

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEJC KLEMENC
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



Nejc Klemenc

**RAZVOJ REOLOŠKE METODE ZA VREDNOTENJE
MUKOADHEZIVNOSTI**

**DEVELOPMENT OF RHEOLOGICAL METHOD FOR
EVALUATION OF MUCOADHESION**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal v farmacevtski družbi Lek, d. d., Ljubljana, na oddelku za Farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom doc. dr. Ilije German Ilića, mag. farm. in somentorstvom Helene Šuklje Debeljak, mag. farm.

ZAHVALA

To magistrsko nalogo posvečam sebi in Žar crewju.

Sebi, ki sem si skozi leta dokazal, da zmorem in znam, da lahko s trdom in voljo dosežem cilje, ki so nekoč bili še tako daleč stran. Ampak zdaj sem tu - na cilju, kjer jih je pred mano še mnogo.

Žar crewju, ki so bili vedno tu, ko sem jih potreboval in so bili vse to, kar pravi prijatelji morajo biti. Brez vas ne bi bil to, kar sem.

Zahvalil bi se vsem - od prve razredničarke do zadnjega sošolca in vsem, ki so me na kakršenkoli način uspešno vodili do sem. Vsem, ki so danes tu ob meni in tistim, ki jih ni, a bi vseeno ponosno stali zraven. Posebej pa družini za neizmerno podporo vse od prvega koraka naprej.

Hvala tudi mentorju Iliji, somentorjema Heleni in Mihi ter sodelavcem iz Leka za ponujeno priložnost, pomoč in nasvete.

Čeprav nalogo posvečam sebi, brez vas ne bi tukaj in ponosen sem, da ste bili del zgodbe. Zgodbe mojega življenja.

Hvala!

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Ilije German Ilića, mag. farm. in somentorstvom Helene Šuklje Debeljak, mag. farm.

Nejc Klemenc

Ljubljana, 2018

Komisija za zagovor:

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.

Mentor: doc. dr. Ilija German Ilić, mag. farm.

Somentor: Helena Šuklje Debeljak, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Martina Hrast, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1 UVOD	1
1.1 Bio/mukoadhezivnost	1
1.2 Mehanizem in teorije mukoadhezivnosti.....	1
1.2.1 Teorija močenja.....	2
1.2.2 Teorija difuzije	2
1.2.3 Teorija preloma	3
1.2.4 Elektronska teorija.....	4
1.2.5 Adsorpcijska teorija.....	4
1.3 Mukoadhezija v farmaciji.....	4
1.3.1 Farmacevtske oblike.....	5
1.4 Mukoadhezivni polimeri.....	6
1.5 Mukoadhezivna zdravila na trgu	7
1.6 Mukus	8
1.7 Reologija.....	10
1.7.1 Viskoelastične lastnosti snovi	11
1.8 Reološko vrednotenje mukoadhezije.....	13
1.9 Načrtovanje eksperimentov	15
2 NAMEN	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali.....	17
3.2 Aparature	20
3.3 Metode.....	21
3.3.1 Metode priprave vzorcev.....	21
3.3.2 Priprava vzorcev s Carbopol 974P (0,8 in 1,2 %) in Noveon AA-1 (0,8 %) kot polimerom	22
3.3.3 Priprava vzorcev s PVP-K90 (7, 10, 14 %) kot polimerom	23

3.3.4	Izdelava vzorcev z načrtovanjem eksperimentov	23
3.3.5	Priprava vzorcev mucina	25
3.3.6	Združitev vzorcev mucina in vzorcev s polimeri	26
3.3.7	Reološke metode	30
3.3.8	Obdelava DoE podatkov	31
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	33
4.1	Reologija mucinov	33
4.2	Reologija derivatov poliakrilne kisline (Carbopol 974P in Noveon AA-1)	36
4.3	Vpliv uporabe različnih izhodnih koncentracij mucina na reologijo vzorcev s PVP-K90	39
4.4	Vpliv različne koncentracije PVP-K90 in uporaba različne serije komercialno dostopnega mucina na reologijo	42
4.5	Časovni preizkus vzorcev narejenih po DoE	44
4.6	Vpliv koncentracije mucina na G' , G'' in sinergizem DoE vzorcev	47
4.7	Vpliv koncentracije/količine Avicela RC-591 in Maldexa 150 na reološke parametre in reološki sinergizem	50
5	SKLEP	58
6	LITERATURA	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz poteka mukoadhezije farmacevtske oblike (Prirejeno po 5).....	2
Slika 2: Prikaz stika med tekočino in tkivom ter merjenje stičnega kota. γ_{bt} predstavlja površinsko napetost med polimerom in tkivom, γ_{ba} med polimerom in zrakom ter γ_{ta} med tkivom in zrakom (prirejeno po 6).	2
Slika 3: Difuzijska teorija mukoadhezije: (a) zgornja plast (polimer) in spodnja plast (mukus) pred kontaktom; (b) zgornja in spodnja plast med prvim kontaktom; (c) zgornja in spodnja plast po daljšem kontaktu, v fazi konsolidacije (prirejeno po 5).	3
Slika 4: Frekvenčni test disperzij mucina – odvisnost reoloških parametrov G' in G'' od koncentracije mucina.....	33
Slika 5: Frekvenčni test disperzij mucina – odvisnost kompleksne viskoznosti $ \eta^* $ od koncentracije mucina.....	33
Slika 6: Rezultati G' , G'' in kompleksne viskoznosti v odvisnosti od masnega deleža vzorca pri vzorcih redčenih z vodo (oznaka V)	40
Slika 7: Vpliv začetne koncentracije mucina v disperziji na G' (levo) in na sinergizem G' (desno).....	40
Slika 8: Prikaz vpliva začetne koncentracije mucina v disperziji na G'' (levo) na sinergizem G'' (desno).....	40
Slika 9: Vpliv začetne koncentracije mucina v disperziji na $ \eta^* $ (levo) in na sinergizem $ \eta^* $ (desno).....	41
Slika 10: Vpliv časa na reološke parametre vzorcev 002DZ, 004DZ in 005DZ	45
Slika 11: Vpliv časa na reološke vzorcev 002D, 004D in 005D.....	45
Slika 12: Vpliv koncentracije mucina na G' in G'' zmesi 002DZ-002DZ3.....	47
Slika 13: Vpliv koncentracije mucina na G' in G'' zmesi 004DZ-004DZ3.....	48
Slika 14: Vpliv koncentracije mucina na G' in G'' zmesi 005DZ-005DZ3.....	48
Slika 15: Vpliv koncentracije mucina na sinergizem G' za vzorce 002DZ, 004DZ in 005DZ	48
Slika 16: Vpliv koncentracije mucina na sinergizem G'' za vzorce 002DZ, 004DZ in 005DZ	48
Slika 17: Grafični prikaz kvalitete postavljenega modela vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G' , G'' in $ \eta^* $ za vzorce združene z mucinom (DZ).....	52
Slika 18: Grafični prikaz kvalitete postavljenega modela vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G' in G'' za čiste vzorce (D)	52
Slika 19: Grafični prikaz kvalitete postavljenega modela vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na sinergizem G' , G'' in $ \eta^* $	53
Slika 20: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G' čistih vzorcev (D).....	54
Slika 21: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G' vzorcev pomešanih z mucinom (DZ).....	54
Slika 22: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na sinergizem G'	55
Slika 23: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G'' čistih vzorcev (D).....	56
Slika 24: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G'' vzorcev pomešanih z mucinom (DZ).....	56
Slika 25: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na sinergizem G''	57

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Delitev polimerov glede na izvor in naboj ter primeri polimerov za vsako izmed skupin.	7
Preglednica II: Pregled mukoadhezivnih FO na trgu.	8
Preglednica III: Delitev ne-Newtonskih sistemov glede na njihovo časovno odvisnost.	11
Preglednica IV: Kvalitativna sestava vzorcev z mukoadhezivnm polimerom.....	21
Preglednica V: Sestava vzorcev s Carbopolom 974P in Noveonom AA-1 kot mukoadhezivnim polimerom.....	22
Preglednica VI: Sestava vzorcev s PVP-K90 kot mukoadhezivnim polimerom	23
Preglednica VII: Vrstni red priprave DoE vzorcev in vaiirani faktorji v vzorcih.....	24
Preglednica VIII: Sestava vzorcev narejenih po DoE	24
Preglednica IX: Priprava zmesi vzorcev derivatov poliakrilne kisline z mucinom oz. vodo v različnih razmerjih z različno končno koncentracijo mucina.....	27
Preglednica X: Priprava zmesi vzorcev s PVP-K90 z mucinom oz. vodo v različnih razmerjih z različno končno koncentracijo mucina	28
Preglednica XI: Priprava slepih vzorcev mucina v različnih razmerjih z različno končno koncentracijo mucina	28
Preglednica XII: Priprava zmesi z različno koncentrirane PVP-K90 in uporabljenim različno serijsko številko mucina	29
Preglednica XIII: Priprava zmesi DoE vzorcev z mucinom (Z) ali z vodo (V) s 4 % končno koncentracijo mucina.oz. vode.....	29
Preglednica XIV: Priprava zmesi DoE vzorcev z različnimi koncentracijami končnega mucina v zmesi.....	30
Preglednica XV: Pregled parametrov reoloških meritev.....	31
Preglednica XVI: Prikaz rezultatov reoloških parametrov disperzij z različnimi koncentracijami mucina	34
Preglednica XVII: Prikaz rezultatov reoloških parametrov raztopin mucina v vodi	34
Preglednica XVIII: Prikaz rezultatov reoloških meritev za vzorce 001C, 006C in vodo.....	36
Preglednica XIX: Prikaz rezultatov reoloških meritev vzorcev s PVP-K90 z različnimi koncentracijami mucina	39
Preglednica XX: Rezultati reoloških parametrov, kompleksne viskoznosti in sinergizmov pri vzorcih z različnimi koncentracijami PVP-K90 in dvema različnima serijama komercialno dostopnega mucina	42
Preglednica XXI: Rezultati točke prekrivanja (angl. »crossover«) vzorcev 002D(Z), 004D(Z) in 005D(Z).....	45
Preglednica XXII: Rezultati vpliva koncentracije mucina na G' , G'' in sinergizem vzorcev 002D, 004D in 005D	47
Preglednica XXIII: Rezultati meritev DoE vzorcev za postavitev modela.....	50
Preglednica XXIV: Povzetek parametrov reoloških meritev za vrednotenje mukoadhezivnosti	58

POVZETEK

Mukoadhezija je sposobnost snovi, farmacevtskih oblik ali medicinskih pripomočkov, da se za določen čas prilepijo na tkivo. Mukoadhezija se lahko v farmacevtski industriji uporablja za povečanje biološke uporabnosti zdravilnih učinkovin, saj tako farmacevtski obliki omogočimo daljši stik s sluznico ali dosežemo ciljno terapijo. V ta namen se uporabljajo različni mukoadhezivni polimeri, ki interagirajo z mukusom oz. mucinom v njem. Pri kontaktu polimera z mucinom ta medseboj interagirata, kar se lahko odraža v njunih reoloških lastnostih.

V magistrski nalogi smo preučili reološko interakcijo Carbopola 974P, Noveona AA-1, PVP-K90, Avicela RC-591 in Maldexa 150 s komercialno dostopnim mucinom tipa II iz svinjskega želodca. Reološke spremembe smo spremljali z reološkimi parametri G' , G'' , $|\eta^*|$ in reološkim sinergizmom. Z reološkim sinergizmom smo ovrednotili interakcijo med mucinom in mukoadhezivnim polimerom. Pri razvoju reološke metode smo uporabljali amplitudni in frekvenčni test, večji del razvoja pa je predstavljala ustrezna priprava in predpriprava vzorcev. Na podlagi rezultatov smo razvili modele vpliva koncentracije Avicela RC-591 in Maldexa 150 na reološke parametre in reološki sinergizem ob združitvi z mucinom.

Vse vzorce je potrebno pred meritvijo pripraviti na enak način. V naših poskusih smo vzorce čez noč pustili v hladilniku in jih pred meritvijo dobro premešali. Vzorec smo pred meritvijo nalili v reometer in počakali še 5 minut. Ugotovili smo, da niso vsi izbrani polimeri primerni za reološko vrednotenje mukoadhezivnosti, saj se je struktura vzorcev s Carbopolom 974P in Noveonom AA-1 ob združitvi z mucinom porušila, čeprav veljata za ena izmed najboljših mukoadhezivov. Najboljšo interakcijo izbranih polimerov z mucinom smo dosegli, ko smo združili vzorce z mucinom v razmerju 80:20. Ugotovili smo, da se s povečano koncentracijo PVP-K90 zvišuje reološki sinergizem, kar kaže na mukoadhezivne lastnosti polimera. Pri dodatku mucina vzorcem, ki so vsebovali Avicel RC-591 in Maldex 150 smo ugotovili, da mucin povzroči hitrejšo vzpostavitev gelske strukture, kar je posledica njegove interakcije z Avicelom, medtem ko Maldex 150 vzpostavitev gelske strukture zavira. S postavljenimi modeli s pomočjo načrtovanja eksperimentov smo potrdili, da pride do interakcije med Avicelom RC-591 in mucinom, kar se odraža na povišanih reoloških parametrih in reološkem sinergizmu. Postavljeni modeli so dobri in bi se lahko uporabljali za kvantitativno deformulacijo vzorcev z mukoadhezivnimi polimeri. Vendar je absolutna primerjava mukoadhezivnosti različnih polimerov samo s pomočjo reologije težavna in jo je potrebno uporabljati komplementarno z drugimi metodami merjenja mukoadhezivnosti.

Ključne besede: mukoadhezija, reologija, Avicel-RC-591, PVP-K90, eksperimentalni načrt

ABSTRACT

Mucoadhesion is the ability of substances, dosage forms or medical devices to adhere to tissue. It can be used in pharmaceutical industry to prolong contact of the dosage form with mucosa or for targeted treatment. Bioavailability is therefore increased. Mucoadhesive polymers interact with mucus or more specifically with mucin within it. Polymers and mucin interact while in contact and their interaction can be observed rheologically.

In this master thesis we studied rheological interaction of polymers Carbopol 974P, Noveon AA-1, PVP-K90, Avicel-RC591 and Maldex 150 with commercially available mucin from porcine stomach type II. Changes in rheological behaviour were monitored by rheological parameters G' , G'' , $|\eta^*|$ and by rheological synergism. Rheological synergism was used to evaluate interaction between mucin and mucoadhesive polymers. Amplitude and frequency sweep were used for the development of our method. The biggest part of the development included appropriate sample preparation and its pretreatment. Based on our results we created a model with which we evaluated influence of Avicel RC-591 and Maldex 150 concentration on rheological parameters and rheological synergism in mixtures with mucin.

All samples must be pretreated in the same way. We stored the samples in the fridge overnight and vigorously mixed them before measurement. We then poured samples into the rheometer and let them rest for 5 minute. We found out that not all polymers can be used for rheological evaluation of mucoadhesion. Gel structures of samples containing Carbopol 974P and Noveon AA-1 were destroyed when mixed with mucin dispersion even though both polymers are widely considered as good mucoadhesive polymers. We found out that the best interaction between our polymers and mucin dispersion is obtained when mixing them in ratio of 80:20. We found out that by increasing the concentration of PVP-K90 the rheological synergism is increased. This observation shows us that PVP-K90 possesses mucoadhesive properties. By mixing samples containing Avicel RC-591 and Maldex 150 with mucin dispersions we observed faster formation of the gel structure which is the result of the interaction of Avicel RC-591 with mucin. Maldex 150 slows down the formation of the gel structure. Our model confirmed that the Avicel RC-591-mucin interaction is based on the increase of rheological parameters and rheological synergism. With Design of Experiments created model is good and adequate and could be used for deformation of samples containing mucoadhesive polymers. However absolute comparison of mucoadhesive properties of different polymers is difficult based only on rheological measurements and should be used in combination with others methods.

