturi človeških kožnih fibroblastov

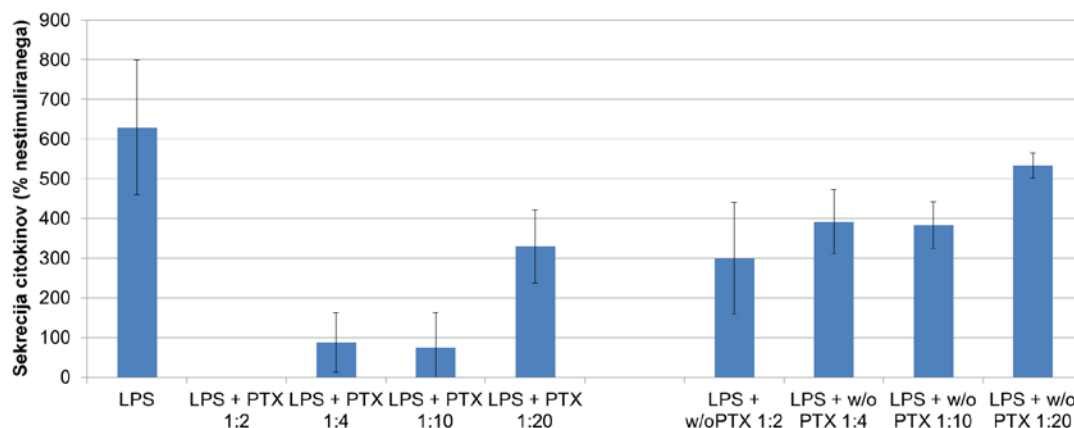
Na **Slika 43** so prikazani rezultati meritve biokompatibilnosti večslojnih polimernih matric z različnimi koncentracijami PTX. Iz rezultatov je razvidno, da tako pri različnih koncentracijah PTX, kot tudi pri različnih časovnih intervalih inkubacije ni moč opaziti citotoksičnega učinka na vzorce človeških fibroblastov.



Slika 43: Prikaz rezultatov biokompatibilnosti večslojnih polimernih matric z različnimi koncentracijami PTX, ter njihov vpliv na rast fibroblastov (204).

3.3.4 Vpliv pripravljenih večslojnih nanofilmov na vnetje inducirano z bakterijskim LPS

Iz rezultatov na **Slika 44** je razvidno da PTX sproščen iz večslojnih matric uspešno zavira sproščanje TNF- α inducirano z dodatkom endotoksina/lipopolisaharda (LPS). Ta učinek je signifikanten do razredčitve vzorcev 1:10. Večslojne matrice brez dodatka PTX zavirajo sproščanje TNF- α inducirano z dodatkom LPS v veliko manjši meri.



Slika 44: Sekretija TNF- α ob dodatku LPS, ter prisotnosti vzorcev z dodatkom PTX (levi diagram) in brez dodatka PTX (desni diagram) (204).

4 Diskusija

V klinični praksi pogosto zasledimo uporabo večslojnih medicinskih oblog, ki so namenjeni oskrbi ran (205). S takimi oblogami lahko namreč kombiniramo različne primarne oz. sekundarne obloge in s tem pripravimo individualni povoj za potrebe bolnika. Ta način oskrbe ran omogoča optimalno delovanje posameznih uporabljenih materialov, iz katerih so posamezni sloji obloge (npr. zagotavljanje vlage, protibakterijsko delovanje, nadzorovano sproščanje zdravilnih učinkovin), s čemer se izboljša potek celjenja ran. Naš namen je bil pripraviti večslojno oblogo, ki na eni strani omogoča nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine, ter na drugi strani, zaradi lastnosti, ki jih imajo izbrani uporabljeni polisaharidi, aktivno vpliva na procese celjenja rane. V ta namen so bili pripravljene dvoslojni ALG in TMC, ki so vsebovali zdravilno učinkovino PTX. Pri obeh polisaharidih gre za polimera, ki sta že uveljavljena kot del medicinskih oblog v oskrbi kroničnih ran (39, 40). Oba materiala sta bila izbrana za pripravo večslojnih nanofilmov, in to predvsem zaradi edinstvenih lastnosti v oskrbi kroničnih ran. Zaradi izmenjave ionov med alginatom in eksudatom pride do tvorbe viskoznega gela, ki spodbuja avtolitično aktivnost rane in s tem dodatno spodbuja proces celjenja (152). Ob tvorbi viskoznega gela, pride tudi do znižanja pH v rani, ki je pomemben faktor v celjenju. Protimikrobno delovanje hitozana, za katerega so najbolj dovzetne Gram pozitivne, pa tudi

Gram negativne bakterije in glive, dodatno dopolnjuje paleta pozitivnih lastnosti (protivnetno delovanje, avtolitično delovanje, znižanje pH) večslojnih materialov v oskrbi kroničnih ran (206).

4.1 Priprava in karakterizacija modelnih polimernih filmov

Razumevanje sestave, površinskih, ter fizikalno-kemijskih lastnosti večslojnih sistemov pripravljenih na 2D substratih, služijo kot osnova za razvoj realnih »3D« sistemov, ki jih kasneje uporabljamo v oskrbi pacientov s kroničnimi ranami, ter tudi v tkivnem inženiringu. V ta namen je bila večslojnim polisaharidnim nanofilmom, ki so bili sestavljeni iz periodično izmenjujočih se slojev TMC in ALG določena debelina, hrapavost, masa, molčljivost in morfologija površine.

Meritve so pokazale, da se debelina sistema povečuje linearno z nanosom vsakega posameznega novega sloja. Enak trend se kaže v hrapavosti površine, ki narašča z vsakim na novo nanešenim slojem (Diagram 1b). Debelina prvega sloja TMC znaša ca. 90 nm (1TMC) in naraste na debelino ca. 280 nm po nanosu treh dvoslojev. Debelina nanosov posameznih slojev TMC ostaja v vsakem dvosloju konstantna (2TMC: 43 nm, 3TMC: 42nm). Nasprotno pride do upada debeline vsakega na novo nanešenega sloja ALG (1ALG: 40 nm, 2ALG: 34 nm, 3ALG: 29 nm). Z vsakim novim nanosom TMC in ALG pride do povišanja enot hrapavosti površine. Po spiranju sistema z vodo, pride do evidentnega znižanja v debelini večslojnih sistemov (24%, t: 220 nm), ter hrapavosti (r: 13,5 nm), kar nakazuje, da s spiranjem odstranimo ves material, ki ni vezan v večslojni sistem in tako pride do nastanka gladkih filmov. Masa posameznih slojev je bila določena s pomočjo QMC-D in je prikazana na **Slika 34c**. Z uporabo Sauerbery-eve enačbe (1), lahko s QCM-D določimo mase suhih in rigidnih slojev, ki so adsorbirani na površino, in sicer na osnovi direktne spremembe v frekvenci po nanosu. Metoda je še posebej primerna, če je sprememba manjša od 2×10^{-6} . Pri naših meritvah je bila ta sprememba za vsak

posamezni sloj $0,22 \pm 0,003 \times 10^{-6}$. Trend linearnega naraščanja, ki je bil opazen pri meritvah debeline in hrapavosti vzorcev, se je tudi pokazal pri meritvi mase vzorcev. Masa prvega sloja (1TMC) znaša ca. $932 \pm 15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Tako kot je prišlo pri drugem in tretjem sloja TMC do upada v debelini posameznega sloja, je tudi pri meritvi mase prišlo do zmanjšanja mase zadnjih dveh slojev TMC. Masa 2TMC in 3TMC je ostala konstantna in znaša $400 \pm 15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, ki predstavlja ca. 55% mase prvega sloja. Trend upadanja debeline in hrapavosti vsakega na novo nanešenega sloja ALG, je bilo moč zaslediti tudi pri meritvi mase posameznih slojev. Po spiranju vzorcev je prišlo do 29% zmanjšanja mase večslojnih sistemov. Iz korelacije rezultatov meritev debeline in hrapavosti slojev s pomočjo profilometrije ter meritev mase s pomočjo QCM-D, je razvidno, da QCM-D predstavlja senzitivno metodo, določanja mase večslojnih polisaharidnih nanoslojev.

Meritev stičnih kotov SCA(H₂O) posameznega sloja TMC in ALG so pokazale pričakovane spremembe v hidrofobnosti/hidrofilnosti posameznih slojev. Tako so meritve za posamezne sloje hidrofobnega TMC pokazale večje stične kote, ter za posamezne sloje hidrofilnega ALG manjše. Z naraščajočimi sloji TMC in ALG meritve SCA(H₂O) nakazujejo »cik-cak« obliko, kar je dodatna potrditev za nanos posameznega nanosloja na modelnem sistemu (**Slika 35**). Po nanosu TMC na površino pride do povečanja stičnega kota na $23.2 \pm 0.7^\circ$ v primerjavi z stičnim kotom površine SiO₂ ($10 \pm 0,2^\circ$). Izmerjeni rezultati sovpadajo z predhodnimi meritvami stičnih kotov TMC vezanega na celulozo ($24 \pm 1^\circ$) (207). Nanos nanosloja ALG privede do zmanjšanja stičnega kota. Ta trend je možno zaslediti v vsakem posameznem dvosloju. Iz rezultatov je razvidno, da v vsakem novem dvosloju pride do povečanja hidrofobnosti posameznega sloja TMC, kar je možno razložiti z naraščajočo hrapavostjo vsakega posameznega sloja TMC. Prvi, ki je opisal vpliv hrapavosti površine na hidrofobne/hidrofilne lastnosti površine je bil Wenzel leta 1936 s pomočjo enačbe (5) (208):

$$\cos\theta_m = r \cos\theta_Y \quad (5)$$

kjer θ_m predstavlja izmerjen stični kot, θ_y je Youngov stični kot in r predstavlja razmerje hrapavosti površine.

Iz enačbe je razvidno, da se ob povečanju hrapavosti površine materiala poveča tudi njegov izmerjeni stični kot. Po spiranju modelnega filma z vodo pride do signifikantnega upada v izmerjenem stičnem kotu ($20,8 \pm 0,1^\circ$) in s tem do povečane hidrofilitnosti sistema. Povečanje hidrofilitnosti modelnega filma lahko razložimo s spremembo sestave filma, zmanjšanje debeline posameznih slojev in zmanjšane hrapavosti površine (**Slika 34**). Kombinacija hidrofobnega/hidrofilnega materiala za oskrbo kroničnih ran predstavlja zanimiv pristop k terapiji kroničnih ran. S pomočjo hidrofilitnega materiala v rani omogočamo zadostno količino vlage, kar ima pozitiven efekt na potek celjenja in pozitiven vpliv na avtolitično aktivnost v rani. Za hidrofilitne material je značilno, da imajo protimikrobno delovanje, saj njihova hidrofilitna površina omogoča pospešeno adhezijo bakterij na površino in s tem odstranjevanje bakterij iz rane. Povečana hidrofilitnost materialov, ki jih uporabljamo v oskrbi kroničnih ran, nam dodatno omogoča absorpcijo odvečnega eksudata. Uspešna absorpcija eksudata je ena najpomembnejših lastnosti, ki jih morajo zagotoviti materiali v moderni oskrbi ran (209).

Rezultati meritev ATR-IR modelnih filmov brez PTX so prikazani na **Slika 36**. Iz meritev spektra so razvidni trije glavni vrhovi, med katerimi sta dva značilna za TMC (**1**~1564 cm^{-1} za N-H, in **2**~1479 cm^{-1} za C-H vibracije) (210) in eden, ki je značilen za ALG (**3**~1024 cm^{-1} za C-O vibracije) (211). Iz karakterističnih ojačitev intenzitete meritev IR spektra, ki nakazujejo povečano koncentracijo posameznih polimerov, lahko sklepamo, da je prišlo do uspešnega nanosa izmenjujočih se TMC in ALG slojev. Prav tako je pomembno spoznanje, da rezultati meritev ATR-IR spektra sovpadajo z rezultati meritev stičnih kotov, QCM-D in profilometrije, kjer se je uspešnost nanosa posameznih slojev kazala kot sprememba v hidrofilitnosti/hidrofobnosti, masi oz. hrapavosti. Dodatek PTX v večslojni sistem je povzročil karakteristične spremembe v IR spektrih. Iz **Slika 36** je razvidno, da je možno spremembe IR

spektra, ki so značilne za PTX (1701 in 1658 cm^{-1} za $-\text{CO}$, in amide $-\text{CO}$) (212) zaslediti v vseh vzorcih. Pomembno je tudi spoznanje, da povečanje koncentracije PTX v večslojnem sistemu vodi do povečanja signala, kar dodatno potrjuje uspešnost dodatka različnih koncentracij PTX v večslojnem sistemu. Spektralna analiza je bila izvedena tudi za alginatno kopreno. Tudi tukaj je bilo moč zaslediti spremembe spektra, ki nakazujejo uspešnost vgradnje PTX v večslojnem sistemu, ki je bil pripravljen na alginatni kopreni.

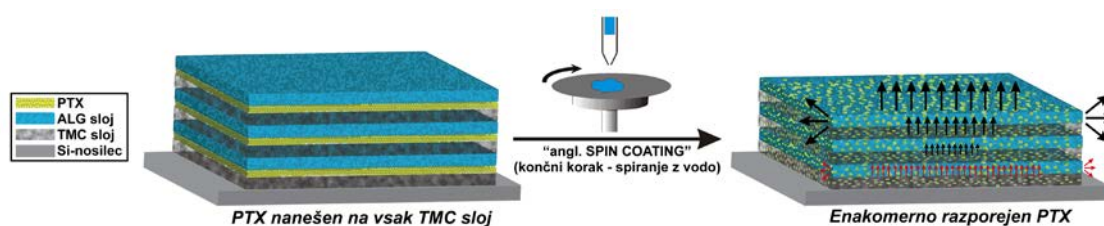
Rezultati meritev hrapavosti površine večslojnih nanofilmov z vključenim PTX s pomočjo AFM so prikazani na **Slika 37**. Dodatek PTX v večslojne nanofilme, ne glede na koncentracijo, povzroči zmanjšanje hrapavosti površine za okoli 2 nm v primerjavi z večslojnimi filmi brez PTX (RMS: 6 nm) (ni prikazano na **Slika 37**). Rezultati nakazujejo, da že nizke koncentracije PTX vplivajo na karakteristiko večslojnih filmov (morfologija in hrapavost površine). Ne glede na to, da ne gre za signifikantne spremembe, razen pri najnižji koncentraciji PTX, pa rezultati nakazujejo, da praktično vsaka sprememba v koncentraciji povzroči edinstveno spremembo v morfologiji filmov. Spremembe morfologije pri višji koncentraciji PTX nakazujejo, da pride do gostejšega »pakiranja« in drugačne organizacije molekul PTX v posameznih slojih večslojnega nanofilma. Vzorci z najvišjo koncentracijo PTX (20 mg/ml) dodatno kažejo edinstvene morfološke lastnosti, ki nakazujejo, da pride do tvorbe večjih agregatov PTX. Glede na to, da se spremembe nahajajo v nano območju, je možno sklepati, da te spremembe ne vplivajo na končno morfologijo filma. Glede na opazovane spremembe v morfologiji vzorcev, ki nastanejo kot posledica povečane koncentracije PTX, lahko sklepamo, da dodatno povečanje koncentracije, lahko vodi v povečanje agregatov PTX v posameznih slojih, kar v končni fazi lahko signifikantno vpliva na stabilnost večslojnega sistema. Edinstvene morfološke značilnosti, ki so prisotne tako v modelnih filmih z, kot tudi v modelnih filmih brez dodanega PTX, so nano pore, ki imajo pomemben vpliv na lastnosti takšnega materiala in hkrati omogočajo dodatno stopnja nadzora sproščanja.

4.2 Nadzorovano sproščanje PTX

Iz rezultatov *in vitro* sproščanja (Slika 38) je razvidno, da pripravljene večslojni nanofilmi omogočajo spreminjanje koncentracije vgrajenega PTX v širšem koncentracijskem območju, in s tem tudi prilagoditev terapije za posameznega pacienta. Večslojni sistem omogoča nadzorovano sproščanje zdravila preko petih dni, kar signifikantno znižuje potrebe po menjavi medicinskih oblog v oskrbi rane. Tak pristop k oskrbi kroničnih ran, lahko vodi torej tudi do znižanja skupnih stroškov v oskrbi teh pacientov. V namen testiranja klinične uporabnosti takšnega sistema, so bili večslojni nanofilmi pripravljeni tudi na netkani alginatni kopreni (SeaSorb, Coloplast), ki se pogosto uporablja v oskrbi pacientov s kroničnimi ranami, ter primerjani z rezultati, ki smo jih dobili z modelnimi nanofilmi (pripravljene na Si-ploščah). Rezultati *in vitro* so prikazani na Slika 38. Iz rezultatov lahko razberemo štiri pomembne aspekte, ki so podrobneje razloženi v nadaljevanju.

4.2.1 Kumulativna masa sproščenega PTX kot funkcija časa

Slika 38a prikazuje kumulativno količino (mg/cm^2) sproščenega PTX kot funkcijo časa. Iz rezultatov je razviden dvostopenjski profil sproščanja PTX. Dodatno je razvidno, da se večja količina zdravila sprosti v prvih minutah po začetku. Profili sproščanja PTX nakazujejo, da je velika količina zdravila prosto nanešena med posamezne sloje brez pomembnejših interakcij z polisaharidnimi sloji. Naša predpostavka je tudi, da spiranje vzorca z vodo, čemur sledi ponovno »spin-coating« vodi do homogene razporeditve PTX med posameznimi sloji (Slika 45).



Slika 45: Shematski prikaz končnega koraka priprave večslojnega filma in njegov vpliv na porazdelitev PTX znotraj slojev. Črne puščice predstavljajo hitro sproščanje PTX, ki ne

vstopi v interakcije z matičnimi polisaharidi, rdeče puščice prikazujejo kontrolirano sproščanje po 360min (204).

Delež PTX, ki je vgrajen v večslojni nanofilm na tak način vodi do hitrega sproščanja (kar je vidno pri vseh vzorcih v prvih nekaj minutah). Tako količina, kot tudi čas, v katerem je sproščen ta del zdravila, je sorazmerna z koncentracijo PTX, ki je bila uporabljena za pripravo vzorcev. Rezultati kažejo, da višja koncentracija vgrajenega PTX vodi do večje količine hitro sproščenega PTX v krajši časovni enoti. Prav tako pa pri vzorcih z večjo koncentracijo PTX pride do večjega sovpadanja profilov začetnega hitrega sproščanja. Začetnemu hitremu sproščanju sledi faza s počasnejšim, nadzorovanim sproščanjem. Mehanizem sproščanja PTX v tej fazi je v veliki meri odvisen od razlike med koncentracijskim gradientom PTX znotraj večslojnega materiala in okolico. Posledično pride najprej do difuzije zdravila iz notranjosti večslojnega sistema, do površine nanofilma, medtem ko v nadaljevanju poteka difuzija PTX v okolico. Ta del PTX je najverjetneje v veliki meri v interakciji z polisaharidi v večslojnem sistemu, in sicer preko vodikovih vezi (karboksilne in aminske skupine PTX, hidroksilne in karboksilne skupine ALG, hidroksilne in aminske skupine TMC). Manjši delež k celotni sproščeni masi PTX, pa doprinese PTX, ki leži v najnižjih slojih večslojnega sistema. Ta delež PTX mora preden se lahko sprost v okolico penetrirati vse višje-ležeče polisaharidne sloje ali pa se sprost na robovih večslojnega sistema (**Slika 45**).

Dodatno lahko iz dobljenih rezultatov sproščene kumulativne mase PTX razberemo dve pomembni karakteristiki našega sistema. Tako lahko na osnovi rezultatov ugotovimo, da povečanje koncentracije vgrajenega PTX v vzorcu vodi do povečane količine sproščenega PTX, brez da bi s tem vplivali na kinetiko sproščanja. To dejstvo je izrednega pomena, saj nam omogoča, da lahko z prilagoditvijo koncentracije PTX v raztopini med pripravo vzorca, vplivamo na končno količino sproščenega PTX, in torej tudi dozo PTX v okviru terapije.

Eden glavnih ciljev te študije je bil pripraviti material, ki ga je moč uporabiti v klinični praksi in testirati njegove lastnosti sproščanja PTX. V ta namen je bil enak večslojni model, ki je bil

pripravljen na Si-nosilcu (modelni nanofilm), pripravljen na alginatni kopreni, ki se že uporablja v klinični praksi. Na slednjo smo v ta namen vgradili najvišjo koncentracijo PTX (20mg/ml, **Slika 38**), ki je bila uporabljena v modelnem nanofilmu. Tako smo lahko primerjali kinetiko sproščanja iz modelnega in realnega sistema. Profila sproščanja iz realnega sistema, kot tudi iz modelnega filma, sta skoraj identična, kar je delno celo proti našim pričakovanjem, saj smo zaradi fizikalno-kemijskih ter morfoloških razlik med substratom za modelne nanofilme in realnim, precejšnja razlika. Razlika med vzorcema se nanaša samo na končno sproščeno maso PTX. Sproščena končna masa realnega sistema (pripravljen s raztopino PTX v koncentraciji 20mg/ml), sovpada s sproščeno maso modelnega filma, ki je bil pripravljen s raztopino PTX v koncentraciji 15mg/ml. Naše razlaga, zakaj pride do te diskrepance v količini končne sproščene mase PTX, je drugačna razporeditev PTX po končnem spiranju vzorcev. Medtem, ko se lahko v alginatni kopreni PTX razporedi tako v večslojnem sistemu, kot tudi v alginatni kopreni, pa pride na modelnem nanofilmu do razporeditve PTX samo znotraj večslojnega sistema, kar lahko pojasni razliko v končni količini sproščene mase PTX.

4.2.2 Analiza vpliva inkorporirane koncentracije PTX na sproščeno količino PTX

Z namenom evaluacije možnega nadzora nad sproščeno maso PTX v posameznih vzorcih preko spremembe koncentracije PTX v raztopini, nanešene na vzorec, smo dobljene rezultate sproščene mase PTX narisali v nov diagram, in sicer pri dveh različnih časovnih točkah. Dva izbrana časa sta bila 6 ur in 5 dni, dobljene rezultate sproščene mase PTX smo narisali kot funkcijo začetne koncentracije vgrajenega PTX (v območju 1mg/ml do 20mg/ml). **Slika 38b** prikazuje te rezultate. Ker je bil iz tako narisanih rezultatov za izbrane časovne točke razviden linearni trend, smo to linearnost tudi preverili. Na podlagi dobljenih vrednosti R^2 , ki sta bili ~99% in ~97%, smo pokazali, da lahko s pomočjo prilagoditve koncentracije PTX v raztopini za pripravo vzorcev, na sorazmeren način nadzorujemo tudi maso sproščenega zdravila. Takšen preprost način nadzora sproščene končne mase aktivne substance lahko v prihodnje olajša delo

v klinični praksi in dodatno izboljša individualizacijo terapije za posameznega pacienta. Prav tako nam takšen enostaven pristop k modifikaciji količine sproščenega zdravila omogoča enostavnejšo prilagoditev terapije kroničnih ran v različnih fazah celjenja.