Key words: mucoadhesion, rheology, Avicel-RC-591, PVP-K90, Design of Experiments

SEZNAM OKRAJŠAV

DoE	načrtovanje eksperimentov (angl. Design of Experiments)
FO	farmacevtska oblika
G'	elastični modul oz. modul akumulacijske energije
G''	viskozni modul oz. modul energijskih izgub
HPMC	hidroksipropilmetil celuloza
ME	merska enota
Na-CMC	natrijeva karboksimetil celuloza
PVP	polivinil pirolidon
RSD	Relativna standardna deviacija
ZU	zdravilna učinkovina

1 UVOD

1.1 Bio/mukoadhezivnost

Adhezijo lahko definiramo kot vez, ki nastane s kontaktom med adhezivnim materialom in površino. Ameriško društvo za testiranje in materiale je adhezijo definiralo kot stanje, v katerem se dva materiala držita skupaj zaradi privlačnih medpovršinskih sil, ki so lahko posledica medmolekulskih sil, prepletanja ali obojega (1).

Bioadhezija temelji na isti definiciji, le da je vsaj eden izmed materialov biološkega izvora, farmacevtski terminološki slovar pa jo opredeli kot sposobnost snovi, farmacevtskih oblik ali medicinskih pripomočkov, da se za določen čas prilepijo na tkivo (2). V bioloških sistemih jo lahko razdelimo na tri tipe:

- Tip 1: adhezija med dvema biološkima fazama, npr. med agregiranimi trombociti in rano.
- Tip 2: adhezija biološke faze na umeten substrat, npr. adhezija celic na gojišča, nastanek biofilma na protetičnih pripomočkih ali insertih.
- Tip 3: adhezija umetnih materialov na biološki substrat, npr. adhezija sintetičnih hidrogelov na mehka tkiva (3).

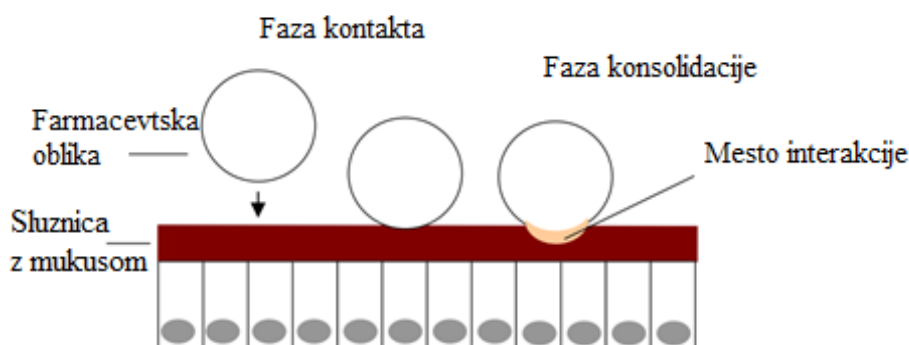
Slednji tip je tudi najpomembnejši na področju farmakoterapije, mehko tkivo kot substrat pa je običajno sluznica ali mukus. Bioadhezijo, kjer je kot substrat uporabljena mukozna membrana, imenujemo mukoadhezija (4).

1.2 Mehanizem in teorije mukoadhezivnosti

Mukoadhezija je zelo kompleksen pojav, zato obstaja več teorij, ki poskušajo razložiti zakaj in kako nekatere snovi izražajo mukoadhezivne lastnosti. Največkrat predpostavljene teorije so teorija močenja, teorija difuzije, teorija preloma, elektronska teorija in adsorpcijska teorija. Mukoadhezije ne moremo pojasniti samo z enim mehanizmom, najverjetneje je kombinacija večih.

Proces mukoadhezije v osnovi delimo na dve fazi: fazo kontakta in fazo konsolidacije, kar prikazuje Slika 1. Prva faza opisuje prvi stik med mukoadhezivom in mukozno membrano. V tej fazi pride do porazdelitve in nabrekanja formulacije ter posledično do globljega oz. bolj tesnega/tesnejšega kontakta s sluznico. Temu sledi faza konsolidacije, kjer se mukoadhezivni materiali navlažijo, kar omogoči mukoadhezivnim molekulam, da se povežejo z mukusom s

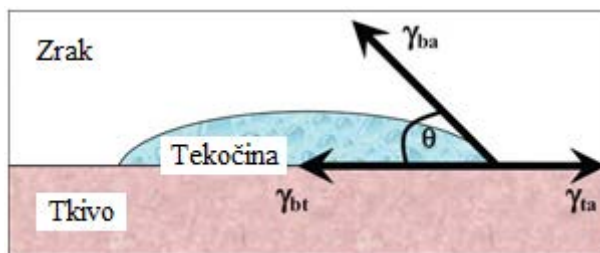
šibkimi van der Waalsovi vezmi, vodikovimi vezmi ali z interpenetracijo. Korak konsolidacije lahko natančneje razložimo s pomočjo teorije močenja in teorije difuzije (5, 6).



Slika 1: Prikaz poteka mukoadhezije farmacevtske oblike (Prirejeno po 5)

1.2.1 Teorija močenja

Teorija močenja je ena izmed najstarejših predpostavljenih teorij, ki opisujejo adhezijo. Uporablja se za opisovanje tekočih in nizko viskoznih bioadhezivov. Močenje je lastnost tekočine, ki predstavlja njeno afiniteto do površine oz. zmožnost, da se razleze čez dano površino. To afiniteto tekočine do površine lahko izmerimo s pomočjo merjenja stičnega kota (Slika 2). Teorija močenja adhezijo razloži kot proces, kjer adhezivna faza penetrira v nepravilnosti na površini substrata, se tam utrdi in ustvari adhezivna sidra. Ob tem predpostavlja, da manjši kot je stični kot mukoadhezivne tekočine s tkivom, večja je afiniteta in posledično večja mukoadhezivnost (5, 6).



Slika 2: Prikaz stika med tekočino in tkivom ter merjenje stičnega kota. γ_{bt} predstavlja površinsko napetost med polimerom in tkivom, γ_{ba} med polimerom in zrakom ter γ_{ta} med tkivom in zrakom (prirejeno po 6).

1.2.2 Teorija difuzije

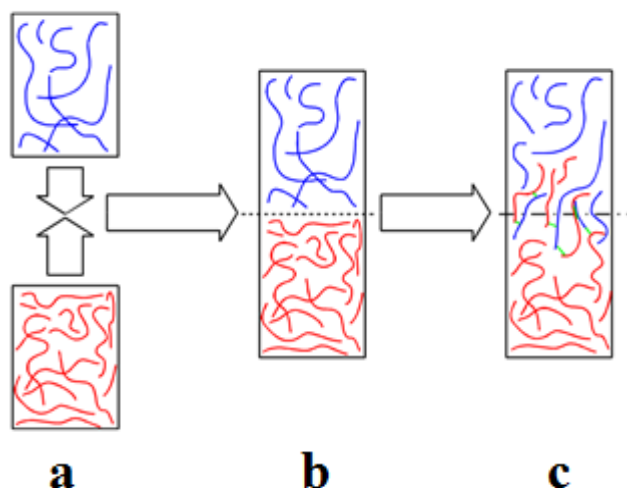
Teorija difuzije razloži, da je mukoadhezivnost posledica premreženja verig polimera in verig glikoproteina, ki je prisoten v mucinu. Sila adhezije se povečuje z obsegom in globino interpenetracije verig. Da pride do difuzije, je pomembno, da se prisotne snovi dobro raztapljajo v drugih oz. imajo podobno kemijsko strukturo. Večja kot je strukturna podobnost, močnejša

je lahko mukoadhezivna vez. Stopnja penetracije je odvisna od koncentracije polimera in mucina, difuzijskega koeficienta, fleksibilnosti in narave verig, mobilnosti polimernih verig ter kontaktnega časa. Koncentracijski gradient žene verige polimera v mukus in verige glikoproteina mucina v ogrodje polimera, dokler ne pride do ravnotežne globine (5) (Slika 3). Za učinkovito mukoadhezivno vez naj bi bila potrebna vsaj 0,2 – 0,5 µm globoka penetracija (1). Globino interpenetracije lahko ocenimo z Enačbo 1:

$$l = \sqrt{tD_b} \quad \text{Enačba 1}$$

kjer t kontaktni čas, D_b difuzijski koeficient bioadheziva skozi substrat in l globina interpenetracije.

Največja adhezijska sila polimera je dosežena, ko je globina interpenetracije približno enaka dolžini verige polimera. Študije so pokazale, da je kritična molekulska masa polimera, da lahko doseže interpenetracijo vsaj 100 kDa (5, 7).



Slika 3: Difuzijska teorija mukoadhezije: (a) zgornja plast (polimer) in spodnja plast (mukus) pred kontaktom; (b) zgornja in spodnja plast med prvim kontaktom; (c) zgornja in spodnja plast po daljšem kontaktu, v fazi konsolidacije (prirejeno po 5).

1.2.3 Teorija preloma

Teorija preloma se uporablja v študijah mehanskega merjenja mukoadhezije s pomočjo nateznih preskusov. Analiziramo namreč silo na površino, ki je potrebna, da ločimo dve med seboj adherirani površini (s_m). Izračunamo jo kot razmerje med maksimalno silo pred ločitvijo površin (F_m) in med skupno površino združenih površin v adhezivni interakciji (A_0) (Enačba 2):

$$s_m = \frac{F_m}{A_0} \quad \text{Enačba 2.}$$

Teorija preloma se osredotoča samo na silo, ki je potrebna, da ločimo dve površini, zato ne upošteva interpenetracije oz. difuzije polimernih verig. Predpostavlja, da se ob prelomu prekine vez med obema površinama, vendar se prelom običajno zgodi zaradi prešibkih kohezivnih sil znotraj šibkejšega od obeh materialov. Slabost te metode je torej, da je običajno izmerjena sila mukoadhezije lažno prenizka (5, 6).

1.2.4 Elektronska teorija

Z elektronsko teorijo opisujemo adhezijo, ki nastane zaradi prenosa elektronov med mukusom in mukoadhezivnim sistemom. Do prenosa elektronov pride zaradi razlike v nabojih med obema strukturama, kjer je ena struktura običajno pozitivno, druga pa negativno nabita. Prenos elektronov obeh plasti povzroči nastanek dvosloja električnih nabojev na površini med mukusom in mukoadhezivnim polimerom. Privlačne sile znotraj dvosloja ohranjajo mukoadhezivni kontakt med obema slojema (5, 6).

1.2.5 Adsorpcijska teorija

Pri adsorpcijski teoriji pride do adhezije zaradi različnih površinskih interakcij med adhezivnim polimerom in mukoznim substratom. Nastanejo lahko primarne ali sekundarne vezi. Primarne vezi nastanejo zaradi kemisorpcije in so posledica denimo ionskih, kovalentnih ali kovinskih vezi, vendar je ta način vezave nezaželen, saj je ireverzibilen. Sekundarne vezi so šibkejše, vendar je njihovo število zelo visoko, zato predstavljajo eno izmed najpogostejših oblik površinskih mukadhezivnih privlačnih interakcij. Njihova prednost je, da so reverzibilne. Primeri sekundarnih vezi so naprimer van der Waalove sile, vodikove vezi, pa tudi hidrofobne interakcije in elektrostatske privlačne (5, 6).

1.3 Mukoadhezija v farmaciji

Da se lahko zdravilne učinkovine (ZU) v telesu absorbirajo, morajo na nekaterih mestih preiti skozi mukozno površino oz. sluznico. Takšne površine lahko najdemo v očeh, ustih, v gastrointestinalnem traktu, nosu in vagini. Difuzija skozi njih je zelo pomemben farmakokinetični parameter. Zadrževanje zdravil na sluznici je običajno majhna, hitrost difuzije skozi mukozne površine pa omejena, kar lahko zniža biološko uporabnost zdravil. Čas, ki ga ima ZU, da se absorbira, je ključnega pomena in se glede na mesto aplikacije razlikuje. Naprimer pri okularni aplikaciji ima ZU manj kot dve minuti časa, preden pride do drenaže raztopine. Pri nekaterih peroralnih zdravilih je čas absorpcije lahko omejen s kratkim gastrointestinalnim tranzitnim časom. Z namenom povečanja biološke uporabnosti se lahko v

farmacevtskih oblikah uporabijo mukoadhezivi, ki imajo povečano afiniteto do mukoznih membran in se adherirajo na sluznice. Farmacevtske oblike (FO), ki so fizikalno ali kemijsko vezane na mukoadhezivno sredstvo, se tako posledično dlje časa zadržujejo na želenem mestu. Tam nastane večja lokalna koncentracija ZU, večji gradient ZU pa vodi do povečane absorpcije. Stik mukoadhezivnega sredstva z mukozno membrano lahko tudi povzroči povečanje permeabilnosti ZU z večjo molekulsko maso, kot so peptidi in proteini. S skrbno načrtovano mukoadhezijo lahko omogočimo specifično zadrževanje ZU na določenem mestu in tako dosežemo ciljno terapijo (1, 3, 8).

Uporaba mukadhezije v farmaciji je relativno nova, saj so se prve študije mukoadhezivnih materialov za povečanje biološke uporabnosti pojavile v 80. letih prejšnjega stoletja (8–11). Do sedaj je bilo narejenih že veliko raziskav na tem področju, glede na potencialna mesta mukoadhezije so se tekom let razvile različne farmacevtske oblike in dostavni sistemi:

- Bukalni dostavni sistemi (12),
- Podjezični dostavni sistemi (13),
- Vaginalni dostavni sistemi (14),
- Rektalni dostavni sistemi (15),
- Gastrointestinalni dostavni sistemi (15),
- Nazalni dostavni sistemi (16),
- Okularni dostavni sistemi (7),
- Ezofagalni dostavni sistemi (17).

Nobeden izmed dostavnih sistemov ni oficinalen in ga ne najdemo v farmakopejah.

1.3.1 Farmacevtske oblike

Tablete

Mukoadhezivne tablete so običajno majhne, ploščate in ovalne, s premerom okrog 5-8 mm. Ob stiku s sluznico se zmehčajo, adherirajo in ostanejo na mestu do raztopitve oz. dokler se ne sprostí vsa ZU. Mukoadhezivne tablete se lahko uporabljajo na različnih sluznicah – bukalno, podjezično, vaginalno in v gastrointestinalnem traktu. V gastrointestinalnem traktu lahko delujejo lokalno ali sistemsko, običajno s podaljšanim sproščanjem. Prednost mukoadhezivnih tablet je predvsem v povečani biološki uporabnosti in dolgotrajnem sproščanju, kar zmanjša število aplikacij in tako poveča sprejemljivost s strani bolnika (14, 15, 18, 19).