4.2.3 Odstotek sproščenega PTX kot funkcija časa.

Slika 38c prikazuje rezultate *in vitro* testiranja sproščanja v obliki odstotka sproščenega PTX kot funkcijo časa. Delež sproščenega PTX je bil izračunan tako, da smo za absolutno maso PTX uporabili maso, ki je bila sproščena po 6 dneh (čas ko pride do stabilizacije koncentracije PTX v raztopini). Tudi ti rezultati potrjujejo, da lahko z variacijo količine vgrajenega PTX vplivamo na končno maso sproščenega zdravila. Dodatno pa lahko iz teh razberemo, da ne glede na količino vgrajenega PTX, pride do sprostitve celotne količine zdravila pri vseh vzorcih v enakem časovnem območju. Tako je razvidno, da se ne glede na količino zdravila v večslojnim sistemu, sprosti celotna masa v konstantnem časovnem obdobju, kar je izrednega pomena pri individualizaciji terapije. Prednost lokalnega načina zdravljenja z PTX predstavlja možnost doseganja visoke koncentracije aktivne učinkovine na željenem mestu delovanja, kar ima za posledico učinkovitejšo in ciljno protivnetno delovanje, kjer je to potrebno. S takim načinom dajanja zdravila se lahko izognemo njegovemu metabolizmu, do katerega pride pri *per os* dajanju in ima za posledico zelo kratko razpolovno dobo PTX v telesu (45-60min), ter posledično doseže tudi nizko koncentracijo na periferiji. Dodatna prednost lokalnega zdravljenja predstavlja zmanjšanje neželenih učinkov zdravila ter možnost kombinacije zdravljenja z antikoagulantnim zdravljenjem oz. drugimi inhibitorji trombocitne agregacije, brez da bi pri tem povečali nevarnost sistemskih krvavitev. V nadaljnjem zdravljenju, kadar je dosežena želena inhibicija vnetja, lahko prilagodimo terapijo in znižamo koncentracijo sproščenega PTX, tako da znižamo koncentracijo vgrajenega zdravila brez da bi s tem vplivali na kinetiko sproščanja.

4.2.4 Evaluacija mehanizmov sproščanja PTX

Eden od namenov študije je bilo razumeti mehanizem sproščanja PTX iz pripravljenih večslojnih nanofilmov. V ta namen so bile uporabljeni različni uveljavljeni modeli, s katerimi smo skušali razložiti kinetiko sproščanja (213). Ne glede na relativno preprostost pripravljenih veslojnih nanofilmov, pa kinetike sproščanja ni bilo možno opisati z enim samim modelom. V ta namen so bili dobljeni profili sproščanja razdeljeni v dva dela, in sicer v začetno hitro sproščanje in kasnejše konstantno sproščanje. Za opis kinetike sproščanja sta bila uporabljena modela *ničelne kinetike* in *Korrsmayer-Peppasova* enačba. Slednja je primerna za opis kinetike sproščanja substanc iz različnih oblik polimernih struktur, ki omogočajo nadzorovano sproščanje zdravila. Omejitev uporabe tega modela je njegova primernost za profile sproščanja, kjer koncentracija sproščenega zdravila še ni presegla 60% celotne vgrajene mase (214). Dodatna sprememba te enačbe vsebuje tudi koeficient, ki upošteva morebitno hitro sproščanje (angl. »burst release«), zaradi česar je še posebej primerna tudi za opis kinetike iz naših nanofilmov. Drugi del sproščanja, ki poteka v linearni obliki, se najlažje opiše z kinetiko ničelnega reda. Linearni način sproščanja zdravila ni odvisen od koncentracije zdravila v vzorcu. Za začetno hitro sproščanje zdravila iz večslojnega nanofilma je odgovorna difuzija zdravila iz filma v okolico. Po izenačitvi koncentracijskega gradienta med okolico in nanofilmom pride zaradi preostanka zdravila, ki je vezan v modelnem filmu in se lahko tako sprošča veliko počasneje, do linearnega sproščanja zdravila (**Slika 38e** in **f**). Konstanto sproščanje omogoča vzdrževanje protivnetnega učinka, ki smo ga dosegli z hitrim začetnim sproščanjem in s tem lahko izboljša celjenje kronične venozne rane.

Izračuni 1. odvodov rezultatov *in vitro* sproščanja so dodatno potrdili našo hipotezo, da lahko profil sproščenega zdravila razdelimo na dva dela. Po 360 minutah sproščanja je pri vseh vzorcih možno ločiti med prej opisanimi modeloma sproščanja, pri katerem pride do spremembe v izračunanem profilu (**Slika 38d**).

V namen izračuna kinetike sproščanja PTX s prej opisanima formulama je bilo potrebno pridobljene rezultate sproščene PTX pretvoriti. Za uporabo kinetike *ničelnega reda*, je bilo potrebno izračunati nove vrednosti sproščene mase na osnovi rezultatov kumulativne sproščene mase (v našem primeru celotne sproščene mase PTX do določene časovne točke). Na drugi strani pa je za uporabo *Korsmayer-Peppasove* enačbe potrebno izračunati samo delež PTX, ki se je sprostil v določeni časovni enoti (v našem primeru delež sproščene PTX v točki t_x) ter izvesti primerjavo tega deleža z končno sproščeno maso v točki $t = 8640\text{min}$. Tako pridobljeni rezultati so prikazani v **Tabela 3**, ki prikazuje R^2 vrednosti posameznih vzorcev v določenem časovnem obdobju.

Kot je že bilo omenjeno v kratki predstavitvi rezultatov AFM, igrajo površinske lastnosti pomembno vlogo v farmakokinetiki sproščanja zdravila iz vzorcev. Ne glede na to, da se posamezni vzorci med seboj razlikujejo v nano področju, pa je pri vseh vzorcih moč opaziti poroznost na površini, ki dodatno izboljša karakteristike sproščanja zdravila. Nano pore na površini vzorcev omogočajo na eni strani učinkovito močenje materiala (torej dostop medija do molekul PTX), na drugi pa tudi sproščanje zdravila, ki se nahaja v globljih slojih vzorcev. Analize vzorcev in študije sproščanja zdravila nakazujejo, da je zdravilo enakomerno porazdeljeno po celotni površini posameznih slojev v vzorcu. Ta lastnost je izrednega pomena, saj zagotavlja, da med razgradnjo vzorca (do katerega vsaj delno lahko pride po 6 dneh uporabe), pride do enakomernega sproščanja zdravila. V nasprotnem primeru, lahko kopičenje zdravila v posameznih slojih vodi do lokalnega povečanja koncentracije zdravila, ter do neučinkovitega zdravljenja ali pa celo do neželenih učinkov.

4.2.5 Povezanost/prenosljivost rezultatov *in vitro* sproščanja PTX iz večslojnih nanofilmov v klinično prakso

Študija »realnega sistema«, kjer je bil večslojni nanofilm nanešen na alginatno kopreno, je pokazala, da je možno iz materiala, ki se trenutno pogosto uporablja v klinični praksi, pripraviti

sistem, ki omogoča nadzorovano sproščanje PTX. Profil sproščanja zdravila je sestavljen iz dveh faz, ki povečajo učinkovitost zdravljenja kroničnih venoznih razjed. Začetna hitra faza sproščanja nam omogoča hitro doseganje želenih koncentracij zdravilne učinkovine v rani, ki zagotavlja učinkovito inhibicijo vnetja preko prej opisanih mehanizmov delovanja PTX. V drugi fazi sproščanja, ki je veliko počasnejša, je moč doseči vzdrževalno dozo PTX, ki zagotavlja inhibicijo vnetja med časom med posameznimi povoji. Dodaten doprinos tega sistema je, da omogoča nadzorovano sproščanje preko petih dni, kar predstavlja dodatno možnost za znižanje stroškov zdravljenja, saj lahko signifikantno podaljšamo čas med posameznimi menjavami povoja.

Pomembno spoznanje je tudi, da večslojni nanofilm, ki je bil nanešen na alginatno kopreno, omogoča nanos terapevtske koncentracije PTX, kar je razvidno iz **Tabela 4**, ki predstavlja izračun mase PTX, ki se nanaša na alginatni kopreni velikosti, ki se pogosto uporablja v klinični praksi.

4.3 Celični testi

In vitro metode testiranja, ki temeljijo na različnih človeških kožnih celicah (keratinocitih, fibroblastih, melanocitih, ter različnih imunskih celicah) predstavljajo zelo uporabno orodje za testiranje farmakokinetike, biokompatibilnosti, ter delovanja novih materialov namenjenih za oskrbo kroničnih ran. Pomembna prednost teh metod pred testiranjem na živalih ali modificiranih karcinomskih celicah, je njihova relativno enostavna izvedba, nizki stroški, ter ponovljivost meritev. Tako nam te metode omogočajo hitro testiranje novih materialov in nam zaradi specifičnosti posameznih modelov omogočajo boljše razumevanje posameznih biokemijskih procesov, ki jih izzovejo novi terapevtiki na izbranem tipu celic. Po našem mnenju so razlike med človeškimi in živalskimi celicami prevelike, da bi nam živalski modeli lahko omogočali relevantna sklepanja na učinkovitost novih pristopov v terapiji kroničnih ran. Prav zaradi teh

lastnosti in prepričanja, da razvoj novih celičnih modelov v namen testiranja modernih medicinskih oblog v zdravljenju kroničnih ran predstavlja prihodnost, smo tudi mi del testiranj efektivnosti in varnosti izvedli na človeških kožnih celicah. Naše testiranje na celičnih modelih je bilo sestavljeno iz dveh pomembnih sklopov. V prvem sklopu smo izvedeli testiranje biokompatibilnosti in viabilnosti pripravljenih vzorcev. S to študijo smo želeli dokazati, da med razgradnjo vzorcev ne pride do sproščanja toksičnih razgradnih produktov, ki bi imeli negativni vpliv na rast celic. Prav tako smo skušali dokazati, da ne pride do morebitnih nenadzorovanih izpustov večjih koncentracijah PTX, kar bi prav tako lahko vodilo do toksičnih učinkov na celice. V drugem delo testiranja smo se osredotočili na testiranje protivnetnega učinka PTX na monocite stimulirane z znanim modulatorjev vnetnega odziva, bakterijskim LPS.

4.3.1 Vpliv vzorcev večslojnih matric z in brez dodatka PTX na viabilnost fibroblastov

Kot pričakovano, pri izpostavitvi celic vzorcem z dodanim PTX, kot tudi pri vzorcih brez dodatka PTX, ni prišlo do povečane proliferacije in do povečane gostote celic. PTX, kot ne-selektivni inhibitor fosfodiesteraze, nima direktnega vpliva na rast celic.

Naša osnovna hipoteza je bila, da inhibicija kroničnega vnetja in s tem povezanih patoloških procesov, vodi do izboljšanja v celjenju ran, ter da PTX nima direktnega vpliva na rast fibroblastov. Spoznanje, da ne pride do upada v gostoti celic ali do spremembe v njihovih morfoloških lastnostih, ki bi govorile v prid toksičnosti pripravljenih večslojnih matric, je prav tako pozitiven rezultat in dokaz (vsaj *in vitro*) varnosti pripravljenih večslojnih nanofilmov s PTX. Gostota celic ostaja konstantna pri vzorcih z dodanim PTX, pri različnih stopnjah razredčitve, kar nakazuje, da nobena izmed uporabljenih koncentracij PTX ne presega toksičnih vrednosti.

S pomočjo določanja koncentracije ATP, lahko sklepamo na viabilnost celic. Meritve so pokazale, da v prvih 24 urah pride do signifikantnega povečanja v koncentracijah intracelularnega ATP, ki pa kasneje upade. Ta zanimiv preobrat je možno razložiti preko

mehanizma delovanja PTX na mitohondrije. PTX ima namreč inhibitorni vpliv na oksidativni stres, in sicer preko indukcije superoksidne dismutaze (SOD), preko direktne vezave prostih radikalov, ter preko inhibicije transkripcijskih faktorjev za NF- κ B in AP-1, ki vplivajo na regulacijo delovanja mitohondrijev (215). Kot soroden primer, so npr. Feyli in sod. poročali o povečanju motilitete spermatoocitov ob predhodni izpostavitvi celic PTX, pri čemer so potrdili tudi povečano koncentracijo ATP (216). Daljša izpostavljenost PTXu pa lahko po drugi strani privede tudi do upada koncentracije ATP. Tako je iz literature razvidno, da ob daljši izpostavljenosti PTX v koncentraciji 50 μ M in več, pride do upada v koncentraciji ATP v hepatocitih (217). Glede na to, da večslojne matrice brez dodatka PTX niso imele negativnega vpliva na gostoto celic, kot tudi ne na koncentracijo ATP v celicah in glede na dejstvo, da je PTX minimalno citotoksičen šele pri koncentracijah nad 2mM (218), lahko diskrepanco med rezultati med svetlobno mikroskopijo, ter koncentracijo znotrajceličnega ATP, razložimo z delovanjem PTX na nivo intracelularnega ATP, ki je v literaturi dobro opisano. Tako lahko torej tudi izključimo toksično delovanje PTX na fibroblaste.

4.3.2 Adhezija in proliferacija fibroblastov v direktnem kontaktu z večslojnimi nanofilmi

Iz **Slika 42** je razvidno, da fibroblasti tvorijo konfluentni monosloj na stekleni površini, medtem ko tega na večslojni matrici z dodatkom PTX in brez dodatka PTX ni videti. V obeh primerih je prišlo do sprememb v morfologiji celic, ter to tvorbe klasrov, ki nakazujejo, da v obeh primerih ni prišlo do pritrditve fibroblastov na površino. Za primerjavo oz. razlago omenjenega navajamo nekaj literaturnih virov. Za hitozanske membrane je bilo kot primer pokazano, da le te potrebujejo dodatne modifikacije površine, da bi omogočile pritrditev celic (219). Prav tako je znano, da fibroblasti priraščajo na hitozan slabše kot pa druge vrste celic (220). Podobno velja za alginat. V prejšnjih študijah je bilo pokazano, da lahko zaradi kationske izmenjave (Na^+ iz rastnega medija za Ca^+ iz alginata) pride do raztapljanja alginata v rastnem mediju, kar vodi

v transformacijo materiala oz. celo degradacijo alginata (221). Glede na to, da fibroblasti za rast nujno potrebujejo stik s površino, dobljeni rezultati niso presenetljivi (222). Glede na to, da alginat in hitozan v večslojnih nanofilmih služita samo kot nosilec za PTX in ne kot matrica za vraščanje celic je pokazan proti-adhezivni učinek celo zaželen. S tem lahko zagotovimo, da ne pride do preraščanja celic v oblogo na rani, kar nam omogoča lažjo menjavo obloge, kot tudi zmanjšanje bolečine pri pacientih ob tej menjavi.

4.3.3 Testiranje biokompatibilnosti na kulturi človeških kožnih fibroblastov

Testiranje biokompatibilnosti je bilo izvedeno tako, da so bili vzorci z željeno koncentracijo PTX in ob določenem časovnem intervalu sproščanja, odpipetirani med testiranjem *in-vitro* sproščanja PTX. Željena koncentracija PTX je bila nato dodana celičnemu mediju v naslednjem koraku dodana na fibroblaste. Kontrolni vzorec je bil samo medij (ADMEM z dodatkom 5 ut.% FBS), pripravljen na enak način kot vzorci, a brez dodanega PTX. Z odpipetiranjem vzorcev med testiranjem *in-vitro* sproščanja PTX smo zagotovili, da zraven želene koncentracije učinkovine, odpipetiramo tudi produkte, ki so lahko nastali med potencialno razgradnjo večslojnih nanofilmov. Rezultati tega testiranja so prikazani na **Slika 43**. Iz rezultatov je razvidno, da PTX nima negativnega vpliva na rast fibroblastov ter da naraščajoča koncentracija PTX nima toksičnega učinka na fibroblaste. Tako lahko zaključimo, da se znotraj terapevtske koncentracije, ki jo lahko apliciramo iz večslojnega sistema, nahajamo znotraj varne koncentracije PTX. Iz rezultatov je še razvidno, da so pripravljene vzorci biokompatibilni ne glede na uporabljeno koncentracijo PTX in da med morebitno razgradnjo ALG in TMC (v času sproščanja preko 6ih dni) ne pride do sproščanja toksičnih razgradnih produktov, ki bi imeli negativni vpliv na rast celic.

4.3.4 Vpliv na inflamacijo inducirano z LPSom

Za konec je bilo potrebno potrditi še del hipoteze, ki se je nanašal na želeni protivnetni učinek pripravljenih in s PTX polnjenih večslojnih nanofilmov. Da bi v *in vitro* okolju lahko simulirali vnetje ter tako ovrednotili potencialen protivnetni učinek, je bilo izvedeno testiranje s človeškimi monociti (celicami imunskega sistema), ki so bili stimulirani z bakterijskim LPS. Za določanje stopnje vnetja oz. aktivnosti monocitov je bila uporabljeno določanje koncentracije sproščenega TNF- α . TNF- α predstavlja enega centralnih citokinov v regulaciji vnetja. Njegov vpliv v procesu celjenja kroničnih venoznih razjed potrjuje med drugim tudi dejstvo, da je pri pacientih, pri katerih je prišlo s pomočjo kompresijske terapije do znižanja koncentracije TNF- α , moč opaziti izboljšano celjenje ran (223).

Iz rezultatov tega testa sta razvidna dva trenda. Pokazano je bilo, da je za doseganje protivnetnega učinka potrebno doseči minimalno koncentracijo, ki zagotavlja inhibicijo vnetja. Čeprav je ta rezultat bil pričakovanj, je vseeno potrdil primernost zasnove eksperimenta. Nadalje je iz rezultatov razvidno, da je učinek PTX izrazitejši pri višjih koncentracijah. Obe spoznanji govorita v prid lokalni aplikaciji PTX, saj nam le-ta zagotavlja zadostno koncentracijo PTX v kronični razjedi. Kot že večkrat omenjeno lahko s tem pristopom hkrati zaobidemo tudi številne neželene učinke, ki so lahko posledica povišanih doz *per os* dajanja PTX. Pomemben rezultat je še, da lahko s spremembo koncentracije PTX nadzorujemo stopnjo inhibicije monocitov. To spoznanje je še posebej pomembno, saj nam omogoča individualizacijo terapije za posameznega pacienta.

Končno je zanimivo tudi spoznanje, da imajo vzorci brez dodanega PTX že sami po sebi blago protivnetno delovanje. Sicer je to delovanje veliko manjše, kot pri dodatku PTX, vendar je tudi to spoznanje pomembno v oskrbi pacientov s kroničnimi ranami. Tako lahko iz dobljenih rezultatov sklepamo, da lahko z materiali, ki jih trenutno uporabljamo v oskrbi pacientov s kroničnimi ranami, v določeni meri vplivamo na vnetne procese, ki so v veliki meri odgovorni,

za nastanek kroničnih ran. Kot že opisano v primeru PTX, je tudi ta efekt odvisen od koncentracije obeh polisaharidov v raztopini.

5 Zaključek

V tej študiji so bili pripravljene modelni in »realni« večslojni nanofilmi na osnovi dveh biokompatibilnih polisaharidov (alginata - ALG in trimetilhitozana - TMC) in dokazano učinkovitega protivnetnega zdravila (pentoksifilin - PTX). S pomočjo kemijskih, fizikalnih in funkcionalnih metod testiranja je bil pokazan potencial pripravljene formulacije za pripravo medicinskih oblog za oskrbo kroničnih ran. Zaradi dejstva, da je aplikacija PTX *per os* v številnih študijah pokazala pozitiven učinek na potek celjenja kroničnih ran, verjamemo, da lahko lokalna nadzorovana aplikacija te učinkovine dodatno izboljša celjenje. Pripravljene večslojni nanofilmi (in medicinske obloge na njihovi osnovi) omogočajo individualni pristop k zdravljenju pacientov s kroničnimi ranami, saj lahko z prilagoditvijo koncentracije PTX, modeliramo protivnetni učinek. Dodatno lahko zaključimo, da PTX znotraj terapevtske koncentracije, ki je nanešena na oblogo, nima toksičnega učinka, ter hkrati omogoča zadostno inhibicijo delovanja monocitov, kar so zelo obetajoči rezultati za prihodnost razvoja sorodnih medicinskih oblog. Edinstvene kemijske lastnosti večslojnih nanofilmov pa imajo dodaten pozitiven vpliv na potek celjenja. Protiadhezivne lastnosti površine teh omogočajo zmanjšanje bolečin ob menjavi medicinskih oblog in s tem dodatno prispevajo k kvaliteti življenja pacientov s kroničnimi ranami.

6 LITERATURA

1. Kahle B, Hermanns HJ, Gallenkemper G. Evidence-based treatment of chronic leg ulcers. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(14):231-7.
2. Augustin M, Brocatti LK, Rustenbach SJ, Schäfer I, Herberger K. Cost-of-illness of leg ulcers in the community. *Int Wound J.* 2014;11(3):283-92.
3. Purwins S, Herberger K, Debus ES, Rustenbach SJ, Pelzer P, Rabe E, et al. Cost-of-illness of chronic leg ulcers in Germany. *Int Wound J.* 2010;7(2):97-102.
4. Ruckley CV. Socioeconomic impact of chronic venous insufficiency and leg ulcers. *Angiology.* 1997;48(1):67-9.
5. Sieggreen MY, Maklebust J. Debridement: choices and challenges. *Adv Wound Care.* 1997;10(2):32-7.
6. Kolluri R. Management of venous ulcers. *Tech Vasc Interv Radiol.* 2014;17(2):132-8.
7. Alavi A, Sibbald RG, Phillips TJ, Miller OF, Margolis DJ, Marston W, et al. What's new: Management of venous leg ulcers: Treating venous leg ulcers. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2016;74(4):643-64; quiz 65-6.
8. <http://www.smith-nephew.com/key-products/advanced-wound-management/wound-therapy-areas/compression-therapy/>.
9. Nagaoka T, Kaburagi Y, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Steeber DA, et al. Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression. *The American journal of pathology.* 2000;157(1):237-47.
10. Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol.* 1990;136(6):1235-46.
11. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *The American journal of pathology.* 1975;78(1):71-100.
12. Hubner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fassler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine.* 1996;8(7):548-56.
13. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. *J Vasc Surg.* 2009;49(4):1013-20.
14. Banno T, Adachi M, Mukkamala L, Blumenberg M. Unique keratinocyte-specific effects of interferon-gamma that protect skin from viruses, identified using transcriptional profiling. *Antivir Ther.* 2003;8(6):541-54.