Filmi in obliži

Mukoadhezivni filmi in obliži so za razliko od tablet bolj upogljivi in udobni, v primerjavi z geli pa jih slina težje odplakne. Običajno se uporabljajo bukalno. Velik potencial

mukoadhezivnih filmov je dejstvo, da s filmom lahko prekrijemo rane v ustih, kar jih ščiti pred zunanjimi vplivi in bolj učinkovito zdravi bolezen. Idealni filmi so upogljivi, elastični in mehki, kljub temu pa ne razpadejo zaradi mehanskih obremenitev v ustih. Morajo se dobro adherirati na sluznico, njihovo nabrekanje pa ne sme biti preveliko, da ne povzročijo nelagodja (20, 21).

Poltrdne in tekoče farmacevtske oblike

Prednost poltrdnih farmacevtskih oblik, kot so npr. oralni geli, je predvsem njihova mazljivost, kar omogoča enostavno porazdelitev po sluznici. Za razliko od tablet ali filmov je težje zagotoviti njihovo natančno odmerjanje, slabše pa je tudi zadrževanje na mestu aplikacije. Glavni predstavniki te skupine so hidrogeli, med katerimi lahko nekateri gelirajo *in-situ*, uporabljajo pa se tudi mazila, ustne vodice in spreji (1, 12, 22).

1.4 Mukoadhezivni polimeri

Mukoadhezivni polimeri se na sluznico adherirajo z različnimi mehanizmi, izbiramo pa jih na podlagi mesta željene mukoadhezije, farmacevtske oblike in moči interakcije s sluznico. Njihova mukoadhezivnost je odvisna od številnih faktorjev:

- Hidrofilnost – hidrofilne skupine (hidroksi, karboksi) omogočajo tvorbo vodikovih vezi ter nabrekanja in imajo tako večjo možnost interakcije s sluznico.
- Molekulska masa – večja kot je molekulska masa, večja je možnost za interpenetracijo verig.
- Viskoznost – večja kot je viskoznost, daljši je čas zadrževanja na mestu aplikacije.
- Dolžina verige – dolžina verige mora biti dovolj dolga, da lahko pride do interpenetracije.
- Premreženost in nabrekanje – vpliva na mobilnost verig; manjša kot je premreženost polimera, večje je njegovo nabrekanje, večja stična površina in posledično večja mukoadhezija.
- Konformacija molekule – pri linearni konformaciji pride do močnejših interakcij v primerjavi s konformacijami, kjer so aktivne funkcionalne skupine težje dostopne.
- pH – mukoadhezija nekaterih polimerov temelji na ionskih interakcijah, zato je pomembno, da so ustrezno ionizirani.
- Koncentracija polimera – večja koncentracija polimera v trdnih oblikah izkazuje večje mukoadhezivne lastnosti. Pri poltrdnih in tekočih FO je potrebno najti optimalno koncentracijo, saj mukoadhezivnost po določeni koncentraciji doseže plato oz. se celo manjša (6, 22).

Mukoadhezivne polimere delimo na podlagi izvora na naravne in sintezne ter na podlagi naboja na kationske, anionske in neionske (Preglednica I). Med najbolj raziskane mukoadhezivne polimere prve generacije spadajo derivati poliakrilne kisline, kot so karbomeri in polikarbofili ter celulozni derivati, predvsem natrijeva karboksimetil celuloza (Na-CMC) in hidroksipropilmetil celuloza (HPMC). Derivati poliakrilne kisline svoje mukoadhezivne lastnosti izražajo v glavnem zaradi vodikovih vezi, celulozni derivati pa z ionskimi interakcijami. Od naravnih polimerov je bilo največ študij narejenih s hitosanom, hialuronsko kislino in različnimi gumiji. Mukoadhezivne polimere druge generacije imenujemo tudi citoadhezivi, zaradi njihove specifične vezave direktno na celice. Z njimi lahko dosežemo boljše ciljno sproščanje iz FO in daljši čas zadrževanja na mestu delovanja. V to skupino spadajo naprimer lecitini in tiolizirani polimeri, ki se vežejo na specifične ostanke ogljikovih hidratov. Tiolizirane hidrofilne polimere, kot so derivati poliakrilne kisline, hitosan in celulozni derivati, pripravimo tako, da jim uvedemo tiolno skupino, kar jim omogoči kovalentno vezavo s cisteinskimi ostanki na sluznici (7, 12, 22).

Preglednica I: Delitev polimerov glede na izvor in naboj ter primeri polimerov za vsako izmed skupin.

	Delitev	Primeri
Izvor	Naravni	agaroza, hitosan, želatina, hialuronska kislina, škrob, razni gumiji (guar, ksantan, gelan, karagenan, rožičevce, pektin, Na-alginat)
	Sintezni	Na-CMC, CMC, hidroksietil celuloza, hidroksipropil celuloza, derivati poliakrilne kisline (karbopoli, polikarbofili, poliakrilna kislina, poliakrilati), poloksameri, polivinil alkohol, polivinil pirolidon (PVP)
Naboj	Kationski	hitosan
	Anionski	hitosan-EDTA, karbopoli, karbofili, Na-alginat, Na-CMC, CMC, gumiji
	Neionski	hidroksietil škrob, hidroksipropil celuloza, polietilenoksid, polivinil alkohol, PVP

1.5 Mukoadhezivna zdravila na trgu

Trenutno se na različnih trgih že najdejo različna zdravila z mukoadhezivnim delovanjem, ki pa se večinoma osredotočajo na ustno votlino kot mesto adhezije. Najbolj razširjene so mukoadhezivne bukalne tablete, ki kot mukoadhezivne polimere uporabljajo različne pomožne snovi. V Preglednici II je zbranih nekaj primerov mukoadhezivnih FO na trgu.

Preglednica II: Pregled mukoadhezivnih FO na trgu.

Zdravilo	Zdravilna učinkovina	Farmacevtska oblika	Mukoadhezivni polimer
Sitamic 50 mg (23)	Mikonazol	Mukoadhezivne bukalne tablete	HPMC 2208
Corsodyl gel (12)	Kloreheksidinijev diglukonat	Oromukozni gel	HPMC
Corlan pellets/buccal tablets (12)	Hidrokortizon	Mukoadhezivne bukalne tablete	Akacija
Subutex sublingual tablets (12)	Buprenorfin	Podjezične tablete	PVP K30
Buccastem M Buccal tablets (12)	Proklorperazin	Mukoadhezivne bukalne tablete	PVP K30, ksantan gumi, gumi rožičevca
Striant SR (12)	Testosteron	Mukoadhezivne bukalne tablete	Carbomer 934P, HPMC, polikarbofil
Onsolis (ni več na tržišču od 2011) (24)	Fentanil	Bukalni film	CMC, hidroksietil celuloza, hidroksipropil celuloza, polikarbofil

1.6 Mukus

Mukus je viskozna, lepljiva tekočina, s kompleksno sestavo, ki jo izločajo čašaste celice sluznic in prekriva sluznice v obliki tankega gela debeline 50 – 450 um. (18) V različnih organskih sistemih ima različno vlogo. Zagotavlja lubrikacijo in hidracijo epitelijskega tkiva, predstavlja pomembno bariero za difuzijo hranilnih snovi, zdravilnih učinkovin in plinov, ter ščiti pred patogeni. Običajno je sestavljen iz vode (do 95 % m/m), mucina (< 5 % m/m), soli (~ 1 % m/m), ogljikovih hidratov in lipidov. Pri fiziološkem pH je mukus zaradi prisotnosti sialne kisline in sulfatnih ostankov negativno nabit, kar pomembno pripomore k bioadheziji. Glavna substanca, ki je odgovorna za viskozne, elastične in gelu podobne lastnosti ter ima sposobnost mukoadhezije so mucini. Mucini so glikoproteini z molekulsko maso med 0,5 do 20 MDa. So visoko glikozilirani in vsebujejo ~ 80 % ogljikovih hidratov, predvsem *N*-acetilgalaktozamin, *N*-acetilglukozamin, fukozo, galaktozo, sialno kislino (*N*-acetilnevraminska kislina) in sledi manoze ter sulfatov. Močno razvejane oligosaharidne verige so sestavljene iz 5-15 monomerov in se s proteinskim jedrom povezujejo preko O-glikozidne vezi, na hidroksilne stranske verige serina in treonina (18, 25, 26).

Za mukoadhezivne raziskave se velikokrat uporabljajo različne živalske sluznice (svinjski, zajčji, podganji želodec, črevesje, dvanajstnik, požiralnik, nosne ali ustne sluznice, itd), za reološke meritve pa se mukozni/mukusni gel postrga z različnih sluznic. Oboje je z laboratorijskega stališča nepraktično, obstajajo pa tudi določene etične dileme, kar je spodbudilo razvoj umetnih mukozo-mimetičnih materialov in komercialno dostopnih mucinov (27).

V zadnjih tridesetih letih je bilo narejeno več študij, kjer so raziskovalci korelirali mukoadhezivnost različnih mukozo-mimetičnih substratov s tkivi. V preteklosti so uporabljali predvsem komercialno dostopne polimere, kot so polivinil klorid in polimetil metakrilati, novosti pa se kažejo v sintezi novih mukozo-mimetičnih hidrogelov. Kot enega prvih mimetikov ustne sluznice so sintetizirali interpolimerne komplekse iz poliakrilne kisline in metilceluze, na katerih so izvajali poskuse z mukadhezivnimi tabletami (28). Kljub temu, da se ta hidrogel ni izkazal kot popoln mukozo-mimetik, so v nadaljevanjih te raziskave uspeli sintetizirati dva še boljša in sicer *N*-akriloilglukozamin in 2-hidroksietil metakrilat. V primerjavi s pravo sluznico sta oba pokazala zelo podobne mukoadhezivne rezultate in deformacijsko obnašanje ob odstranitvi tablet (27). Z zlivanjem vzorcev po steklu s kovalentno vezanimi hidrogeli, so dokazali tudi podoben retencijski čas vzorcev v primerjavi z želodčno svinjsko sluznico (29).

Na trgu obstajajo trije komercialno dostopni mucini v obliki praška, ki jih proizvaja Sigma-Aldrich. Razlikujejo se po izvoru, čistosti in vsebnosti vezane sialne kisline, ki je pri fiziološkem pH negativno nabita in ima lahko pomembno vlogo pri mukoadheziji (30) in sicer:

- Tip I-S – mucin iz goveje podčeljustne žleze slinavke, ki vsebuje 9 – 17 % vezane sialne kisline (31);
- Tip II – mucin iz svinjskega želodca, ki vsebuje ~1 % vezane sialne kisline (32);
- Tip III – mucin iz svinjskega želodca, ki vsebuje 0,5 – 1,5 % vezne sialne kisline, delno prečiščen prašek (33);

Kljub temu da je zgradba človeških in svinjskih sluznic podobna, (34) je bilo z reološkimi preiskavami rehidriranih različnih komercialno dostopnih mucinov ugotovljeno, da se njihove raztopine oz. disperzije ne obnašajo enako kot s sluznic pridobljen mukozni gel. Komercialno dostopni mucini tako ne morejo služiti kot dober model *in-vivo* pogojev. Eden izmed razlogov je ta, da se pri izolaciji fizikalno-kemijske lastnosti preveč spremenijo, mucini se razbijejo na manjše dele in rekonstitucija primarne strukture ni več možna (35). Ne glede na vrsto uporabljenega mucina in na veliko variabilnost ostalih eksperimentalnih pogojev in metod, so

številine študije pokazale, da interakcije med mucinom in različnimi polimeri nedvomno obstajajo. Nekatere interakcije je mogoče ovrednotiti tudi z reologijo (36).

1.7 Reologija

Reologija je interdisciplinarna veda, ki preučuje tok in deformacijo snovi, predvsem tekočin, poltrdnih snovi ter viskoelastičnih trdnih snovi. Pojem reologija je leta 1929 prvi opredelil prof. E.C. Bingham, medtem pa prvi zametki reologije izvirajo že iz 17. stoletja, ko je Robert Hooke na osnovi teorije elastičnosti izpeljal Hookov zakon (37). Tako v farmaciji kot v kozmetiki se je reologija izkazala za zelo pomembno, saj z njo proučujemo notranjo strukturo sistemov, spremljamo fizikalno stabilnost materialov in zdravil, vpliv temperature in njihovo kakovost tako pri vhodnih snoveh kot pri končnih izdelkih (38).

Osnovne reološke parametre lahko predstavimo s preprostim modelom dveh ravnih vzporednih plošč, med katerima imamo tekočino. Zgornjo ploščo premikamo z določeno silo F [N] in hitrostjo v [m/s], spodnja plošča pa miruje. Ob premikanju v tekočini nastane plastni laminarni tok posameznih plasti, ki so med seboj različno razmaknjene, glede na smer gibanja pa se gibljejo z različnimi hitrostmi (38).

Strižno napetost (τ) [Pa] opredelimo kot razmerje sile (F), ki deluje na ploskev (strižna sila) ter njeno površino (S) (Enačba 3).

$$\tau = \frac{F}{S} \quad \text{Enačba 3}$$

Strižna napetost je pri elastičnem obnašanju linearno sorazmerna s silo in snov se po razbremenitvi povrne v začetno stanje. Pri trdnih snoveh to opisuje Hookov zakon (Enačba 4):

$$\tau = \frac{F}{S} = G \times \theta \quad \text{Enačba 4}$$

Strižna napetost povzroči strižno deformacijo, ki jo podamo s kotom zasuka (θ) in je odvisna od odpornosti telesa na spremembo oblike (G). Če majhno povečanje zunanje sile povzroči večjo deformacijo in se ta ne povrne v prvotno stanje, govorimo o plastični deformaciji (37, 38).

Strižna hitrost ($\dot{\gamma} = D$) je ovrednotena kot razmerje med spremembo hitrosti v smeri y (dv) in razmikom med sosednjima tekočinskima plastema (dx) (Enačba 5) (37, 38).

$$D = \dot{\gamma} = \frac{dv}{dx} \quad \text{Enačba 5}$$

Dinamična viskoznost (η) je lastnost, ki predstavlja notranje trenje pri pretakanju tekočine oz. notranji upor proti strižni deformaciji. Dinamična viskoznost je določena kot razmerje med strižno napetostjo in strižno hitrostjo (Enačba 6).

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} [Pa \cdot s] \quad \text{Enačba 6}$$

Glede na spreminjanje viskoznosti ob različnih obremenitvah lahko tekoče snovi delimo na Newtonske oz. idealne in ne-Newtonske oz. realne sisteme. Pri Newtonskih je viskoznost neodvisna od delovanja sile na sistem in njenega trajanja, ampak je odvisna samo od temperature in atmosferskega tlaka. Ne-Newtonski sistemi so kompleksnejši, njihova viskoznost pa je odvisna od obremenitve (npr. jakosti, smeri). V nekaterih primerih je viskoznost odvisna tudi od časa delovanja mehanske sile na sistem – temu pravimo časovno odvisni sistemi. Časovno neodvisne sisteme delimo na psevodplastične, dilatantne in plastične, časovno odvisne pa na tiksotropne, reopeksne in viskoelastične (37, 38). (Preglednica III)

Preglednica III: Delitev ne-Newtonskih sistemov glede na njihovo časovno odvisnost.

	Vrsta sistema	Lastnosti
Newtonski sistemi	/	Viskoznost neodvisna od delovanja sile na sistem in njenega trajanja
Časovno neodvisni sistemi	psevodplastični	Viskoznost s povečano strižno obremenitvijo pada
	dilatantni	Viskoznost s povečano strižno obremenitvijo narašča
	plastični	Viskoznost s povečano strižno obremenitvijo pada, vendar snov steče šele pri določeni mejni (plastični) napetosti
Časovno odvisni sistemi	tiksotropni	Viskoznost pri isti obremenitvi s časom upada
	reopeksni	Viskoznost pri isti obremenitvi s časom narašča
	viskoelastični	Zelo kompleksni – kažejo viskozno in elastično obnašanje hkrati

1.7.1 Viskoelastične lastnosti snovi

Viskoznost (tudi plastičnost) in elastičnost sta dve osnovni lastnosti materialov, ki se kažeta kot odziv na delovanje različnih sil (npr. strižne, natezne, tlačne sile). Večina tekočin se obnaša kot realna tekočina, kar pomeni, da izkazuje tako elastične kot viskozne lastnosti, odvisno od strižnih pogojev in časa delovanja striga. Viskoelastične snovi imajo sposobnost, da del vstopajoče strižne energije shranijo (viskozna lastnost), del deformacije pa po odvzemu napetosti povrnejo (elastična lastnost) (37, 38).

Te kompleksne lastnosti snovi merimo z uporabo novejših viskozimetrov, ki omogočajo oscilacijske meritve (npr. amplitudni in frekvenčni preizkus), ki bistveno manj posegajo v notranjo strukturo vzorca med meritvijo in ne porušijo sekundarnih vezi. Vzorec izpostavimo stalnim, vendar različno velikim oz. hitrim strižnim silam, ki oscilirajo levo in desno. Če oscilacijo interpretiramo kot nihanje lahko strižno deformacijo opazimo kot vsiljeno nihanje.

Rezultat oscilacijske meritve so elastični modul G' , viskozni modul G'' in fazni zamik δ (37, 38).

Elastični modul G' (modul akumulacije energije, angl. *Storage modulus*) je v fazi z vsiljeno strižno deformacijo in predstavlja del energije, ki se shrani in povrne po obremenitvi (Enačba 7) (37).

$$G' = \frac{\tau_a}{\gamma_a} \cdot \cos\delta \quad \text{Enačba 7}$$

Viskozni modul G'' (modul energetskih izgub, angl. *Loss modulus*) je izven faze z vsiljeno strižno deformacijo in predstavlja del energije, ki se po obremenitvi ne povrne (Enačba 8) (37).

$$G'' = \frac{\tau_a}{\gamma_a} \cdot \sin\delta \quad \text{Enačba 8}$$

Fazni zamik (δ) je tangens razmerja viskoznega in elastičnega modula in zavzema vrednosti med 0° in 90° (Enačba 9) (37).

$$\tan\delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Enačba 9}$$

Amplitudni preizkus

Amplitudni preizkus je oscilacijska meritev, ki jo izvajamo pri konstantni frekvenci, kjer zvezno sinusoidno spreminjamo amplitudo strižne deformacije, merimo pa odziv, to je spremembo strižne napetosti. Amplitudni preizkus se najpogosteje uporablja kot prva meritev za opredelitev viskoelastičnih lastnost snovi, saj z njim določimo linearni viskoelastični odziv. Znano je, da je strižna deformacija takih snovi do neke kritične amplitude neodvisna od amplitude, nad kritično amplitudo pa se spremeni urejenost notranje strukture, kar vodi do nelinearnih, nepravilnih odzivov. Nadaljnje preizkuse, pri katerih spreminjamo frekvenco oscilacije izvajamo znotraj vnaprej določenega linearnega viskoelastičnega odziva, torej pri nižjih amplitudah kot je kritična amplituda (37).

Frekvenčni preizkus

Frekvenčni preizkus je oscilacijska meritev, ki jo izvajamo pri konstantni amplitudi strižne deformacije ali amplitudi strižne napetosti. Zvezno sinusoidno spreminjamo frekvenco oscilacije. Frekvenčni preizkusi se izvajajo znotraj zgoraj vnaprej določenega linearnega viskoelastičnega odziva, kot odziv oz. rezultat meritve pa dobimo odvisnost dinamičnih količin (G' , G'' , δ) od frekvence. Frekvenčna odvisnost dinamičnih količin viskoelastičnih materialov je lastnost snovi, ki nam omogoča sklepanje o tipu mikrostrukture proučevane snovi, jakosti vezi med strukturnimi elementi, stopnji geliranosti, premreženosti polimerov in podobno (37).

Časovni preizkus

Časovni preizkus je oscilacijska meritev, ki jo izvajamo pri konstantni strižni napetost in pri konstantni frekvenci, reološke parametre pa spremljamo kot funkcijo pretečenega časa. S časovnim testom spremljamo, kako se struktura snovi spreminja skozi čas, z njim pa lahko spremljamo procese kot so razpad ali regeneracija strukture, izhlapevanje topil ipd. (39).

1.8 Reološko vrednotenje mukoadhezije

In-vitro/ex-vivo metode določanja mukoadhezivnosti so za razvoj bioadhezivne FO ključnega pomena, saj pomagajo razumeti interakcijo in moč adhezije med formulacijo in mukozno membrano. S tem ključno pomagajo pri razumevanju permeabilnosti, sproščanja, stabilnosti, itd. (8). Za vrednotenje mukoadhezivnosti se raziskovalci poslužujejo veliko različnih *in-vitro* metod, ki običajno temeljijo na sili ločitve adhezivnih plasti, času retencije na tkivu, fluorescenci, spektroskopiji kot tudi na reoloških lastnostih formulacije (22, 30).

Različne viskoznosti polimerov in mucinov so posledica različnih verig molekul, medsebojnega prepletanja verig in medmolekularnih interakcij kot so vodikove, elektrostatične in hidrofobne vezi. Vse te interakcije lahko najdemo tudi pri procesu mukoadhezije, zato je smiselno sklepati, da bi jo lahko preiskovali z reološkimi meritvami. Prve reološke študije za proučevanje mukoadhezivnosti sta izvedla Hassan in Gallo (40) na Brookfieldovem viskozimetru, kjer sta ovrednotila več polimerov. Predpostavljala sta, da se energija fizikalnih in kemijskih vezi, ki nastanejo pri interakciji med mucinom in polimerom, lahko pretvori v mehansko energijo ali delo. Delo povzroči prerazporeditev makromolekul, le-ta pa je podlaga za spremembo viskoznosti, ki jo lahko pripišemo mukoadheziji. Enostavno povedano, viskoznost zmesi polimera in mucina se poveča v primerjavi z vsoto viskoznosti posamičnih komponent. To povečanje je posledica dodatnih interakcij med komponentama, torej mukoadhezije. Viskoznost sistema mucin-polimer sta razdelila na različne komponente (Enačba 10) (8).

$$\eta_t = \eta_m + \eta_p + \eta_b \quad \text{Enačba 10}$$

η_t je viskoznostni koeficient sistema, η_m in η_p pa sta viskoznostna koeficienta mucina oz. polimera. η_b je prispevek mukoadhezije in se izračuna po Enačbi 11 (8).

$$\eta_b = \eta_t - \eta_m - \eta_p \quad \text{Enačba 11}$$

Pri tem je ključno, da so vse meritve izvajanje pri enakih pogojih. Glavna kritika te metode je porušitev strukture mucina in polimera zaradi uporabe rotacijskega Brookfieldovega viskozimetra. Da bi se izognili porušitvi strukture, so se začele uporabljati oscilacijske metode,

ki vzorcev ne porušijo, izmerijo pa tako viskozni (G'') kot elastični odziv (G') vzorca. Z isto predpostavko, da je reološki odziv zmesi polimer-mucin večji kot vsota njunih posameznih odzivov, se je vpeljal parameter, imenovan reološki sinergizem, ki ga opisuje Enačba 12 (8):

$$\Delta G' = G'_{\text{mešanica}} - [G'_{\text{polimer}} + G'_{\text{mucin}}] \quad \text{Enačba 12}$$

Reološki sinergizem se lahko izračuna tako za G' , G'' ali za kompleksno viskoznost, člene v enačbi pa ustrezno nadomestimo. Za izračun reološkega sinergizma je potrebno narediti dve različni meritvi, najprej amplitudni test, nato pa še frekvenčni test. Z amplitudnim testom pri konstantni frekvenci spreminjamo obremenitev vzorca in spremljamo odziv modulov. Iz grafa določimo območje, v katerem je viskoelastičen odziv linearen in si določimo amplitudno obremenitev, pri kateri bomo izvajali frekvenčni test. Rezultate pridobljene s frekvenčnim testom uporabimo za izračun reološkega sinergizma. Reološki sinergizem ($\Delta G'$) lahko izrazimo tudi v relativni obliki ($\Delta G'_{\text{relativni}}$) in sicer primerjamo, kolikokrat večji odziv dobimo pri mešanici polimer-mucin v primerjavi s samim polimerom (Enačba 13) (8):

$$\Delta G'_{\text{relativni}} = \frac{\Delta G'}{G'_{\text{polimer}}} = \frac{G'_{\text{mešanica}} - (G'_{\text{polimer}} + G'_{\text{mucin}})}{G'_{\text{polimer}}} \quad \text{Enačba 13}$$

Relativna oblika sinergizma naleti na matematično težavo, saj je najmanjša vrednost, ki jo lahko dosežemo -1, medtem ko gredo lahko pozitivne vrednosti v neskončnost. Vrednost relativnega sinergizma je torej odvisna predvsem od vrednosti G' polimera. Težavo se da rešiti z vpeljavo logaritmskega razmerja modula ($\log G'$), ki je podan kot razmerje med logaritmom modula mešanice ($G'_{\text{mešanica}}$) in modula polimera (G'_{polimer}) (Enačba 14) (8):

$$\log G' = \log \left(\frac{G'_{\text{mešanica}}}{G'_{\text{polimer}}} \right) \quad \text{Enačba 14}$$

Ta parameter da pozitivnim in negativnim vrednostim enako težo in jih naredi med seboj bolj primerljive (8).

Vendar, kaj pomeni primerljivo? Študije so pokazale, da je primerjanje in razvrščanje mukoadhezivnih lastnosti različnih polimerov na podlagi različnih študij zapleteno. Eden izmed razlogov je ta, da ne vemo, na podlagi česa bi polimere primerjali. Ali pripravimo vse polimere v isti koncentraciji ali jih pripravimo v takšnih, da imajo med seboj primerljive reološke lastnosti (npr. viskoznost), torej v različnih koncentracijah? Različni polimeri interagirajo z mucinom tudi po drugačnih mehanizmih, kar se lahko odraža v drugačnih reoloških interakcijah. Tudi metode priprave vzorcev so si med študijami zelo različne. V nekaterih se uporabljajo različni komercialno dostopni mucini, ki imajo sicer manjšo variabilnost med serijami, vendar ne izkazujejo podobnih reoloških lastnosti kot naravni mucin. Spet druge uporabljajo sveže prečiščen mucin živalskega izvora. Z različnimi načini prečiščevanja lahko

pri nekaterih pogojih pride do denaturacije proteinov, z mehansko ekstrakcijo pa lahko zmanjšamo dolžino polimernih verig, oboje lahko močno vpliva na dobljene rezultate. Kljub temu, da je sveže prečiščen mucin reološko bolj podoben naravnemu mucinu, že njegov izvor pove, da ima večjo variabilnost. Z merjenjem istih polimerov, z uporabo različnih metod medsebojnega primerjanja, različnih priprav vzorcev in uporabo različnih vrst mucina lahko pridemo do različnih razvrstitev polimerov po sposobnosti mukoadhezije. Tudi uporaba različnih sinergističnih parametrov lahko pomembno vpliva na razvrstitev, kar interpretacijo rezultatov še dodatno otežuje. Kljub temu, da je več študij pokazalo korelacijo med mukoadhezivnostjo nekaterih polimerov z uporabo reoloških metod in metod natezne trdnosti, uporaba reologije kot edine metode za določanje mukoadhezivnosti ni priporočljiva (36, 41).

1.9 Načrtovanje eksperimentov

Načrtovanje eksperimentov (DoE – angl. *Design of Experiments*) je pristop, kjer načrtujemo eksperimente z namenom, da nam izvedeni poskusi dajo maksimalno količino uporabnih podatkov. Cilj tega pristopa je postaviti matematični model, ki nam omogoča napovedovanje in interpretacijo rezultatov ter optimizacijo procesov in parametrov. DoE se uporablja v zelo različnih panogah, od farmacevtske in kemične, do živilske, železarske, komunikacijske, itd. Uporablja se za razvoj in optimizacijo izdelkov in procesov, za zmanjšanje onesnaževanja in stroškov, kot tudi za testiranje robustnosti in reševanje. Reševanje se uporablja za identifikacijo najbolj vplivnih faktorjev (npr. količino sestavin, procesne parametre) v določenem procesu in nam določi območje, v katerem je ta faktor smiselno preiskovati. Sledi faza optimizacije, katere cilj je predvideti vse odzive znotraj preiskovanega območja in določiti takšno kombinacijo vrednosti faktorjev, ki nam dajo želen oz. optimalen rezultat. Pri testiranju robustnosti želimo ugotoviti, kako se izdelek ali proces obnaša pri majhnih spremembah faktorjev, ter mu tako določimo območja večje robustnosti in temu primerno spremenimo specifikacije izdelka ali procesa. Za načrtovanje eksperimentov si je potrebno najprej določiti število faktorjev, ki jih bomo spreminjali in njihovo območje, potem pa odzive, ki jih bomo spremljali in določiti cilj, kaj želimo z modelom doseči (npr. specifikacijsko območje). Na podlagi števila preučevanih faktorjev lahko izvedemo delne, popolne ali sestavljene večfaktorske načrte, nato pa izvedemo eksperimente v skladu z načrtom. Zbrane podatke s pomočjo regresije analiziramo in postavimo model, ki nam pove, kateri faktorji so pomembni, kako se med seboj povezujejo in vplivajo na odzive. Rezultate lahko prikažemo z grafom z izočrtami, ki jasno vizualizira vpliv posameznih faktorjev, z njegovo pomočjo pa lažje izberemo ustrezne pogoje za pridobitev želenih rezultatov (42).

2 NAMEN

V magistrski nalogi bomo razvili reološko metodo, s katero bomo vrednotili mukoadhezivnost različnih tekočih formulacij. Mukoadhezivnost bomo merili z oscilacijskimi preizkusi z reometrom na podlagi reološkega sinergizma. Za vsak vzorec bomo naredili amplitudni test, nato pa v linearnem območju odziva še frekvenčni test. Najprej bomo izdelali vzorce z različnimi potencialno mukoadhezivnimi polimeri in sicer: Carbopol 974P, Noveon AA-1, PVP-K90, Avicel RC-591, Maldex 150 ter disperzije z različnimi koncentracijami mucina tipa II. Iz vzorcev in disperzij bomo naredili zmesi v različnih razmerjih in z različnimi končnimi koncentracijami mucina v zmesi. Tako bomo preučili vpliv redčenja in koncentracije mucina na reološki sinergizem. Preiskali bomo tudi, ali sta dve različni seriji mucina med seboj primerljivi in na primeru PVP-K90 proučili, kakšen je vpliv koncentracije polimera na reološki sinergizem. Z dvema izbranimi polimeroma bomo z načrtovanjem eksperimentov izdelali vzorce in preučili vpliv Avicela RC-591 in Maldexa 150 ob združitvi z mucinom na reološke parametre ter reološki sinergizem. S časovnim testom bomo najprej preverili, kako se DoE vzorci obnašajo v odvisnosti od časa, da bomo temu primerno prilagodili metodo. Avicel RC-591 namreč izrazuje tiksotropijo, torej od časa spreminjajoče se reološke lastnosti. Na podlagi rezultatov bomo izdelali model vpliva obeh faktorjev (količine Avicela RC-591 in količine Maldexa 150) na reološke parametre (G' , G'') in reološki sinergizem ter poskušali prepoznati specifično interakcijo z mucinom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Mikrokristalna celuloza in natrijeva karboksimetil celuloza (Avicel RC-591)

Avicel RC-591 je mešanica dveh netoksičnih materialov, torej mikokristalne celuloze in natrijeve karboksimetil celuloze, v ustreznem razmerju. Avicel RC-591 vsebuje 8,3-13,8 % Na-CMC (43). Je bel ali sivkasto bel higroskopen prašek brez vonja in okusa, ki v vodi ob dispergiranju tvori gel ali belo motno disperzijo. Uporablja se za pripravo tiksotropnih gelov, za stabilizacijo emulzij in suspenzij, kot sredstvo za uravnavanje viskoznosti in za preprečevanje sedimentacije. V farmacevtski in kozmetični industriji se uporablja za pripravo nosnih sprejev, topikalnih sprejev in losjonov, oralnih suspenzij, emulzij, krem in gelov (44, 45).