15. Falanga V. Classifications for wound bed preparation and stimulation of chronic wounds. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2000;8(5):347-52.
16. Lebrun E, Kirsner RS. Frequent debridement for healing of chronic wounds. JAMA dermatology. 2013;149(9):1059.
17. Wilcox JR, Carter MJ, Covington S. Frequency of debridements and time to heal: a retrospective cohort study of 312 744 wounds. JAMA dermatology. 2013;149(9):1050-8.
18. Strohal R, Assenheimer B, Augustin M, Hämmerle G, Läuchli S, Pundt B, et al. [Wound management with enzyme alginogels : Expert consensus]. Hautarzt. 2016.
19. Haemmerle G, Duelli H, Abel M, Strohal R. The wound debrider: a new monofilament fibre technology. Br J Nurs. 2011;20(6):S35-6, S8, S40-2.
20. Powers JG, Higham C, Broussard K, Phillips TJ. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. Journal of the American Academy of Dermatology. 2016;74(4):607-25.
21. Williams D, Enoch S, Miller D, Harris K, Price P, Harding KG. Effect of sharp debridement using curette on recalcitrant nonhealing venous leg ulcers: a concurrently controlled, prospective cohort study. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2005;13(2):131-7.
22. Lebrun E, Tomic-Canic M, Kirsner RS. The role of surgical debridement in healing of diabetic foot ulcers. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2010;18(5):433-8.
23. Cardinal M, Eisenbud DE, Armstrong DG, Zelen C, Driver V, Attinger C, et al. Serial surgical debridement: a retrospective study on clinical outcomes in chronic lower extremity wounds. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2009;17(3):306-11.
24. Eaglstein WH. Moist wound healing with occlusive dressings: a clinical focus. Dermatol Surg. 2001;27(2):175-81.
25. Ramundo J, Gray M. Enzymatic wound debridement. J Wound Ostomy Continence Nurs. 2008;35(3):273-80.
26. Rao DB, Sane PG, Georgiev EL. Collagenase in the treatment of dermal and decubitus ulcers. Journal of the American Geriatrics Society. 1975;23(1):22-30.
27. Demidova-Rice TN, Geevarghese A, Herman IM. Bioactive peptides derived from vascular endothelial cell extracellular matrices promote microvascular morphogenesis and

wound healing in vitro. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2011;19(1):59-70.

28. Shi L, Ermis R, Lam K, Cowart J, Attar P, Aust D. Study on the debridement efficacy of formulated enzymatic wound debriding agents by in vitro assessment using artificial wound eschar and by an in vivo pig model. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2009;17(6):853-62.

29. Tallis A, Motley TA, Wunderlich RP, Dickerson JE, Waycaster C, Slade HB, et al. Clinical and economic assessment of diabetic foot ulcer debridement with collagenase: results of a randomized controlled study. Clin Ther. 2013;35(11):1805-20.

30. Mudge E, Price P, Walkley N, Neal W, Harding KG. A randomized controlled trial of larval therapy for the debridement of leg ulcers: results of a multicenter, randomized, controlled, open, observer blind, parallel group study. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2014;22(1):43-51.

31. Dumville JC, Worthy G, Soares MO, Bland JM, Cullum N, Dowson C, et al. VenUS II: a randomised controlled trial of larval therapy in the management of leg ulcers. Health technology assessment. 2009;13(55):1-182, iii-iv.

32. Mayet N, Choonara YE, Kumar P, Tomar LK, Tyagi C, Du Toit LC, et al. A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. J Pharm Sci. 2014;103(8):2211-30.

33. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. J Pharm Sci. 2008;97(8):2892-923.

34. Horncastle J. Wound dressings. Past, present, and future. Medical device technology. 1995;6(1):30-4, 6.

35. Skórkowska-Telichowska K, Czemplik M, Kulma A, Szopa J. The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. J Am Acad Dermatol. 2013;68(4):e117-26.

36. Pott FS, Meier MJ, Stocco JG, Crozeta K, Ribas JD. The effectiveness of hydrocolloid dressings versus other dressings in the healing of pressure ulcers in adults and older adults: a systematic review and meta-analysis. Rev Lat Am Enfermagem. 2014;22(3):511-20.

37. Dhivya S, Padma VV, Santhini E. Wound dressings - a review. Biomedicine (Taipei). 2015;5(4):22.

38. Boateng J, Catanzano O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing--A Review. J Pharm Sci. 2015;104(11):3653-80.

39. Thu HE, Zulfakar MH, Ng SF. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. *Int J Pharm.* 2012;434(1-2):375-83.
40. Azuma K, Izumi R, Osaki T, Ifuku S, Morimoto M, Saimoto H, et al. Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials. *Journal of functional biomaterials.* 2015;6(1):104-42.
41. Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, et al. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* 1997;18(13):947-51.
42. Schönfelder U, Abel M, Wiegand C, Klemm D, Elsner P, Hipler UC. Influence of selected wound dressings on PMN elastase in chronic wound fluid and their antioxidative potential in vitro. *Biomaterials.* 2005;26(33):6664-73.
43. Raffetto JD, Eberhardt RT, Dean SM, Ligi D, Mannello F. Pharmacologic treatment to improve venous leg ulcer healing. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2016;4(3):371-4.
44. Falanga V, Fujitani RM, Diaz C, Hunter G, Jorizzo J, Lawrence PF, et al. Systemic treatment of venous leg ulcers with high doses of pentoxifylline: efficacy in a randomized, placebo-controlled trial. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society.* 1999;7(4):208-13.
45. Belcaro G, Cesarone MR, Nicolaidis AN, De Sanctis MT, Incandela L, Geroulakos G. Treatment of venous ulcers with pentoxifylline: a 6-month randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Angiology.* 2002;53 Suppl 1:S45-7.
46. Raffetto JD. Dermal pathology, cellular biology, and inflammation in chronic venous disease. *Thrombosis research.* 2009;123 Suppl 4:S66-71.
47. Thomas PR, Nash GB, Dormandy JA. White cell accumulation in dependent legs of patients with venous hypertension: a possible mechanism for trophic changes in the skin. *British Medical Journal (Clinical research ed).* 1988;296(6638):1693-5.
48. Shields DA, Andaz SK, Sarin S, Scurr JH, Coleridge Smith PD. Plasma elastase in venous disease. *Br J Surg.* 1994;81(10):1496-9.
49. Loscalzo J. Endothelial injury, vasoconstriction, and its prevention. *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital.* 1995;22(2):180-4.
50. Woo YC, Park SS, Subieta AR, Brennan TJ. Changes in tissue pH and temperature after incision indicate acidosis may contribute to postoperative pain. *Anesthesiology.* 2004;101(2):468-75.

51. Heng MC. Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. *Int J Dermatol.* 2011;50(9):1058-66.
52. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews.* 2003;83(3):835-70.
53. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of international medical research.* 2009;37(5):1528-42.
54. Morton LM, Phillips TJ. Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2016;74(4):589-605; quiz -6.
55. Budzynski AZ. Fibrinogen and fibrin: biochemistry and pathophysiology. *Critical reviews in oncology/hematology.* 1986;6(2):97-146.
56. Stropnik D, Stana J. Študija krvne skladnosti modificiranih sintetičnih polimernih površin za vsadke : raziskovalna naloga. Univerza, Medicinska fakulteta; 2008.
57. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes.* 2012;49(1):35-43.
58. Eming SA, Kaufmann J, Löhner R, Krieg T. [Chronic wounds. Novel approaches in research and therapy]. *Hautarzt.* 2007;58(11):939-44.
59. Ebaid H. Neutrophil depletion in the early inflammatory phase delayed cutaneous wound healing in older rats: improvements due to the use of un-denatured camel whey protein. *Diagnostic pathology.* 2014;9:46.
60. Daley JM, Reichner JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL, Mastrofrancesco B, et al. Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils. *J Immunol.* 2005;174(4):2265-72.
61. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e23.
62. Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol.* 2004;172(7):4410-7.
63. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010;33(3):375-86.
64. DiPietro LA, Polverini PJ. Role of the macrophage in the positive and negative regulation of wound neovascularization. *Behring Institute Mitteilungen.* 1993(92):238-47.

65. <http://www.cell.com/cms/attachment/2007952073/2030507092/gr3.jpg>.
66. Madden JW, Peacock EE. Studies on the biology of collagen during wound healing. 3. Dynamic metabolism of scar collagen and remodeling of dermal wounds. *Ann Surg.* 1971;174(3):511-20.
67. Lau K, Paus R, Tiede S, Day P, Bayat A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol.* 2009;18(11):921-33.
68. Jacinto A, Martinez-Arias A, Martin P. Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature cell biology.* 2001;3(5):E117-23.
69. Clark RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol.* 1982;79(5):264-9.
70. Sorg H, Krueger C, Vollmar B. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *J Anat.* 2007;211(6):810-8.
71. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997;276(5309):75-81.
72. Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 Suppl):35S-41S.
73. Werdin F, Tennenhaus M, Schaller HE, Rennekampff HO. Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *Eplasty.* 2009;9:e19.
74. Sen CK. Wound healing essentials: let there be oxygen. *Wound Repair Regen.* 2009;17(1):1-18.
75. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2006;112(2):358-404.
76. Berthod F, Germain L, Tremblay N, Auger FA. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *Journal of cellular physiology.* 2006;207(2):491-8.
77. Allen DB, Maguire JJ, Mahdavian M, Wicke C, Marcocci L, Scheuenstuhl H, et al. Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms. *Arch Surg.* 1997;132(9):991-6.
78. Hopf HW, Hunt TK, Rosen N. Supplemental oxygen and risk of surgical site infection. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2004;291(16):1956; author reply 8-9.

79. Ojha N, Roy S, He G, Biswas S, Velayutham M, Khanna S, et al. Assessment of wound-site redox environment and the significance of Rac2 in cutaneous healing. *Free radical biology & medicine*. 2008;44(4):682-91.
80. Roy S, Khanna S, Sen CK. Redox regulation of the VEGF signaling path and tissue vascularization: Hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing. *Free radical biology & medicine*. 2008;44(2):180-92.
81. Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1348-61.
82. Browne AC, Vearncombe M, Sibbald RG. High bacterial load in asymptomatic diabetic patients with neurotrophic ulcers retards wound healing after application of Dermagraft. *Ostomy Wound Manage*. 2001;47(10):44-9.
83. Wysocki AB. Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. *AACN Clin Issues*. 2002;13(3):382-97.
84. Bowler PG. The 10(5) bacterial growth guideline: reassessing its clinical relevance in wound healing. *Ostomy Wound Manage*. 2003;49(1):44-53.
85. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology*. 2005;13(1):34-40.
86. Wilkins M, Hall-Stoodley L, Allan RN, Faust SN. New approaches to the treatment of biofilm-related infections. *J Infect*. 2014;69 Suppl 1:S47-52.
87. Pascarella L, Schönbein GW, Bergan JJ. Microcirculation and venous ulcers: a review. *Ann Vasc Surg*. 2005;19(6):921-7.
88. Spinedi L, Uthoff H, Partovi S, Staub D. Varicosities of the lower extremity, new approaches: cosmetic or therapeutic needs? *Swiss Med Wkly*. 2016;146:w14360.
89. Eklof B, Perrin M, Delis KT, Rutherford RB, Gloviczki P, Forum AV, et al. Updated terminology of chronic venous disorders: the VEIN-TERM transatlantic interdisciplinary consensus document. *J Vasc Surg*. 2009;49(2):498-501.
90. Markovic JN, Shortell CK. Genomics of varicose veins and chronic venous insufficiency. *Seminars in vascular surgery*. 2013;26(1):2-13.
91. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Badier-Commander C, Kern P, Fabiani JN, Verbeuren TJ, et al. Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins. *Journal of vascular research*. 2001;38(6):560-8.
92. Kowalewski R, Malkowski A, Sobolewski K, Gacko M. Evaluation of aFGF/bFGF and FGF signaling pathway in the wall of varicose veins. *J Surg Res*. 2009;155(1):165-72.
93. <http://blog.targetthealth.com/wp-content/uploads/2011/05/20110517-1.jpg>.