Karbomer (Carbopol 974P)

Karbomeri so beli, voluminozni, higroskopni, kisli praški z značilnim vonjem. So sintetični polimeri akrilne kisline, premrežene z alil sukrozo, alil etrom ali pentaeritritolom. Vsebujejo med 52 in 68 % karboksilnih skupin, različni tipi pa se med seboj razlikujejo po viskoznosti, tipu polimera in polimerizacijskih topilih. Pri tekočih in poltrdnih pripravkih se uporabljajo za pripravo krem, mazil, losjonov in gelov za očesno, rektalno, topikalno ter vaginalno uporabo. Karbomeri, ki imajo nižje ostanke topil (s črko P za številko v imenu, npr. Carbopol 974P) se lahko uporabljajo tudi v peroralnih pripravkih, suspenzijah, kapsulah in tabletah. Pri trdnih FO je njihova vloga uravnavanje sproščanja in vezivo, v tekočih oz. poltrdnih pa ga uporabljamo za stabilizacijo emulzij in suspenzij, kot zgoščevalo in bioadhezivno sredstvo. Karbomeri v vodi tvorijo kisle koloidne disperzije, ki jih je potrebno nevtralizirati, da nastane viskozen gel. Karbomeri so nekompatibilni s fenolom, kationskimi polimeri, močnimi kislinami in z visokimi koncentracijami elektrolitov (44, 45). V študijah na področju mukoadhezije se največ uporabljata Carbopol 974P in 934P, ki imata pri enakih koncentracijah zelo podobne reološke lastnosti, razlika med njima pa je v polimerizacijskem topilu (46, 47).

Polikarbofil (Noveon AA-1)

Noveon AA-1 je sestavljen iz belih do kremno belih zrn z značilnim vonjem. Polikarbofil je sintetični polimer akrilne kisline, premrežen z divinil glikolom, ki je netopen v vodi, vendar nabreka do 1000x svojega volumna. V farmacevtski industriji se v nizkih koncentracijah (pod

1 %) uporablja kot sredstvo za zgoščevanje, uporablja pa se tudi kot adsorbent, emulgator, sredstvo za suspendiranje, uravnavanje sproščanja in vezivo pri tabletiranju. Ima zelo dobre bioadhezivne lastnosti pri bukalni, očesni, nazalni, vaginalni in rektalni aplikaciji. Polikarbofil v vodi tvori kisle koloidne disperzije, ki jih je potrebno nevtralizirati, da nastane viskozen gel. Nekompatibilnost s kationskimi polimeri, močnimi kislinami in elektroliti se kaže v zmanjšani viskoznosti gela (44, 45).

Polivinilpirolidon K90 (PVP-K90)

PVP-K90 je bel ali blede rumenkast higroskopen prah, z rahlim značilnim vonjem. Polivinilpirolidon je linearni sintetični polimer iz *N*-vinil-2-pirolidinona, število povezanih monomernih enot pa nam poda K-vrednost ob imenu. Večja K-vrednost pomeni večjo stopnjo polimerizacije in višjo viskoznost vodne raztopine. PVP-K90 ima molekulsko maso med 1.000.000 in 1.500.000 g/mol in se uporablja kot vezivo v tabletah in zrnih, kot stabilizator v peroralnih, oralnih in dermalnih suspenzijah ter kot zgoščevalo v etanolno-vodnih peroralnih raztopinah (44, 45).

Maltodekstrin (Maldex 150)

Maldex 150 je bel higroskopen prašek brez vonja, topen v vodi in sladkega okusa. Kemijsko je zmes glukoze, oligosaharidov in polisaharidov iz D-glukoznih enot, ki so povezani z 1,4- α in 1,6- α glikozidnimi vezmi. Pri tabletah se uporablja kot polnilo in vezivo, kot korigens okusa, pri tekočih formulacijah pa za povečanje viskoznosti in preprečevanje kristalizacije v sirupih (44, 45).

Brezvodna glukoza

Brezvodna glukoza je glukoza brez kristalno vezane vode z empirično formulo $C_6H_{12}O_6$. Je bel prah s sladkim okusom, brez vonja. Uporablja se kot pomožna snov za pripravo in uravnavanje osmolarnosti raztopin za injekcije in intravenske infuzije ter kot vezivo in polnilo pri FO za peroralno uporabo (44, 45).

Citronska kislina monohidrat

Brezbarvni ali beli kristali močno kislega okusa in brez vonja z empirično formulo $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$. V farmacevtski industriji se uporablja kot sredstvo za uravnavanje kislosti, kelator, kot korigens okusa in antioksidant (44, 45).

Natrijev citrat dihidrat

Brezbarvni kristali, zrnca ali bel prašek slanega okusa in brez vonja z empirično formulo $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$. V farmacevtski industriji se uporablja kot sredstvo za uravnavanje kislosti, kelator ali kot korigens okusa. Nekompatibilen je z močnejšimi antioksidanti, uporablja pa se tudi kot antikoagulant (44, 45).

Dinatrijev EDTA

Bel kristaliničen prašek brez vonja in z rahlo kislim okusom z empirično formulo $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$. Uporablja se kot kelator več valentnih ionov in je nekompatibilen z močnimi oksidanti, bazami in polivalentnimi kovinami (44, 45).

Kalijev sorbat

Kalijev sorbat je kalijeva sol sorbinske kisline. Je bel ali skoraj bel kristaliničen prah z značilnim vonjem z empirično formulo $C_6H_7O_2K$. Uporablja se kot konzervans s protibakterijskim in protiglivičnim delovanjem pri peroralnih in topikalnih formulacijah, predvsem pri tistih, ki vsebujejo neionske surfaktante (44, 45).

Natrijev hidroksid

Bela ali skoraj bela trdna snov v obliki večjih pelet, kosmičev ali paličic. Na zraku veže nase vodo in ogljikov dioksid. Je zelo kavstičen, v farmacevtskih pripravkih pa se uporablja kot sredstvo za uravnavanje pH. Kot močna baza s kislinami tvori soli (45).

Polisorbat 80

Polisorbat 80 je rumena, viskozna tekočina oljnega videza z značilnim vonjem in rahlo grenkim okusom. Je zmes delnih estrov polioksietiliranega sorbitana z maščobnimi kislinami, iz številke za imenom pa lahko sklepamo na število acilnih in oksietilenskih skupin. Je hidrofilna neionska površinsko aktivna snov, uporablja pa se kot emulgator pri pripravi O/V emulzij in kot solubilizator pri peroralnih in parenteralnih suspenzijah (44, 45).

Glicerol

Glicerol je bistra, viskozna, brezbarvna, higroskopna tekočina brez vonja, ki je sladkega okusa in ima empirično formulo $C_3H_8O_3$. V farmacevtski industriji in kozmetologiji se uporablja kot vlažilec, emoliens, topilo za perenteralne FO, pri peroralnih FO pa kot topilo, sladilo in

zgoščevalo. Uporablja se tudi kot plastifikator pri filmskih oblogah in pri pripravi mehkih želatinskih kapsul in globul. Pri lokalni uporabi deluje tudi protiglivično in protimikrobno (44, 45).

Mucin (iz prašičjega želodca, tip II)

Komercialno dostopen mucin tipa II, proizvajalca Sigma-Aldrich je neprečiščen rumenkast prašek z značilnim vonjem, pridobljen iz svinjskega želodca. Raztopine oz. disperzije v vodi so svetlo rumene do temno rjave, odvisno od koncentracije. Vsebnost sialne kisline v mucinu tipa II je manjša kot 1,2 % (32).

Prečiščena voda (Lek d.d.)

Prečiščena voda za uporabo v farmacevtski industriji iz sistema Lek d.d.

3.2 Aparature

- Čaše (20-2000 mL)
- Kovinske žličke
- Steklene palčke
- Kapalke
- Čolnički za tehtanje
- Merilne pipete (1 mL, 2 mL)
- Parafilm®
- Tehnica VIBRA AJP, Shinko Denshi, Japonska
- Analitska tehnica METTLER TOLEDO AX205 DR, Mettler Toledo, Švica
- Magnetno mešalo Yellow line MST digital, IKA, Nemčija
- Grelnik C-MAG HP 7, IKA, Nemčija
- Propelersko mešalo Eurostar power-b, IKA-WERE, Nemčija
- Rotacijski reometer Haake Rheostress RS75, Thermo Scientific, ZDA, geometrija stožec (premer 60 mm, 2°), plošča (premer 60 mm)
- Homogenizator ULTRA-TURRAX T18, IKA, Nemčija

3.3 Metode

3.3.1 Metode priprave vzorcev

Vsi vzorci z mukoadhezivnim polimerom imajo enako kvalitativno sestavo, kot je navedeno v Preglednici IV.

Preglednica IV: Kvalitativna sestava vzorcev z mukoadhezivnim polimerom

Surovina
Mukoadhezivni polimer
Brezvodna glukoza
Maldex 150
Dinatrijev EDTA
Citronska kislina monohidrat
Natrijev citrat dihidrat
Polisorbat 80
Aroma
Glicerol
Kalijev sorbat
Prečiščena voda

Kot mukoadhezivne polimere smo uporabili naslednje snovi: Carbopol 974P, Noveon AA-1, PVP-K90, Avicel RC-591 in Maldex 150. Pripravljeni vzorci se med seboj razlikujejo le po uporabljenem polimeru, ostale komponente pa se niso spremenile ali pa so bile spremembe za naše raziskave nerelevantne, npr. druga aroma. Pri vzorcih, ki vsebujejo Carbopol 974P ali Noveon AA-1 kot polimer, smo brezvodno glukozo, Maldex 150 in glicerol predhodno raztopili v delu vode in pripravljeno raztopino uporabljali pri nadaljnji pripravi vzorcev. Razlog je bil dolg čas raztapljanja velikih količin sladkorjev v majhni količini vode. Vzorce, ki smo jih uporabljali za namene DoE in vzorce s PVP-K90, smo pripravili brez uporabe predhodno narejenih sladkornih raztopin, sladkorje smo dodajali med postopkom priprave.

Ker je v sestavi uporabljena zelo majhna količina polisorbata 80, smo za natančno tehtanje, pripravili 100 g 1,0 % recepturne olajšave polisorbata 80 v vodi. Raztopino smo pripravili z mešanjem na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi do raztopitve. Raztopino smo po vsaki uporabi zaprli z aluminijasto folijo, zatesnili s parafilmom in shranili v hladilniku do nadaljnje uporabe. Uporabljala se je največ en mesec, nato se je zavrgla in naredila nova.

Vse sestavine so bile natehtane na tehtalne čolničke ali v čaše in ustrezno kvantitativno prenesene. Pri 1000 g vzorcih smo uporabljali 2 L čašo, pri 500 g vzorcih pa 800 mL čašo. Propelersko mešalo smo namestili navpično nad čašo tako, da je mešalo segalo približno 3 cm od dna čaše. Hitrost mešanja oz. število obratov na minuto smo prilagajali glede na dodane

pomožne snovi, da je pri mešanju nastajal enakomeren vrtnec, v katerega smo postopoma dodajali ekscipiente. Pri homogeniziranju z Ultraturraxom smo uporabljali nastavek 18 in ga navpično potopili v vzorec, da je segal do globine okrog 1 cm od dna čaše. Pomožne snovi smo dodajali v predpisanem vrstnem redu in jih mešali predpisan čas. Če se katera izmed pomožnih snovi v predpisanem času še ni raztopila ali dispergirala, smo mešali do raztopitve ali dispergiranja in to ustrezno zapisali.

Vsi vzorci so bili narejeni pri sobni temperaturi okrog 23°C, razen če je pri pripravi vzorca napisano drugače (npr. segrevanje pri raztapljanju sladkorjev).

3.3.2 Priprava vzorcev s Carbopol 974P (0,8 in 1,2 %) in Noveon AA-1 (0,8 %) kot polimerom

Ker so dobre mukoadhezivne lastnosti Carbopola 974P in Noveona AA-1 že dobro znane (48), smo želeli proučiti, kako se njuna mukoadhezivnost izraža v reoloških lastnostih. Želeli smo ju uporabiti kot pozitivno kontrolo oz. za določitev vrednosti reoloških sinergizmov, ki jih imajo dokazano mukoadhezivni polimeri. Pripravljeni vzorec je imel sestavo navedeno v Preglednici V.

Preglednica V: Sestava vzorcev s Carbopolom 974P in Noveonom AA-1 kot mukoadhezivnim polimerom

Surovina	Količina	Enota
Carbopol 974P ali Noveon AA-1	8,00/12,00	g
Brezvodna glukoza	100,00	g
Maldex 150	260,00	g
Dinatrijev EDTA	0,50	g
Citronska kislina monohidrat	1,50	g
Natrijev citrat dihidrat	0,50	g
Polisorbat 80	0,10	g
Aroma	5,00	g
Glicerol	50,00	g
Kalijev sorbat	2,00	g
2M NaOH	ad pH 4,5	mL
Prečiščena voda	ad 1000,00	g

Priprava vzorcev:

- Faza 1: Vzorce smo pripravili tako, da smo v del vode med dispergiranjem s propelerskim mešalom počasi dodajali Carbopol 974P ali Noveon AA-1, dokler se ni dispergirala.

- Faza 2: V manjšem delu vode smo med mešanjem z magnetnim mešalom raztopili predpisano količino dinatrijevega EDTA, citronsko kislino, natrijev citrat in aromo z okusom češnje, da smo dobili bistro raztopino.
- Faza 3: V manjši del vode smo med mešanjem z magnetnim mešalom raztopili predpisano količino kalijevega sorbata.
- V ustrezno preračunano količino predhodno pripravljene raztopine brezvodne glukoze in Maldexa 150 v vodi in glicerolu smo med mešanjem z propelerskim mešalom postopoma dodali fazo 1, fazo 2, ustrezni del recepturne olajšave polisorbata 80 in fazo 3. Zmes smo mešali do nastanka raztopine homogenega videza.
- pH smo z 2M NaOH ob mešanju naravnali na vrednost 4,5, da je prišlo do geliranja.
- Vzorec smo dopolnili do predpisane mase z prečiščeno vodo in mešali še 10 minut s propelerskim mešalom.
- Vzorec smo prekrili za aluminijasto folijo, zatesnili s parafilmom in shranili v hladilniku za nadaljnjo uporabo.

3.3.3 Priprava vzorcev s PVP-K90 (7, 10, 14 %) kot polimerom

Priprava vzorcev s PVP-K90 se od priprave vzorcev s Carbopolom 974P ali Noveonom AA-1 ne razlikuje. Izpustili smo le fazo nevtralizacije, saj PVP-K90 ne potrebuje specifičnega pH za geliranje oz. za povečanje viskoznosti. Izdelali smo 500 g vzorca (Preglednica VI).

Preglednica VI: Sestava vzorcev s PVP-K90 kot mukoadhezivnim polimerom

Surovina	Količina	Enota
PVP-K90	35/50/70,00	g
Brezvodna glukoza	50,00	g
Maldex 150	130,00	g
Dinatrijev EDTA	0,25	g
Citronska kislina monohidrat	0,75	g
Natrijev citrat dihidrat	0,25	g
Polisorbat 80	0,05	g
Aroma	2,50	g
Glicerol	25,00	g
Kalijev sorbat	1,00	g
Prečiščena voda	Ad 500,00	g

3.3.4 Izdelava vzorcev z načrtovanjem eksperimentov

Z računalniškim programom MODDE smo izdelali načrt eksperimentov, s katerim smo variirali dva faktorja – količino Avicela RC-591 in Maldexa 150 v formulaciji. Uporabili smo popoln dvofaktorski načrt, ki smo ga razširili, za primer, če bi se naš model obnašal kvadratno in ne

linearno. S takšnim rešetanjem smo želeli ugotoviti, kateri izmed dveh faktorjev (količina Avicela RC-591 in količina Maldexa 150) močnejše vpliva na mukoadhezivne interakcije z mucinom oz. kateri izkazuje večji reološki sinergizem. V ta namen smo v modelu spremljali reološke parametre G' , G'' ter reološki sinergizem. Količino Avicela RC-591 in Maldexa 150 smo povečali (+) in/ali zmanjšali (-) za 50 %, vzorec s ciljanima vrednostima (0) (005D in 006D) pa smo izdelali dvakrat, ker služita kot centralni točki in sta merili eksperimentalne napake oz. ponovljivosti metode. Program nam je izdelal načrt eksperimentov in določil naključni vrstni red priprave vzorcev (Preglednica VII), da smo se izognili vplivu zunanjih dejavnikov, ki lahko vplivajo na potek eksperimentov, in vključili napake, ki jih naredimo pri izdelavi vzorca. Izdelali smo 500 g vsakega vzorca s sestavo prikazano v Preglednici VIII. Pri vseh vzorcih smo uporabljali enak postopek priprave z enakimi čašami, mešali in vrstnim redom dodajanja snovi.

Preglednica VII: Vrstni red priprave DoE vzorcev in variirani faktorji v vzorcih

Vzorec	Vrstni red priprave	Avicel RC-591	Maldex 150
001D	4.	+	+
002D	6.	+	0
003D	2.	+	-
004D	8.	0	+
005D	9.	0	0
006D	10.	0	0
007D	7.	0	-
008D	3.	-	+
009D	5.	-	0
010D	1.	-	-

Preglednica VIII: Sestava vzorcev narejenih po DoE

Surovina	Količina	ME
Avicel RC-591	5,00/10,00/15,00	g
Maldex 150	195,00/260,00/390,000	g
Brezvodna glukoza	50,00	g
Dinatrijev EDTA	0,25	g
Citronska kislina monohidrat	0,75	g
Natrijev citrat dihidrat	0,25	g
Polisorbat 80	0,05	g
Aroma	2,50	g
Glicerol	25,00	g
Kalijev sorbat	1,00	g
Prečiščena voda	ad 500,00	g

Priprava vzorcev:

- Faza 1: V del vode smo med dispergiranjem s proplereskim mešalom počasi dodajali Avicel RC-591, dokler se ni dispergiral. Nato smo to disperzijo 30 minut homogenizirali z Ultraturraxom.
- Faza 2: Enako kot pri zgornjih vzorcih smo pripravili raztopino dinatrijevega EDTA, citronske kisline, natrijevega citrata in arome sladke pomaranče.
- Faza 3: Pripravili smo raztopino kalijevega sorbata.
- Suspenzijo (faza 1) smo segreli na 50 °C na električnem grelniku, da so se sladkorji hitreje raztopili ter med stalnim mešanjem postopoma dodajali Maldex 150 do raztopitve, nato pa smo postopoma dodali še brezvodno glukozo. V fazo 1 smo med mešanjem dodali fazi 2 in 3.
- Po ohlادitvi smo vzorce dopolnili do predpisane mase in jih ustrezno shranili v hladilniku pred združitvijo z mucinom.

3.3.5 Priprava vzorcev mucina

Priprave vzorcev mucina se med različnimi študijami razlikujejo, saj trenutno še ni poenotenega načina priprave mucina, ki bi dal relevantne rezultate ne glede na vrsto uporabljenega mukoadhezivnega polimera. Največja razlika pri pripravi vzorcev mucina se pojavi na podlagi izvora – glede na to ali je mucin pridobljen svež, iz tkiva, ali komercialno dostopen v obliki praška. Nekatere študije so svež mucin uporabljale brez predhodne obdelave (35), drugod so ga pred uporabo še prečistili. Za prečiščenje naravnega mucina sta se večinoma uporabljali metodi po Fogg s sodelavci (36, 49) ali po Mortazavi s sodelavci (50-54). Prednost komercialno dostopnih mucinov je njihova manjša variabilnost med serijami, vendar mnoge študije, ki so uporabljale iste mucine, med seboj niso popolnoma primerljive zaradi različnih priprav vzorcev. V študijah je možno zaslediti uporabo vseh treh različnih tipov, prevladujeta pa tip II (40, 54–57) in tip III (41, 47, 54, 58–62). Neposredna primerjava obeh pri določanju reološkega sinergizma še ni bila raziskana, z obema pa so bile pri različnih polimerih opažene reološke interakcije oz. reološki sinergizmi. Uporabljeni mediji za dispergiranje mucina so bili voda (47, 54-56, 58, 59, 61, 62) simuliran želodčni sok z in brez pepsina (58, 59), 0,1 M HCl, 0,1 M acetatni pufer (40) ali fosfatni pufer s pH 6,6 (57). Študije so pokazale, da imajo lahko ioni in pH pomemben vpliv na nekatere ionske mukoadhezivne polimere, pri neionskih pa večjega vpliva ni bilo opaziti (40, 55). Disperzije mucina so bile pripravljene v različnih koncentracijah od 6 do 30 %, prevladovala pa so 10, 12 in 15 % disperzije.

Za poskuse smo v tej magistrski nalogi uporabljali »*Mucin from porcine stomach, Type II*« proizvajalca Sigma-Aldrich, iz katerega smo pripravili 12, 15 in 20 % disperzije mucina v demineralizirani vodi. V vseh poskusih smo uporabljali mucin iz iste serije in sicer serijska številka: SLBQ2688V (v nadaljevanju imenovan mucin 1), le za en set poskusov smo pripravili 20 % disperzijo mucina iz druge serije: SLBT3650 (v nadaljevanju imenovan mucin 2). Mucina sta se med seboj malo razlikovala v barvi, vonju in velikosti delcev, vendar po dispergiranju med njima na videz ni bilo bistvenih razlik v barvi, vonju ali reoloških lastnostih. Ustrezno količino mucina smo postopoma, v času 15 minut, stresali v predpisano količino vode ob mešanju s propelerskim mešalom. Hitrost mešanja propelerskega mešala smo prilagajali glede na količino dodanega mucina in sicer od 500 do 1100 rpm. Ko smo dosegli koncentracijo mucina okrog 13,5 %, je disperzija začela izkazovati t.i. Weissenbergov efekt, kjer neNewtonске tekočine zaradi elastičnih sil plezajo po vrteči se palici oz. v našem primeru po mešalu (63). Nastale disperzije so bile rjave barve z značilnim vonjem po mucinu. Vsi pripravljeni vzorci so imeli pri rokovanju elastične lastnosti, med seboj pa so se razlikovali po viskoznosti – večja kot je bila koncentracija mucina, višja je bila viskoznost. Če smo se vzorcev dotaknili s spatulo in jo dvignili iz čaše, so se nitke »vlekle« tudi do 20 cm. Vse pripravljene vzorce smo prekrili z aluminijasto folijo, zatesnili s parafilmom in jih pustili dva dni v hladilniku pri 4°C, da se ustrezno hidrirajo (54). Vzorce mucina smo porabili v enem tednu, potem smo jih zavrgli in pripravili nove.

3.3.6 Združitev vzorcev mucina in vzorcev s polimeri

Da lahko izmerimo reološki sinergizem je potrebno preiskovane mukoadhezivne vzorce združiti z mucinom, da pride do medsebojnih interakcij in tako do spremembe reoloških lastnosti. V študijah se pojavita dva različna načina združitve vzorcev z mucinom. Hägerström in Edsman (41, 60) sta mucin v obliki praška dodajala vzorcem s polimeri, oboje pa se je hidriralo v končnem vzorcu, pred uravnavanjem pH. V postopku ni natančno navedeno ali sta dodajala najprej mucin, najprej polimer ali celo oboje hkrati, kar bi lahko pomembno vplivalo na njuno interakcijo. Menimo, da ta metoda ne posnema *in-vivo* stanja, saj se mucin na tak način lahko že vgradi v rešetko polimera pri geliranju. *In-vivo* pride v stik z gelom mucina šele končna formulacija, zato je smiselno, da se disperzije mucina in vzorci s polimerom naredijo ločeno in združijo neposredno pred meritvijo. Takšen postopek so uporabile tudi študije, za katere smo v zgornjem poglavju navedli medije za dispergiranje. Kot že rečeno, se v različnih študijah pojavljajo različne izhodne koncentracije mucina (6-30 %), končne koncentracije mucina v vzorcu po združitvi pa se gibljejo v dokaj ozkem območju med 3 in 5 %. Prevladujejo študije, v katerih so uporabljali 4 % končno koncentracijo mucina v vzorcu. Specifičnih razlogov

raziskovalci ne navajajo, v eni izmed študij pa je mogoče zaslediti, da je v telesu za nastanek gela mucina potrebna koncentracija okrog 5 %, zato bi bilo smiselno uporabljati takšne koncentracije (64).

Za izračun reološkega sinergizma je potrebno narediti tri različne vzorce:

1. združen vzorec polimera z disperzijo mucina
2. združen vzorec polimera z vodo v enakem razmerju, kot bi bil z mucinom (slep vzorec, ki definira prispevek polimera na reološki sinergizem)
3. združen mucin z vodo v enakem razmerju, kot bi bil s polimerom (slep vzorec, ki definira prispevek mucina na reološki sinergizem)

Za naše raziskave smo se na podlagi literature in preteklih študij odločili, da bomo pripravili vzorce tako, da bo končna koncentracija mucina v združenem vzorcu 2 ali 4 %. Pri uporabi 12, 15 in 20 % disperzije mucina to pomeni šest različnih razmerij med vzorci mucina in polimera (imenu vzorca dodana črka Z, kot zmes) (Preglednica IX, Preglednica X). Kot slepe reference smo v istih razmerjih združili vzorce s polimerom z demineralizirano vodo (imenu vzorca dodana črka V, kot voda) (Preglednica IX, Preglednica X) in vzorce samo mucina z demineralizirano vodo (Preglednica XI).

Vzorec 001C(Z/V) v Preglednici 9 torej beremo kot dva vzorca. Naredili smo 001CZ in 001CV – enkrat s 4 % mucina v končnem vzorcu in enkrat s 4 % vode v končnem vzorcu. Na enak način beremo tudi vse nadaljne tabele z vzorci, kjer Z predstavlja zmes med vzorcem polimera in disperzijo mucina, V pa združene vzorce polimera z vodo.

Preglednica IX: Priprava zmesi vzorcev derivatov poliakrilne kisline z mucinom oz. vodo v različnih razmerjih z različno končno koncentracijo mucina

Vzorec	Polimer	Zač. Konc. polimera [%]	Konc. mucina v začetni disperziji [%]	Končna konc. mucina/vode v združenem vzorcu [%]	Razmerje vzorcev Carbopol 974P:mucin
001C(Z/V)	Carbopol 974P	0,80	12	4	66,66 : 33,33
002C(Z/V)	Carbopol 974P	0,80	15	4	73,33 : 26,66
003C(Z/V)	Carbopol 974P	0,80	20	4	80,00 : 20,00
004C(Z/V)	Carbopol 974P	0,80	12	2	83,33 : 16,66
005C(Z/V)	Carbopol 974P	0,80	15	2	86,66 : 13,33
006C(Z/V)	Carbopol 974P	0,80	20	2	90,00 : 10,00
001NZ	Noveon AA-1	0,80	12	2	83,33 : 16,66
002NZ	Noveon AA-1	0,80	20	4	80,00 : 20,00

Preglednica X: Priprava zmesi vzorcev s PVP-K90 z mucinom oz. vodo v različnih razmerjih z različno končno koncentracijo mucina

Poskus	Polimer	Zač. Konc. polimera [%]	Konc. mucina v začetni disperziji [%]	Končna konc. mucina/vode v združenem vzorcu [%]	Razmerje vzorcev PVP-K90:mucin
001P(Z/V)	PVP-K90	10,00	12	4	66,66 : 33,33
002P(Z/V)	PVP-K90	10,00	15	4	73,33 : 26,66
003P(Z/V)	PVP-K90	10,00	20	4	80,00 : 20,00
004P(Z/V)	PVP-K90	10,00	12	2	83,33 : 16,66
005P(Z/V)	PVP-K90	10,00	15	2	86,66 : 13,33
006P(Z/V)	PVP-K90	10,00	20	2	90,00 : 10,00

Preglednica XI: Priprava slepih vzorcev mucina v različnih razmerjih z različno končno koncentracijo mucina

Poskus	Polimer	Konc. mucina v začetni disperziji [%]	Končna količina mucina v združenem vzorcu [%]	Razmerje vzorcev voda:mucin
001M	slepa razt. (voda)	12	4	66,66 : 33,33
001M	slepa razt. (voda)	15	4	73,33 : 26,66
003M	slepa razt. (voda)	20	4	80,00 : 20,00
004M	slepa razt. (voda)	12	2	83,33 : 16,66
005M	slepa razt. (voda)	15	2	86,66 : 13,33
006M	slepa razt. (voda)	20	2	90,00 : 10,00

Vzorci smo pri sobni temperaturi združili v čaši in jih 15 minut mešali z magnetnim mešalom z 500 obrati na minuto. Vzorce, ki jih z magnetnim mešalom zaradi velike viskoznosti nismo uspeli premešati, smo mešali ročno s stekleno palčko 30 minut. Vse pripravljene vzorce smo prekrili z aluminijasto folijo, zatesnili s parafilmom in jih pred reološkimi meritvami pustili en dan v hladilniku pri 4°C.

Na podlagi rezultatov smo nadaljnje vzorce združili z disperzijo mucina le v razmerju 80:20. V končnih vzorcih smo imeli torej 4 % mucina (Z), za kar smo uporabili disperzijo z 20 % mucina. V istem razmerju smo jih združili še z vodo, da smo dobili slepe vzorce (V).

Za preučevanje vpliva različne koncentracije PVP-K90 in različne serijske številke mucina na reološki sinergizem smo pripravili vzorce prikazane v Preglednici XII.