94. Gemmati D, Federici F, Catozzi L, Giancesini S, Tacconi G, Scapoli GL, et al. DNA-array of gene variants in venous leg ulcers: detection of prognostic indicators. *J Vasc Surg.* 2009;50(6):1444-51.
95. Drakesmith H, Schimanski LM, Ormerod E, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, et al. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood.* 2005;106(3):1092-7.
96. O'Meara S, Al-Kurdi D, Ovington LG. Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(1):CD003557.
97. Cornwall JV, Doré CJ, Lewis JD. Leg ulcers: epidemiology and aetiology. *Br J Surg.* 1986;73(9):693-6.
98. Callam MJ, Ruckley CV, Harper DR, Dale JJ. Chronic ulceration of the leg: extent of the problem and provision of care. *British Medical Journal (Clinical research ed).* 1985;290(6485):1855-6.
99. Leu AJ, Leu HJ, Franzeck UK, Bollinger A. Microvascular changes in chronic venous insufficiency--a review. *Cardiovasc Surg.* 1995;3(3):237-45.
100. Scott HJ, Coleridge Smith PD, Scurr JH. Histological study of white blood cells and their association with lipodermatosclerosis and venous ulceration. *Br J Surg.* 1991;78(2):210-1.
101. Wilkinson LS, Bunker C, Edwards JC, Scurr JH, Smith PD. Leukocytes: their role in the etiopathogenesis of skin damage in venous disease. *J Vasc Surg.* 1993;17(4):669-75.
102. Coleridge Smith PD, Thomas P, Scurr JH, Dormandy JA. Causes of venous ulceration: a new hypothesis. *British Medical Journal (Clinical research ed).* 1988;296(6638):1726-7.
103. Bowler PG. Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. *Ann Med.* 2002;34(6):419-27.
104. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease - Part I: Inflammatory biomarkers in wound healing. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(10):1964-74.
105. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease - Part II: Proteolytic biomarkers in wound healing. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(10):1900-8.
106. Pukstad BS, Ryan L, Flo TH, Stenvik J, Moseley R, Harding K, et al. Non-healing is associated with persistent stimulation of the innate immune response in chronic venous leg ulcers. *Journal of dermatological science.* 2010;59(2):115-22.
107. Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound repair and regeneration : official*

publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2000;8(1):13-25.

108. Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, Ciaccio C, Tundo GR, Marini S, et al. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Molecular aspects of medicine*. 2012;33(2):119-208.

109. Moor AN, Vachon DJ, Gould LJ. Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2009;17(6):832-9.

110. Mwaura B, Mahendran B, Hynes N, Defreitas D, Avalos G, Adegbola T, et al. The impact of differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer, matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 and PDGF-AA on the chronicity of venous leg ulcers. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2006;31(3):306-10.

111. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):45-65.

112. Tang P, Hung M-C, Klostergaard J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry-U.S.* 1996;35(25):8216-25.

113. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997;385(6618):729-33.

114. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2008;16(5):585-601.

115. Kant S, Swat W, Zhang S, Zhang ZY, Neel BG, Flavell RA, et al. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes Dev*. 2011;25(19):2069-78.

116. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/TNF_signaling.jpg.

117. Weinstein DA, Kirsner RS. Refractory ulcers: the role of tumor necrosis factor-alpha. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010;63(1):146-54.

118. Wallace HJ, Vandongen YK, Stacey MC. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism associated with increased susceptibility to venous leg ulceration. *J Invest Dermatol*. 2006;126(4):921-5.

119. d'Ayala GG, Malinconico M, Laurienzo P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches. *Molecules*. 2008;13(9):2069-106.

120. Hua S, Marks E, Schneider JJ, Keely S. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: selective targeting to diseased versus healthy tissue. *Nanomedicine*. 2015;11(5):1117-32.
121. Zhou P, Sun X, Zhang Z. Kidney-targeted drug delivery systems. *Acta Pharm Sin B*. 2014;4(1):37-42.
122. Zhou QL, Chen ZY, Wang YX, Yang F, Lin Y, Liao YY. Ultrasound-mediated local drug and gene delivery using nanocarriers. *BioMed research international*. 2014;2014:963891.
123. Wang C, Esker AR. Nanocrystalline chitin thin films. *Carbohydr Polym*. 2014;102:151-8.
124. Dubey LK, Moeller JB, Schlosser A, Sorensen GL, Holmskov U. Chitin enhances serum IgE in *Aspergillus fumigatus* induced allergy in mice. *Immunobiology*. 2015;220(6):714-21.
125. Liu H, Yang Q, Zhang L, Zhuo R, Jiang X. Synthesis of carboxymethyl chitin in aqueous solution and its thermo- and pH-sensitive behaviors. *Carbohydr Polym*. 2016;137:600-7.
126. Arun Kumar R, Sivashanmugam A, Deepthi S, Bumgardner JD, Nair SV, Jayakumar R. Nano-fibrin stabilized CaSO₄ crystals incorporated injectable chitin composite hydrogel for enhanced angiogenesis & osteogenesis. *Carbohydr Polym*. 2016;140:144-53.
127. Smitha KT, Anitha A, Furuike T, Tamura H, Nair SV, Jayakumar R. In vitro evaluation of paclitaxel loaded amorphous chitin nanoparticles for colon cancer drug delivery. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2013;104:245-53.
128. Shang Y, Ding F, Xiao L, Deng H, Du Y, Shi X. Chitin-based fast responsive pH sensitive microspheres for controlled drug release. *Carbohydr Polym*. 2014;102:413-8.
129. Dutta AK, Egusa M, Kaminaka H, Izawa H, Morimoto M, Saimoto H, et al. Facile preparation of surface N-halamine chitin nanofiber to endow antibacterial and antifungal activities. *Carbohydr Polym*. 2015;115:342-7.
130. Smitha KT, Nisha N, Maya S, Biswas R, Jayakumar R. Delivery of rifampicin-chitin nanoparticles into the intracellular compartment of polymorphonuclear leukocytes. *International journal of biological macromolecules*. 2015;74:36-43.
131. Salaberria AM, Fernandes SC, Diaz RH, Labidi J. Processing of α -chitin nanofibers by dynamic high pressure homogenization: characterization and antifungal activity against *A. niger*. *Carbohydr Polym*. 2015;116:286-91.
132. Ghotloo S, Hoseini MH, Alimohammadian MH, Khaze V, Memarnejadian A, Rostami A. Immunomodulatory effects of chitin microparticles on *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *Parasitol Int*. 2015;64(2):219-21.

133. Jain T, Kumar S, Dutta PK. Dibutylchitin nanoparticles as novel drug carrier. *International journal of biological macromolecules*. 2016;82:1011-7.
134. Ding F, Deng H, Du Y, Shi X, Wang Q. Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale*. 2014;6(16):9477-93.
135. Motta GJ. Calcium alginate topical wound dressings: a new dimension in the cost-effective treatment for exudating dermal wounds and pressure sores. *Ostomy Wound Manage*. 1989;25:52-6.
136. Doyle JW, Roth TP, Smith RM, Li YQ, Dunn RM. Effects of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1996;32(4):561-8.
137. Xing R, Liu S, Yu H, Zhang Q, Li Z, Li P. Preparation of low-molecular-weight and high-sulfate-content chitosans under microwave radiation and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate research*. 2004;339(15):2515-9.
138. Wiegand C, Winter D, Hipler UC. Molecular-weight-dependent toxic effects of chitosans on the human keratinocyte cell line HaCaT. *Skin pharmacology and physiology*. 2010;23(3):164-70.
139. Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*. 2001;22(22):2959-66.
140. Azuma K, Ifuku S, Osaki T, Okamoto Y, Minami S. Preparation and biomedical applications of chitin and chitosan nanofibers. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2014;10(10):2891-920.
141. Li P, Poon YF, Li W, Zhu HY, Yeap SH, Cao Y, et al. A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. *Nature materials*. 2011;10(2):149-56.
142. Tang H, Zhang P, Kieft TL, Ryan SJ, Baker SM, Wiesmann WP, et al. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. *Acta Biomater*. 2010;6(7):2562-71.
143. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology*. 2002;74(1-2):65-72.
144. Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*. 1999;20(15):1407-14.

145. Okamoto Y, Shibazaki K, Minami S, Matsushashi A, Tanioka S, Shigemasa Y. Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science.* 1995;57(5):851-4.
146. Burkatovskaya M, Castano AP, Demidova-Rice TN, Tegos GP, Hamblin MR. Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society.* 2008;16(3):425-31.
147. Alsarra IA. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *International journal of biological macromolecules.* 2009;45(1):16-21.
148. Burkatovskaya M, Tegos GP, Swietlik E, Demidova TN, P Castano A, Hamblin MR. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials.* 2006;27(22):4157-64.
149. Biagini G, Bertani A, Muzzarelli R, Damadei A, DiBenedetto G, Belligolli A, et al. Wound management with N-carboxybutyl chitosan. *Biomaterials.* 1991;12(3):281-6.
150. Valentine R, Athanasiadis T, Moratti S, Hanton L, Robinson S, Wormald PJ. The efficacy of a novel chitosan gel on hemostasis and wound healing after endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol Allergy.* 2010;24(1):70-5.
151. Draget KI, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. Alginates from algae. *Biopolymers Online.* 2005.
152. Braccini I, Pérez S. Molecular basis of C(2+)-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules.* 2001;2(4):1089-96.
153. Serp D, Cantana E, Heinzen C, Von Stockar U, Marison IW. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnol Bioeng.* 2000;70(1):41-53.
154. Dumitriu S. *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility:* CRC press; 2004.
155. Mogosanu GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int J Pharm.* 2014;463(2):127-36.
156. Bayomi MA, Al-Suwayeh SA, El-Helw AR. Excipient-excipient interaction in the design of sustained-release theophylline tablets: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2001;27(6):499-506.
157. Abbad S, Zhang Z, Waddad AY, Munyendo WL, Lv H, Zhou J. Chitosan-Modified Cationic Amino Acid Nanoparticles as a Novel Oral Delivery System for Insulin. *Journal of biomedical nanotechnology.* 2015;11(3):486-99.

158. Jerry N, Anitha Y, Sharma CP, Sony P. In vivo absorption studies of insulin from an oral delivery system. *Drug delivery*. 2001;8(1):19-23.
159. Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, et al. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*. 2000;21(8):795-801.
160. Miyazaki S, Kubo W, Attwood D. Oral sustained delivery of theophylline using in-situ gelation of sodium alginate. *J Control Release*. 2000;67(2-3):275-80.
161. Hood SC, Moher D, Barber GG. Management of intermittent claudication with pentoxifylline: meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 1996;155(8):1053-9.
162. Ott E, Lechner H, Fazekas F. Hemorheological effects of pentoxifylline on disturbed flow behavior of blood in patients with cerebrovascular insufficiency. *Eur Neurol*. 1983;22 Suppl 1:105-7.
163. Fossat C, Fabre D, Alimi Y, Bienvenu J, Aillaud MF, Lenoble M, et al. Leukocyte activation study during occlusive arterial disease of the lower limb: effect of pentoxifylline infusion. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1995;25 Suppl 2:S96-100.
164. McCarty MF, O'Keefe JH, DiNicolantonio JJ. Pentoxifylline for vascular health: a brief review of the literature. *Open Heart*. 2016;3(1):e000365.
165. Crouch SP, Fletcher J. Effect of ingested pentoxifylline on neutrophil superoxide anion production. *Infection and immunity*. 1992;60(11):4504-9.
166. Pollice PF, Rosier RN, Looney RJ, Puzas JE, Schwarz EM, O'Keefe RJ. Oral pentoxifylline inhibits release of tumor necrosis factor-alpha from human peripheral blood monocytes : a potential treatment for aseptic loosening of total joint components. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2001;83-A(7):1057-61.
167. Ferrari P, Mallon D, Trinder D, Olynyk JK. Pentoxifylline improves haemoglobin and interleukin-6 levels in chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2010;15(3):344-9.
168. González-Espinoza L, Rojas-Campos E, Medina-Pérez M, Peña-Quintero P, Gómez-Navarro B, Cueto-Manzano AM. Pentoxifylline decreases serum levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and C-reactive protein in hemodialysis patients: results of a randomized double-blind, controlled clinical trial. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2012;27(5):2023-8.