Preglednica XII: Priprava zmesi z različno koncentrirane PVP-K90 in uporabljenim različno serijsko številko mucina

Poskus	Polimer	Zač. Konc. polimera	Mucin	Konc. mucina v začetni disperziji	Končna količina mucina/vode v združenem vzorcu	Razmerje vzorcev PVP-K90:mucin
007PZ1/V	PVP-K90	7,00	mucin 1	20	4	80,00 : 20,00
007PZ2/V	PVP-K90	7,00	mucin 2	20	4	80,00 : 20,00
008PZ1/V	PVP-K90	10,00	mucin 1	20	4	80,00 : 20,00
008PZ2/V	PVP-K90	10,00	mucin 2	20	4	80,00 : 20,00
009PZ1/V	PVP-K90	14,00	mucin 1	20	4	80,00 : 20,00
009PZ2/V	PVP-K90	14,00	mucin 2	20	4	80,00 : 20,00

Ker različni serijski številki mucina nista izkazovali signifikantnih razlik v reološkem sinergizmu, smo za nadaljnje poskuse uporabljali le mucin 1. DoE vzorce v Preglednici VI smo združili na zgoraj opisan način, da smo pripravili zmesi prikazane v Preglednici XIII.

Preglednica XIII: Priprava zmesi DoE vzorcev z mucinom (Z) ali z vodo (V) s 4 % končno koncentracijo mucina.oz. vode

Vzorec	Avicel RC-591	Maldex 150	Konc. mucina v začetni disperziji [%]	Končna količina mucina/vode v združenem vzorcu [%]	Razmerje DoE vzorcev:mucin
001D(Z/V)	+	+	20	4	80,00 : 20,00
002D(Z/V)	+	0	20	4	80,00 : 20,00
003D(Z/V)	+	-	20	4	80,00 : 20,00
004D(Z/V)	0	+	20	4	80,00 : 20,00
005D(Z/V)	0	0	20	4	80,00 : 20,00
006D(Z/V)	0	0	20	4	80,00 : 20,00
007D(Z/V)	0	-	20	4	80,00 : 20,00
008D(Z/V)	-	+	20	4	80,00 : 20,00
009D(Z/V)	-	0	20	4	80,00 : 20,00
010D(Z/V)	-	-	20	4	80,00 : 20,00

Vzorca 005D(Z/V) in 006D(Z/V) sta ponovitvi. Vzorcem 002D, 004D in 005D smo brez redčenja z vodo ali združitve z mucinom naredili še časovni preizkus. Vzorce 002D, 004D in 005D smo v razmerju (80:20) združili tudi z 12 in 15 % disperzijami mucina (Preglednica XIV). Na ta način smo vzorce vedno razredčili na isto koncentracijo polimerov, variirali pa smo končno koncentracijo mucina v vzorcu.

Vzorec	Avicel RC-591	Maldex 150	Konc. mucina v začetni disperziji	Končna količina mucina v združenem vzorcu	Razmerje DoE vzorcev:mucin
002DZ2	+	0	15	3,0	80,00 : 20,00
002DZ3	+	0	12	2,4	80,00 : 20,00
004DZ2	0	+	15	3,0	80,00 : 20,00
004DZ3	0	+	12	2,4	80,00 : 20,00
005DZ2	0	0	15	3,0	80,00 : 20,00
005DZ3	0	0	12	2,4	80,00 : 20,00

3.3.7 Reološke metode

Za vrednotenje mukoadhezivnih lastnosti z reologijo je, kot že opisano v uvodu, potrebno narediti dve vrsti meritev – amplitudni in frekvenčni test. Z amplitudnim testom določimo območje, v katerem ima vzorec linearni viskoelastični odziv, s frekvenčnim testom pa lahko v tem območju sklepamo na tip mikrostrukture snovi, jakost vezi, stopnjo geliranosti, premreženost polimerov, ipd. (37). Za meritve smo uporabljali rotacijski reometer Haake Rheostress RS 75 z merilnim sistemom stožec-plošča.

V nobeni študiji, razen v eni (57), ni bilo posebej navedeno ali so vzorce pred meritvijo premešali ali ne, kar pa lahko zelo vpliva na obnašanje vzorca. Na podlagi dejstva, da je potrebno vse suspenzije pred uporabo pretresti, smo vzorce pred meritvijo mešali 5 minut z magnetnim mešalom pri 500 obratih na minuto (vzorci z nizko viskoznostjo) ali 10 minut s stekleno palčko (vzorci z visoko viskoznostjo). Vzorec smo previdno nalili na ploščo, da smo zapolnili ves prostor med sistemom stožec-plošča, meritev pa smo izvajali pri reži približno 0,095 mm (natančno velikost reže je določil reometer sam). Ko smo sistem stožec-plošča združili, smo vzorec pustili stati še 5 minut. DoE vzorci vsebujejo Avicel RC-591, ki izkazuje časovno odvisne, tiksotropne lastnosti, zato smo pred amplitudnim in frekvenčnim testom naredili še časovni test. Z njim smo ugotovili, koliko časa lahko pustimo vzorec stati v reometru pred začetkom meritve. Vse meritve smo izvajali pri 23 °C.

Pogoji, pod katerimi so bili v pregledanih študijah narejeni amplitudni testi, se med seboj bistveno ne razlikujejo in so bili narejeni pri frekvenci 1 Hz. Amplitude niso bile navedene, meritve pa smo izvajali v področju od 0,1 do 10 Pa. Frekvenčne teste so v različnih študijah delali v različnih intervalih – od velikih (0,1 Hz do 100 Hz) (58, 59), do majhnih (0,5 Hz do 1,5 Hz) (56), prevladoval pa je interval 0,01 Hz ali 0,1 Hz do 10 Hz (36, 45 47, 54, 62). Pri metodi smo se na podlagi preliminarne meritev odločili za interval od 0,1 Hz do 10 Hz. Pri višjih

frekvencah so se namreč meritve G' in G'' obnašale zelo nepredvidljivo, njihova vrednost pa je variirala.

Pri merjenju smo spremljali parametre G' , G'' in $|\eta^*|$ (kompleksna viskoznost), ki smo jih na podlagi preteklih študij odčitali pri frekvenci 1 Hz (41, 55). V študijah se uporablja tudi povprečna vrednost reoloških parametrov na območju od 0,1 Hz do 10 Hz, ki pa je dober približek odčitka pri frekvenci 1 Hz (52, 53). Meritve smo za razvoj metode pomerili dvakrat, vrednosti pa povprečili za nadaljnjo obdelavo. Za postavljanje modela smo DoE vzorce pomerili trikrat, vrednosti pa povprečili za nadaljnjo obdelavo. Pregled parametrov meritev je prikazan v Preglednici XV.

Preglednica XV: Pregled parametrov reoloških meritev

	Zvezno spremenjena vrednost	Konstantna vrednost	Št. merjenih točk:
Oscilacijski amplitudni test	Strižna napetost τ : 0,1 Pa – 10,0 Pa	Kotna frekvenca ω : 1,000 Hz	20
Oscilacijski frekvenčni test	Kotna frekvenca ω : 0,1000 Hz – 10,00 Hz	Strižna napetost τ : 0,4 Pa	20
Časovni test	Čas t : 0 s – 1800 s	Strižna napetost τ : 0,001 Pa Kotna frekvenca ω : 1,000 Hz	100
Temperatura	23,00 °C $\pm$ 0,10 °C		
Širina reže	0,095 mm		

3.3.8 Obdelava DoE podatkov

Podatke za vzorce, ki smo jih naredili z načrtovanjem eksperimentov, smo analizirali s programom MODDE z metodo multiple linearne regresije in jih logaritmično transformirali. Dobili smo štiri grafe, s pomočjo katerih smo podatke interpretirali.

Graf »Replicate plot« nam pokaže variacijo vseh eksperimentov v primerjavi z variacijo ponovljenih eksperimentov. Želimo, da je variacija med ponovljenimi eksperimenti manjša kot med vsemi drugimi, kar pomeni, da je model dober. Na tem grafu lahko opazimo tudi izstopajoče vrednosti, ki so lahko posledica napačne meritve, napačno izvedenega eksperimenta ali pa rezultat ne ustreza postavljenemu modelu (42, 65).

Z grafom »Summary of Fit« lahko ocenimo, ali je naš postavljen model dober. To naredimo s pomočjo parametrov R^2 , Q^2 , veljavnosti (»model validity«) in ponovljivosti (»reproducability«) modela. R^2 nam pove, kako dobro se podatki ujemajo s postavljenim modelom, njegova vrednost pa lahko zavzema vrednost med 0 in 1, kjer 0 pomeni slabo ujemanje, 1 pa odlično ujemanje. S Q^2 izrazimo napovedno moč modela, torej kako dobro lahko model napove nadaljnje eksperimente. Njegova vrednost je lahko od minus neskončno do 1. Za vrednosti Q^2

večje kot 0,1 lahko rečemo, da je njegova napovedna moč signifikantna, nad 0,5 dobra nad 0,9 pa odlična. Veljavnost nam pove ali je model na splošno ustrezen, za dober model pa mora biti ta vrednost večja kot 0,25. Iz stolpca »ponovljivost« lahko razberemo, ali so eksperimenti in meritve dovolj robustne oz. ponovljive, za dober model pa so potrebne vrednosti nad 0,5 (42, 65).

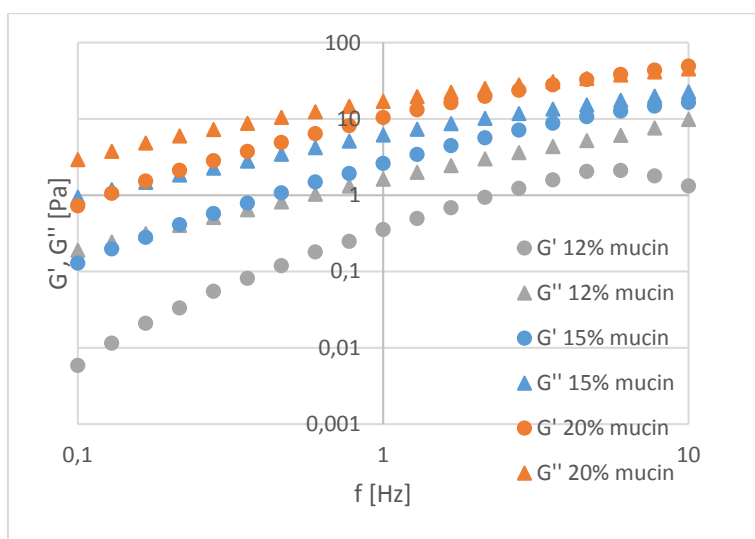
Graf »*Coefficients*« se uporablja za določitev najpomembnejših faktorjev in je sestavljen iz dvostranskega 5 % intervala zaupanja, ki nam pokaže značilnost parametrov. Če interval zaupanja prehaja čez $Y=0$, je model statistično neznačilen, če pa $Y=0$ ne prečka, je model statistično značilen (42, 65).

Na grafu »*Residuals normal probability*« imamo na komulativni normalni lestvici verjetnosti označene rezidule oz. ostanke, iz katerih lahko ugotovimo, ali imamo izstopajoče vrednosti, ki ne sledijo postavljenemu modelu. Normalno porazdeljeni reziduali ležijo na premici, kot izstopajoče vrednosti pa obravnavamo vrednosti izven štirih standardnih deviacij. Kadar smo podatke napačno transformirali ali imamo opravka s kvadratnimi odnosi med faktorji, eksperimenti ležijo na ukrivljeni krivulji (42, 65).

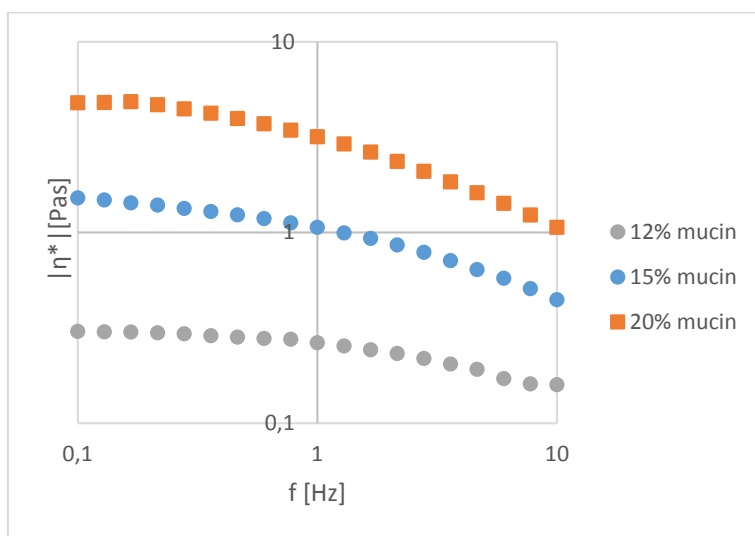
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Reologija mucinov

Najprej smo izhodne 12, 15 in 20 % disperzije mucinov v demineralizirani vodi pomerili na reometru in jim določili G' , G'' in kompleksno viskoznost ter spremljali, kako se njihove vrednosti spreminjajo glede na koncentracijo. Že na pogled so si bili vzorci med seboj različni v viskoznosti, večja kot je bila koncentracija mucina, višja je bila viskoznost.



Slika 4: Frekvenčni test disperzij mucina – odvisnost reoloških parametrov G' in G'' od koncentracije mucina



Slika 5: Frekvenčni test disperzij mucina – odvisnost kompleksne viskoznosti $|\eta^*|$ od koncentracije mucina

Preglednica XVI: Prikaz rezultatov reoloških parametrov disperzij z različnimi koncentracijami mucina

Vzorec	Frekvenca meritve [Hz]	G' [Pa]	G« [Pa]	$ \eta^* $ [Pas]	G''-G'
12 % mucin	1	0,353	1,621	0,264	1,267
15 % mucin	1	2,603	6,152	1,063	3,549
20 % mucin	1	10,395	16,980	3,169	6,585

Vsi merjeni parametri se pri višjih koncentraciji mucina povečajo, ne glede na koncentracijo pa je bil G' zmeraj manjši kot G'' (Slika 4). To pomeni, da disperzija pri uporabljenih koncentracijah ne tvori gela. Z višjo koncentracijo se večja tudi kompleksna viskoznost (Slika 5). Višja kot je koncentracija mucina, večja je absolutna razlika med G'' in G', kar pomeni, da mucin bolj prispeva k viskoznim lastnostim, kot k elastičnim (Preglednica XVI). Pri 20 % disperziji mucina je pri višjih frekvencah sicer viden t.i. »cross-over« oz. točka prekrivanja, kjer G' postane večji kot G''. To bi lahko nakazovalo, da bi pri še višjih koncentracijah mucina morda lahko dobili strukturo gela. Da komercialno dostopni mucini tudi v višjih koncentracijah ne tvorijo gela so pokazale tudi druge študije, torej se naše ugotovitve z njimi skladajo (35, 54). Nezmožnost tvorbe gela je verjetno posledica tega, da se pri izolaciji mucina njegove fizikalno-kemijske lastnosti spremenijo, mucini se fragmentirajo na manjše dele in rekonstitucija primarne gelske strukture, ki jo ima naravni mucin, ni več možna.

Da lahko izračunamo reološki sinergizem po enačbi 13, potrebujemo člen, ki ga prispeva mucin (G'_{mucin}). Ta člen smo dobili tako, da smo naše disperzije mucina zmešali z vodo v istem razmerju, kot če bi jih pomešali z vzorcem, nato pa smo jim pomerili reološke lastnosti. Pomerili smo torej slepe vzorce za določitev G'_{mucin} .