169. Magnusson M, Gunnarsson M, Berntorp E, Björkman S, Höglund P. Effects of pentoxifylline and its metabolites on platelet aggregation in whole blood from healthy humans. *Eur J Pharmacol.* 2008;581(3):290-5.
170. Wyska E, Szymura-Oleksiak J, Pekala E, Obruśnik A. Pharmacokinetic modelling of pentoxifylline and lisofylline after oral and intravenous administration in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(4):495-501.
171. Lin HY, Yeh CT. Controlled release of pentoxifylline from porous chitosan-pectin scaffolds. *Drug delivery.* 2010;17(5):313-21.
172. Nicklasson M, Björkman S, Roth B, Jönsson M, Höglund P. Stereoselective metabolism of pentoxifylline in vitro and in vivo in humans. *Chirality.* 2002;14(8):643-52.
173. Margolin K, Atkins M, Sparano J, Sosman J, Weiss G, Lotze M, et al. Prospective randomized trial of lisofylline for the prevention of toxicities of high-dose interleukin 2 therapy in advanced renal cancer and malignant melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 1997;3(4):565-72.
174. Yang Z, Chen M, Nadler JL. Lisofylline: a potential lead for the treatment of diabetes. *Biochemical pharmacology.* 2005;69(1):1-5.
175. Groesdonk HV, Heringlake M, Heinze H. [Anti-inflammatory effects of pentoxifylline: importance in cardiac surgery]. *Anaesthesist.* 2009;58(11):1136-43.
176. D'Hellencourt CL, Diaw L, Cornillet P, Guenounou M. Differential regulation of TNF alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, TNF beta, and IL-10 by pentoxifylline. *International journal of immunopharmacology.* 1996;18(12):739-48.
177. Coimbra R, Melbostad H, Loomis W, Tobar M, Hoyt DB. Phosphodiesterase inhibition decreases nuclear factor-kappaB activation and shifts the cytokine response toward anti-inflammatory activity in acute endotoxemia. *The Journal of trauma.* 2005;59(3):575-82.
178. Bessler H, Gilgal R, Djaldetti M, Zahavi I. Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels, and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. *J Leukoc Biol.* 1986;40(6):747-54.
179. Nagy Z, Sipka R, Ocsovszki I, Balogh A, Mándi Y. Suppressive effect of pentoxifylline on natural killer cell activity; experimental and clinical studies. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology.* 1999;359(3):228-34.
180. Strieter RM, Remick DG, Ward PA, Spengler RN, Lynch JP, Larrick J, et al. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;155(3):1230-6.

181. Babaei S, Bayat M, Nouruzian M. Pentoxifylline improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2013;700(1-3):165-72.
182. Rüttermann M, Maier-Hasselmann A, Nink-Grebe B, Burckhardt M. Local treatment of chronic wounds: in patients with peripheral vascular disease, chronic venous insufficiency, and diabetes. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(3):25-31.
183. Opp D, Wafula B, Lim J, Huang E, Lo JC, Lo CM. Use of electric cell-substrate impedance sensing to assess in vitro cytotoxicity. *Biosens Bioelectron.* 2009;24(8):2625-9.
184. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33.
185. Haudenschild CC, Schwartz SM. Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 1979;41(5):407-18.
186. Abbi S, Ueda H, Zheng C, Cooper LA, Zhao J, Christopher R, et al. Regulation of focal adhesion kinase by a novel protein inhibitor FIP200. *Mol Biol Cell.* 2002;13(9):3178-91.
187. <http://www.autom8.com/biomicro-ap-wound.html>.
188. Xiao C, Luong JH. On-line monitoring of cell growth and cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS). *Biotechnology progress.* 2003;19(3):1000-5.
189. Yeon JH, Park JK. Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip. *Anal Biochem.* 2005;341(2):308-15.
190. <http://www.biophysics.com/ecis-theory.php>.
191. Bock O, Mrowietz U. Development of a new method of analysing chemotactic deactivation of human neutrophil granulocytes. *Journal of biochemical and biophysical methods.* 2001;48(3):257-68.
192. BOYDEN S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of experimental medicine.* 1962;115:453-66.
193. Zigmond SH. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol.* 1977;75(2 Pt 1):606-16.
194. <http://jcs.biologists.org/content/125/7/1770.figures-only>.
195. <https://makingbones.wordpress.com/2013/02/28/technique-chemotaxis-revisited-the-boyden-chamber-assay/>.
196. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods.* 1983;65(1-2):55-63.
197. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* 1995;5(2):69-84.

198. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of immunological methods.* 1991;142(2):257-65.
199. Kurbacher CM, Cree IA, Bruckner HW, Brenne U, Kurbacher JA, Müller K, et al. Use of an ex vivo ATP luminescence assay to direct chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs.* 1998;9(1):51-7.
200. Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2005;45(2):108-11.
201. Hastie CJ, McLauchlan HJ, Cohen P. Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nature protocols.* 2006;1(2):968-71.
202. Marx KA. Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules.* 2003;4(5):1099-120.
203. van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *Journal of immunological methods.* 1994;174(1-2):311-20.
204. Stana J, Stergar J, Gradisnik L, Flis V, Kargl R, Frohlich E, et al. Multilayered Polysaccharide Nanofilms for Controlled Delivery of Pentoxifylline and Possible Treatment of Chronic Venous Ulceration. *Biomacromolecules.* 2017;18(9):2732-46.
205. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in wound care.* 2015;4(9):560-82.
206. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology.* 2010;144(1):51-63.
207. Mohan T, Findenig G, Höllbacher S, Cerny C, Ristić T, Kargl R, et al. Interaction and enrichment of protein on cationic polysaccharide surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;123:533-41.
208. Banerjee S. Simple derivation of Young, Wenzel and Cassie-Baxter equations and its interpretations. . 2008.
209. Fleischmann W, Russ M, Moch D. Chirurgische Wundbehandlung. *Der Chirurg.* 1998;69(2):222-32.
210. Ramalingam P, Ko YT. Enhanced oral delivery of curcumin from N-trimethyl chitosan surface-modified solid lipid nanoparticles: pharmacokinetic and brain distribution evaluations. *Pharm Res.* 2015;32(2):389-402.

211. Collagen/alginate scaffolds comprising core (PCL)–shell (collagen/alginate) struts for hard tissue regeneration: fabrication, characterisation, and cellular activities.
212. Rahim SA, Carter PA, Elkordy AA. Design and evaluation of effervescent floating tablets based on hydroxyethyl cellulose and sodium alginate using pentoxifylline as a model drug. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:1843-57.
213. Lenzi EK, Novatski A, Farago PV, Almeida MA, Zawadzki SF, Menechini Neto R. Diffusion Processes and Drug Release: Capsaicinoids - Loaded Poly (ϵ -caprolactone) Microparticles. *PLoS one.* 2016;11(6):e0157662.
214. Kormsmeier RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of potassium chloride release from compressed, hydrophilic, polymeric matrices: effect of entrapped air. *J Pharm Sci.* 1983;72(10):1189-91.
215. Renke M, Tylicki L, Rutkowski P, Knap N, Zietkiewicz M, Neuwelt A, et al. Effect of pentoxifylline on proteinuria, markers of tubular injury and oxidative stress in non-diabetic patients with chronic kidney disease - placebo controlled, randomized, cross-over study. *Acta biochimica Polonica.* 2010;57(1):119-23.
216. Feyli SA, Ghanbari A, Keshtmand Z. Therapeutic effect of pentoxifylline on reproductive parameters in diabetic male mice. *Andrologia.* 2017;49(1).
217. Massart J, Robin MA, Noury F, Fautrel A, Letteron P, Bado A, et al. Pentoxifylline aggravates fatty liver in obese and diabetic ob/ob mice by increasing intestinal glucose absorption and activating hepatic lipogenesis. *British journal of pharmacology.* 2012;165(5):1361-74.
218. Teicher BA, Holden SA, Herman TS, Epelbaum R, Pardee AB, Dezube B. Efficacy of pentoxifylline as a modulator of alkylating agent activity in vitro and in vivo. *Anticancer research.* 1991;11(4):1555-60.
219. Luna SM, Silva SS, Gomes ME, Mano JF, Reis RL. Cell adhesion and proliferation onto chitosan-based membranes treated by plasma surface modification. *J Biomater Appl.* 2011;26(1):101-16.
220. Carvalho CR, Lopez-Cebral R, Silva-Correia J, Silva JM, Mano JF, Silva TH, et al. Investigation of cell adhesion in chitosan membranes for peripheral nerve regeneration. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications.* 2017;71:1122-34.
221. Maver T, Gradisnik L, Kurecic M, Hribernik S, Smrke DM, Maver U, et al. Layering of different materials to achieve optimal conditions for treatment of painful wounds. *Int J Pharm.* 2017;529(1-2):576-88.

222. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003;24(24):4385-415.

223. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. *J Vasc Surg*. 2009;49(4):1013-20.

7 Članek na temo doktorske naloge

STANA, Jan, STERGAR, Janja, GRADIŠNIK, Lidija, FLIS, Vojko, KARGL, Rupert, FROEHLICH, Eleonore, STANA-KLEINSCHEK, Karin, MOHAN, Tamilselvan, MAVER, Uroš. Multilayered polysaccharide nanofilms for controlled delivery of pentoxifylline and possible treatment of chronic venous ulceration. *Biomacromolecules*, ISSN 1526-4602. [Online ed.], 2017, vol. 18, iss. 9, str. 2732-2746. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.biomac.7b00523>, doi: [10.1021/acs.biomac.7b00523](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00523). [COBISS.SI-ID [512736312](https://www.cobiss.si/id/512736312)]

8 Priloge

8.1 Življenjepis Jan Stana

Rojen: 20. 5. 1986 v Mariboru, Slovenija
Naslov: Ledererzeile 40, 83512 Wasserburg am Inn
Kontakt: ☎017631796211 ✉ jtstana@gmail.com



1) Šolska izobrazba:

- 2001 - 2005** dijak II Gimnazije Maribor
2005 z odliko opravljena matura
2005 – 2011 študent medicinske fakultete, Univerze v Mariboru
2008 – 2009 sodelovanje v programu ERASMUS, v sklopu katerega opravljen enoletni študij v tujini na Medicinski fakulteti, Eberhard Karls, Univerze v Tübingenu, Nemčija
2014 – 2018 PhD študij na Medicinski fakulteti univerze v Mariboru

2) Klinična dejavnost

- April - Maj 2011** Praktično usposabljanje na Heart Institute at St. Lukes Episcopal Hospital. Klinična dejavnost na kardiokirurškem oddelku pod vodstvom Igor D. Gregoric M.D. Houston, Texas
- Aug - Sep 2009** Štiritedenski praktikum na oddelku za kardiokirurgijo na UKH Graz, Avstrija pod vodstvom Prof. Dr. Igor Knez, dr. med., Graz, Avstrija
- Okt 2011-Dec 2012** Specializant na Kliniki za operativno und interventionalno žilno kirurgijo v Schön Kliniki Vogtareuth. V tem času šest mesečna rotacija na oddelek za intenzivno
- Jan–Dec 2013** Znotraj specializacije rotacija na Kliniki za splošno, žilno in torakalno kirurgijo RoMed Klinike Rosenheim
- Jan 2014-** Specializant na Klinik za operativno in intervencijsko žilno kirurgijo v Schön Kliniki Vogtareuth

3) **Znanstveno delo**

Delovanje na znanstvenih projektih:

- »**Vascular Graft Interfaces**«; *MNT ERA NET*; (Partnerji projekta so: Univerza v Mariboru, Slovenia, Karl Franzens Univerza Graz, Avstrija, UKC Maribor, Jožef Stefan Inštitut, Ljubljana, Slovenija)
- Nacionalni projekt : »**Razvoj postopkov in obdelav za izboljšanje hemokompatibilnosti polietilentereftaltnih površin; HemoPET**«; L2-0330; (Partnerske organizacije projekta so: Univerza v Mariboru, Slovenija, UKC Maribor, Jožef Stefan Inštitut, Ljubljana, Slovenija)

Izvirni znanstveni članki

- STANA, Jan, STROPNIK, Domen, STRNAD, Simona, INDEST, Tea, JEVŠEK, Marko, KOŠIR, Gorazd. *Vpeljava in optimizacija in-vitro metode za določanje hemokompatibilnosti modificiranih polietilenteraftaltnih površin; Introducing and optimization of the in-vitro method for determining the hemocompatibility of modified poly (ethylene) terephthalate surfaces.* Acta medico-biotechnica, 2009, vol. 2, no. 1, Seite 61-67.
- FASL, Hubert, STANA, Jan, STROPNIK, Domen, STRNAD, Simona, STANA-KLEINSCHEK, Karin, RIBITSCH, Volker. *Improvement of the hemocompatibility of PET surfaces using different sulphated polysaccharides as coating materials.* Biomacromolecules, 2010, 11, 2, Seite 377-381, WOS number of citations until 2013: 12
- GERICKE, Martin, DOLIŠKA, Aleš, STANA, Jan, LIEBERT, Tim, HEINZE, Thomas, STANA-KLEINSCHEK, Karin. *Semi-synthetic polysaccharide sulfates as anticoagulant coatings for PET. 1, Cellulose sulfate.* Macromol. biosci. 2011, vol. 11, iss. 4, Seite 549-556, WOS number of citations until 2013: 3
- DOLIŠKA, Aleš, STRNAD, Simona, STANA, Jan, MARTINELLI, Elisabeth, RIBITSCH, Volker, STANA-KLEINSCHEK, Karin. *In vitro haemocompatibility evaluation of PET surfaces using the quartz crystal microbalance technique.* J. biomater. sci., Polym. ed., 2012, vol. 23, no. 5, Seite 697-714, WOS number of citations until 2013: 2
- FASL, Hubert, FRAS ZEMLJIČ, Lidija, STANA-KLEINSCHEK, Karin, STANA, Jan, RIBITSCH, Volker. *Preparation and characterization of 3, 6-O-Chitosansulphonate : lecture, presented at the 243rd American Chemical Society National Meeting & Exposition "Chemistry of Life", San Diego, California, March 25-29, 2012.* 2012.
- STANA, Jan, STERGAR, Janja, GRADIŠNIK, Lidija, FLIS, Vojko, KARGL, Rupert, FROEHLICH, Eleonore, STANA-KLEINSCHEK, Karin, MOHAN, Tamilselvan, MAVER, Uroš. *Multilayered polysaccharide nanofilms for controlled delivery of pentoxifylline and possible treatment of chronic venous ulceration.* Biomacromolecules, ISSN 1526-4602. [Online ed.], 2017, vol. 18, iss. 9, str. 2732-2746

Objavljeni prispevki iz znanstvenih konferenc

- STANA, Jan, STROPNIK, Domen, JEVŠEK, Marko, KOŠIR, Gorazd, STANA-KLEINSCHEK, Karin. Bloodcompatibility assessment of modified poly(ethylene)terephthalate surfaces. V: V International Materials Symposium Materials 2009 (XIV meeting of SPM - Sociedade Portuguesa de Materiais), Lisboa, april 5-8. *Recent advances in characterization, processing, design and modelling of structural and functional materials : proceedings*. Lisboa: Instituto Superior Técnico, 2009.
- STRNAD, Simona, DOLIŠKA, Aleš, FRAS ZEMLJIČ, Lidija, STANA, Jan, STROPNIK, Domen. Hemocompatibility assesment of poly(ethylene terephthalate) surfaces treated with alternative anticoagulants. V: *International Conference on Innovative Technologies, 14. 09. 2010 to 16. 09. 2010*, Prague, Czech Republic. *IN-TECH 2010*, page 130-131.

Objavljeni povzetki iz znanstvenih konferenc

- FASL, Hubert, THEILER, B., STRNAD, Simona, FRAS ZEMLJIČ, Lidija, STANA, Jan, STROPNIK, Domen, STANA-KLEINSCHEK, Karin, RIBITSCH, Volker. *Preparation and characterization of sulfonated Chitosans*. V: PERŠIN, Zdenka (ur.), STANA-KLEINSCHEK, Karin (ur.). EPNOE Scientific Meeting & 2nd Business and Industry Club Meeting, 11-13th May 2009, Utrecht, Netherlands. *Proceedings*. Maribor: Faculty of Mechanical Engineering, Institute for Engineering Materials and Design, Laboratory for Characterisation and Processing of Polymers, 2009, Seite 30
- STANA, Jan, STROPNIK, Domen, STRNAD, Simona, INDEST, Tea, JEVŠEK, Marko, KOŠIR, Gorazd. *In vitro blood compatibility determination of chemically modified PET surfaces*. V: 1st Joint Austrian & Slovenian Polymer Meeting - ASPM 2008, and 9th Austrian Polymer Meeting, March 26-28, 2008, Graz, Austria. *Polymer modelling, synthesis, characterisation, application : final programme [and] book of abstracts*. Graz: NAWI, 2008, Seite 71.
- DOLIŠKA, Aleš, STRNAD, Simona, RIBITSCH, Volker, WILLFÖR, Stefan, STANA, Jan, STROPNIK, Domen. *Improving the hemocompatibility of Poly(ethylene terephthalate) surfaces by galactoglucomannan derivatives adsorption*. V: EPNOE 2009, September 21-24, 2009, Turku/Åbo, Finland. *Polysaccharides as a source of advanced materials : abstracts*. Turku: Åbo Akademi University, 2009, Seite 134.
- FASL, Hubert, THEILER, B., FRAS ZEMLJIČ, Lidija, STANA, Jan, STROPNIK, Domen, STRNAD, Simona, STANA-KLEINSCHEK, Karin, RIBITSCH, Volker. Sulphonated chitosan as a new material for vascular graft interfaces. V: European Polymer Congress [tudi] EPF'09, Graz, Austria, 12.-17. 7. 2009. *Book of abstracts and basic information about the congress*. Graz: Graz University of Technology, Institute for Chemistry and Technology of Materials [etc.], 2009, Seite 110

Vabljeni predavanja (Invited lectures):

- STANA-KLEINSCHEK, Karin, STRNAD, Simona, DOLIŠKA, Aleš, STANA, Jan, FASL, Hubert, MARTINELLI, Lisa, REISCHL, Martin, RIBITSCH, Volker. *Antithrombotic coating of synthetic polymers : invited lecture, presented at the*

Polymer Congress APA-2009 "Polymer science and technology: vision and scenario", December 17-20, 2009, New Delhi, India. New Delhi, 2009.

- STANA-KLEINSCHEK, Karin, STRNAD, Simona, DOLIŠKA, Aleš, STANA, Jan, FASL, Hubert, REISCHL, Martin, RIBITSCH, Volker, KOŠIR, Gorazd. *Polysachharide processing for medical application : invited lecture, presented at the Pre-conference Symposium on Biopolymer Processing, March 1, 2009, Goa, India as part of 25th Annual Meeting of the Polymer Processing Society (PPS-25), Goa, India, March 1-5, 2009. Goa, 2009.*

Nagrade

- **Zlata Dekanova nagrada;**

V letu 2008 Je bila raziskovalna naloga z naslovom »Študija krvne skladnosti modificiranih sintetičnih polimernih površin za vsadke; *Study of the blood compatibility of different PET surfaces*«, avtorjev Jan Stana, Domen Stropnik, odlikovana z Zlato Dekanovo Nagrado

- **Kleines Reisestipendium 2016**, za prispevek:

»*Mehrschichtige medizinische Matrizen mit nachhaltiger Freisetzung von entzündungshemmenden Medikamenten für die Behandlung von chronischen venösen Wunden*«, J. Stana, U. Maver, M. Tamilselvan, F. Härtl, Zdrüenje bavarskih kirurgov Byerischen Chirurgen e.V.

4) *Znanje tujih jezikov*

- Nemščina: C2
→ Angleščina: C2
→ Hrvaščina: C2

PRILOGA 4: IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE DOKTORSKE DISERTACIJE

**UNIVERZA V MARIBORU
MEDICINSKA FAKULTETA**

IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE DOKTORSKE DISERTACIJE

Ime in priimek študenta/-ke: _____ Jan Stana _____

Študijski program: _____ Biomedicinska tehnologija _____

Naslov doktorske disertacije: _____ VEČSLOJNE MEDICINSKE MATRICE Z MODOFOCIRANIM SPROŠČANJEM PENTOKSIFILINA ZA ZDRAVLJENJE KRONIČNE VENOZNE RAZJEDE _____

Mentor/-ica: _____ red. prof. dr. Vojko Flis, dr. med. _____

Somentor/-ica: _____ doc. dr. Uroš Maver, mag. farm. _____

Podpisani/-a študent/-ka _____ Jan Stana _____

- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega znanstvenoraziskovalnega dela;
- izjavljam, da sem pridobil/-a vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v zaključnem delu in jih v zaključnem delu jasno in ustrezno označil/-a;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM in drugih informacijskih zbirk in ponudnikov; sem seznanjen/-a, da bodo dela deponirana/objavljena v DKUM dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-D, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
- dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v zaključnem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela;
- izjavljam, da je tiskana oblika zaključnega dela istovetna elektronski obliki zaključnega dela, ki sem jo oddal/-a za objavo v DKUM;
- Izjavljam, da sem seznanjen s pogoji Proquest-a za oddajo in javno objavo doktorske disertacije v podatkovno zbirko ProQuest Dissertations & Theses Global (<http://contentz.mkt5049.com/lp/43888/382619/PQDTauthoragreement.pdf>).

Uveljavljam permisivnejšo obliko licence Creative Commons: _____ (navedite obliko)

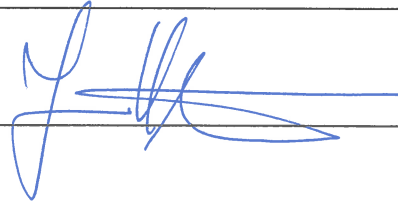
Začasna nedostopnost:

Zaključno delo zaradi zagotavljanja konkurenčne prednosti, zaščite poslovnih skrivnosti, varnosti ljudi in narave, varstva industrijske lastnine ali tajnosti podatkov naročnika: _____ (naziv in naslov naročnika/institucije) ne sme biti javno dostopno do _____ (datum odloga javne objave ne sme biti daljši od 3 let od zagovora dela). To se nanaša na tiskano in elektronsko obliko zaključnega dela.

Temporary unavailability:

To ensure competitive advantage, protection of business secrets, safety of persons and nature, protection of industrial property, or confidentiality of information of the client _____ (client/institution name and address)) the thesis shall not be accessible to the public until _____ (the deferment of public availability shall not exceed 3 years from the date of the thesis defense). This applies to printed and electronic thesis forms.

Kraj in datum: Maribor 20.9.18 Podpis študenta/-ke: _____



Podpis mentorja/-ice: _____ (samo v primeru, če delo ne sme biti javno dostopno)

Ime in priimek ter podpis odgovorne osebe naročnika in žig:

_____ (samo v primeru, če delo ne sme biti javno dostopno)