Preglednica XVII: Prikaz rezultatov reoloških parametrov raztopin mucina v vodi

Vzorec	Frekvenca meritve [Hz]	Konc. mucina v začetni disperziji [%]	Končna količina mucina v združenem vzorcu [%]	Razmerje vzorcev voda:mucin	G' [Pa]	G« [Pa]	$ \eta^* $ [Pas]
001M	1	12	4	66,66 : 33,33	0,0244	0,0858	0,0142
003M	1	20	4	80,00 : 20,00	0,0066	0,0917	0,0146
004M	1	12	2	83,33 : 16,66	0,0081	0,0436	0,0071
006M	1	20	2	90,00 : 10,00	0,0136	0,0570	0,0093
Demi voda	1	/	/	/	0,0182	0,0355	0,0063

Pripravljene disperzije se med seboj na videz niso bistveno razlikovale in so bile na pogled konsistence vode. V Preglednici XVII lahko vidimo, da so vrednosti G', G'' in $|\eta^*|$ zelo majhne in pri istih končnih koncentracijah (001M proti 003M in 004M proti 006M) relativno primerljive. Primerljivost je smiselna, saj smo v končni fazi pripravili raztopine z isto končno

koncentracijo mucina. Kljub temu so vrednosti tekom meritve močno variirale, kar je običajno pri oscilacijskih meritvah močno razredčenih raztopin, ki so konsistence vode. Posledica tega je, da zaradi variacije v meritvi G' pri 4 % končni koncentraciji mucina nista bili primerljivi. Pripravljene raztopine prav tako niso izkazovale lastnosti gela ($G' < G''$), kar smo pričakovali. Viskoznost raztopin z višjo koncentracijo mucina je bila večja kot pri raztopinah z nižjo koncentracijo. Kot rečeno so bile vrednosti zelo majhne in jih ni smiselno primerjati relativno ter tako reči, da je viskoznost 4 % raztopin dvakrat večja kot viskoznost 2 %. To sicer drži vendar so raztopine med seboj še vedno na videz enake in podobne vodi. Za primerjavo smo z isto metodo pomerili še vodo in dobili dokaj podobne rezultate, kar še bolj potrjuje, da so pripravljene disperzije po svojih reoloških lastnostih podobne vodi.

Ker je člen G'_{mucin} v enačbi 13 za reološki sinergizem vedno konstanten, če vzorce redčimo v istem razmerju in ker je njegova vrednost zanemarljiva, smo enačbo poenostavili, kar so na podlagi podobnih rezultatov naredili tudi v nekaterih drugih študijah (56, 60, 62) (Enačba 15):

$$\Delta G' = G'_{\text{mešanica}} - G'_{\text{polimer}} \quad \text{Enačba 15}$$

Po diskusiji, kako bi lahko vseeno v enačbo zajeli delež mucina, ne da bi ga redčili z vodo in tako dobili zanemarljivo majhno vrednost, smo teoretično postavili enačbo 16:

$$\Delta G' = G'_{\text{mešanica}} - [xG'_{\text{polimer}} + yG'_{\text{mucin}}] \quad \text{Enačba 16}$$

V tej enačbi x in y pred reološkim parametrom predstavljata masni delež vzorca s polimerom (x) in vzorca mucina (y) v njuni zmesi, parameter pa izmerimo čistemu, nerazredčenemu vzorcu. Ta enačba predpostavlja, da se parametri pri višjih koncentracijah zmanjšujejo linearno glede na koncentracijo, kar bi bilo potrebno najprej dokazati, bi pa to zahtevalo še številne dodatne meritve in preverjanja, kako se spreminjajo reološki parametri glede na masni delež polimera in mucina. Vsekakor bi na ta način verjetno izračunali manjše sinergizme, saj bi upoštevali delež mucina, vendar bi bile morda tako bolj natančne. Za nadaljnjo obdelavo podatkov smo uporabljali uveljavljeno Enačbo 15, vsekakor pa bi bilo zanimivo v nadaljnjih študijah uporabiti še Enačbo 16 in rezultate primerjati. Pri postavljanju modela s pomočjo načrtovanja eksperimentov smo se odločili, da bomo kljub zanemarljivemu deležu raztopine mucina na sinergizem vseeno uporabljali Enačbo 12, ki vsebuje tudi prispevek disperzije mucina.

4.2 Reologija derivatov poliakrilne kisline (Carbopol 974P in Noveon AA-1)

Ob združitvi vzorcev z mucinom so nastale zelo podobne zmesi, zato smo se odločili, da za začetek pomerimo le vzorca, ki sta si bila po razmerju in vsebnosti mucina najbolj različna – torej 001CZ (najvišja vsebnost mucina) in 006CZ (najnižja vsebnost mucina). Rezultati so zbrani v Preglednici XVIII. Z združitvijo z mucinom smo pripravili vzorce 00xCZ, z združitvijo z vodo pa 00xCV.

Preglednica XVIII: Prikaz rezultatov reoloških meritev za vzorce 001C, 006C in vodo

Vzorec	Konc. mucina v zač. Disperziji [%]	Konc. mucina/vode v združenem vzorcu [%]	Razmerje Carbopol 974P:mucin	Frekvenca meritve [Hz]	G' [Pa]	G'' [Pa]	$ \eta^* $ [Pas]
001CV	12	4	66,66:33,33	1	3,248	2,422	0,646
001CZ	12	4	66,66:33,33	1	0,038	0,433	0,069
006CV	20	2	90,00:10,00	1	29,765	8,168	4,913
006CZ	20	2	90,00:10,00	1	0,213	0,868	0,142
Demi voda	/	/	/	1	0,018	0,036	0,006
Vzorec	Konc. mucina v zač. disperziji [%]	Konc. mucina v združenem vzorcu [%]	Razmerje Carbopol 974P:mucin	Frekvenca meritve [Hz]	Sinergizem G' [Pa]	Sinergizem G'' [Pa]	Sinergizem $ \eta^* $ [Pas]
001C	12	4	66,66:33,33	1	-3,210	-1,988	-0,577
006C	20	2	90,00:10,00	1	-29,552	-7,300	-4,770

Vzorca razredčena z vodo (oznaka V) sta si med seboj zelo različna, kar je razvidno tudi iz vrednosti reoloških parametrov. G' je pri 006CV kar šestkrat večji kot pri 001CV, G'' je večji trikrat, $|\eta^*|$ pa dobrih sedemkrat. Ko vzorec razredčimo z vodo se mu zmanjšajo tako elastične (G') kot viskozne (G'') lastnosti, močno pa vplivamo tudi na njegovo viskoznost. Carbopol 974P je tisti, ki s tvorbo rešetke najbolj pripomore k elastičnim in viskoznim lastnostim, zato je smiselno, da nižja kot je njegova koncentracija, manjši bosta vrednosti G' in $|\eta^*|$. Pri vzorcih razredčenih z vodo je G' > G'', kar pomeni, da vzorci izkazujejo lastnosti gela. Gel je občutno močnejši pri vzorcu z večjo koncentracijo polimera (006C). Vzorca združeni z mucinom (oznaka Z), ne izkazujejo več lastnosti gela saj je G' < G'', kar pomeni, da je struktura gela ob združitvi razpadla. Ne moremo sicer trditi, da na koncu nastanejo enake zmesi, saj so pri 006CZ vrednosti parametrov višje, kot pri 001CZ, vendar so kljub temu, da smo vzeli dva najbolj različna vzorca, numerične vrednosti v podobnih velikostnih razredih. Ob združitvah vzorcev poliakrilne kisline z mucinom je bila pri vseh vzorcih (001CZ-006CZ) takoj opažena porušitev viskozne strukture, ne glede na razmerje vzorca in mucina, polimera in koncentracije mucin. Iz

dveh zelo viskoznih raztopin/disperzij je po združitvi namesto pričakovanega močnejšega in bolj čvrstega gela oz. še bolj viskozne tekočine, nastala mnogo manj viskozna tekočina. Vsi vzorci so si bili po združitvi na videz zelo podobni. Presenetilo nas je predvsem dejstvo, da so vrednosti G' in G'' občutno manjše, kot pri vzorcih razredčenimi z vodo, čeprav bi pričakovali, da bi se zaradi interakcij z mucinom povečale. Posledično smo dobili tudi negativne sinergizme pri vseh pomerjenih vzorcih, kar pomeni, da je interakcija z mucinom negativna – ne pride do ojačanja gela ali viskoznosti in ne pride do mukoadhezije, temveč ravno obratno. Če pogledamo vrednosti sinergizmov, lahko vidimo, da so vrednosti skoraj neodvisne od vrednosti reoloških parametrov zmesi (Z), večinoma so odvisne od parametrov razredčenih vzorcev z vodo (V), ki so tolikokrat večji. Glede na to, da so si bile zmesi med seboj podobne in bi verjetno izmerili zelo majhne in podobne vrednosti parametrov, smo se odločili, da ostalih meritev ne bomo izvajali, saj je zelo očitno, da so disperzije mucina s temi vzorci nekompatibilni.

Negativni sinergizem, do katerega pride pri mešanju Carbopola 974P in Carbopola 934P z disperzijami komercialno dostopnega mucina so zaznali tudi v drugih študijah (41, 55, 60) in bi lahko bil posledica ionov v mucinu. Derivati poliakrilne kisline so namreč zelo občutljivi na pH in ionsko moč hidratacijskega medija, ioni pa lahko s ščitenjem karboksilnih skupin in posledično drugačno ureditvijo verig porušijo njegovo strukturo in spremenijo reološke lastnosti. (55, 60, 62). Z izbiro drugačnih medijev, tipov in dialize mucina so namreč lahko dosegli tudi pozitivne sinergizme. Vzorci polimerov in mucina, pripravljeni v prečiščeni vodi niso izkazovali pozitivnega sinergizma v koncentracijskem območju polimera od 0,25 do 1,5 %, ne glede na tip uporabljenega mucina (tip I-III) in dializo. Z dializiranim mucinom tipa I in uporabo pufrov (fosfatni pufer pH 7, acetatni pufer pH 4,5), pa je bil opažen sinergizem. Struktura se torej ni porušila. Pozitivni sinergizem z mucinom tipa I so zaznali tudi v mediju iz umetnih solz, močnejša interakcija tipa I od ostalih mucinov pa je verjetno posledica strukturnih razlik in molekulske mase (55, 60). Zanimivo je tudi dejstvo, da so v eni izmed študij opazili pozitivni reološki sinergizem v 0,9 % NaCl le pri koncentraciji polimera 0,5 %, pri 2 % koncentraciji polimera pa je bil le-ta negativen. S konvencionalno interpretacijo bi lahko rekli, da šibkejši kot je gel, močnejša je mukoadhezivna interakcija, kar pa ni smiselno in je bilo z uporabo metode merjenja mukoadhezije prek natezne trdnosti na svinjski nosni sluznici tudi ovrženo. Hägestorm s sodelavci v svoji študiji meni, da ioni niso edini razlog za negativni sinergizem, saj mucin tipa I vsebuje več ionov kot mucin tipa III, izraža pa večjo reološko interakcijo. Eden izmed razlogov bi lahko bil, da z dodatkom disperzije mucina močnim gelom, le-te razredčimo na manjšo koncentracijo – mucin zapolni prostor okrog rešetke, celokupna koncentracija se zmanjša, posledično pa nastane šibkejši gel. Obratno se morda zgodi pri šibkih

gelih, kjer je koncentracija polimera nizka. Z dodatkom mucina se celokupna koncentracija poveča, mucin zapolni prostor okrog rešetke in struktura se ojača (41). V naši magistrski nalogi tako nizkih koncentracij polimera nismo uporabljali, zato tega pojava nismo opazili. Rezultati naših raziskav se s pregledanimi študijami, ki uporabljajo komercialno dostopne mucine, ujemajo. Za nadaljnji razvoj naše metode, bi lahko uporabili še več različnih pufrov in variirali ionsko moč, ter tako spremljali njihov vpliv na derivate poliakrilnih kislin, prav tako pa bi lahko poskusili še z uporabo drugih tipov mucina – tudi naravnega.

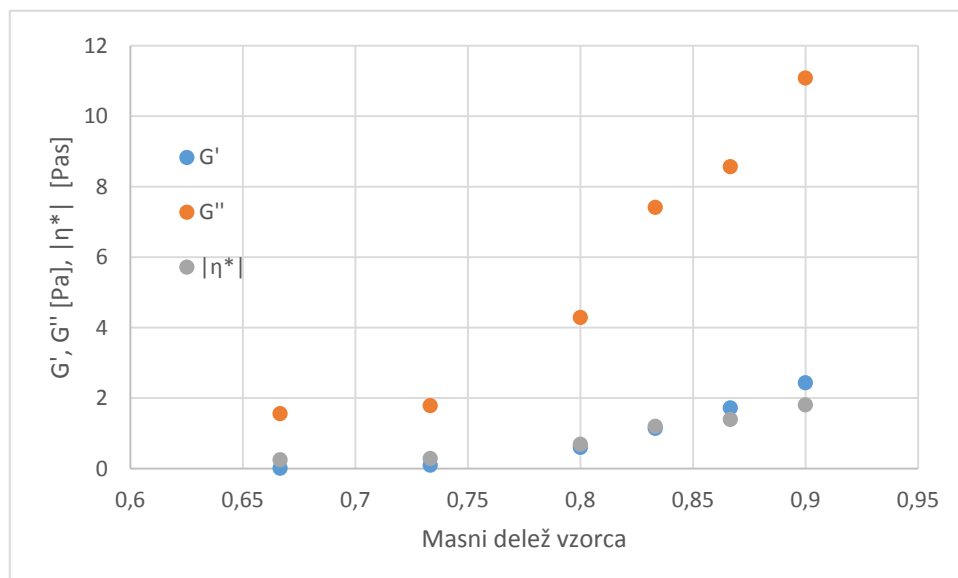
V študijah, kjer so uporabljali naravni mucin, ki bolje ponazarja *in-vivo* pogoje, so namreč ugotovili, da je reološka interakcija s Carbopoli, Noveonom AA-1 in še nekaterimi drugimi mukoadhezivnimi polimeri pozitivna. (51, 53) Na podlagi dobljenih rezultatov in pregleda literature, smo prišli do zaključka, da derivatov poliakrilne kisline s preučevano reološko metodo in z uporabo komercialno dostopnega mucina tipa II ne moremo primerjati. Glede na študije smo negativni sinergizem pričakovali, vendar smo vseeno želeli preskusiti, če pride do negativnega sinergizma tudi v naši sestavi, ki vsebuje poleg polimerov tudi sladkorje, glicerol, konzervanse, itd. Kljub temu pa nismo pričakovali, da ob združitvi pride do razpada strukture in utekočinjenja vzorcev. Zato menimo, da uporaba logaritmizirane enačbe za reološki sinergizem, z namenom, da damo pozitivnim in negativnim vrednostim enako težo, ni smiselna. Čeprav z metodo nismo uspeli ovrednotiti mukoadhezivnih lastnosti obeh polimerov, to ne pomeni, da polimera nista mukoadhezivna ali da s takšnim pristopom ne bi mogli vrednotiti mukoadhezivnih lastnosti katerih drugih, na pH in ionsko moč manj občutljivih polimerov – npr. PVP-K90.

4.3 Vpliv uporabe različnih izhodnih koncentracij mucina na reologijo vzorcev s PVP-K90

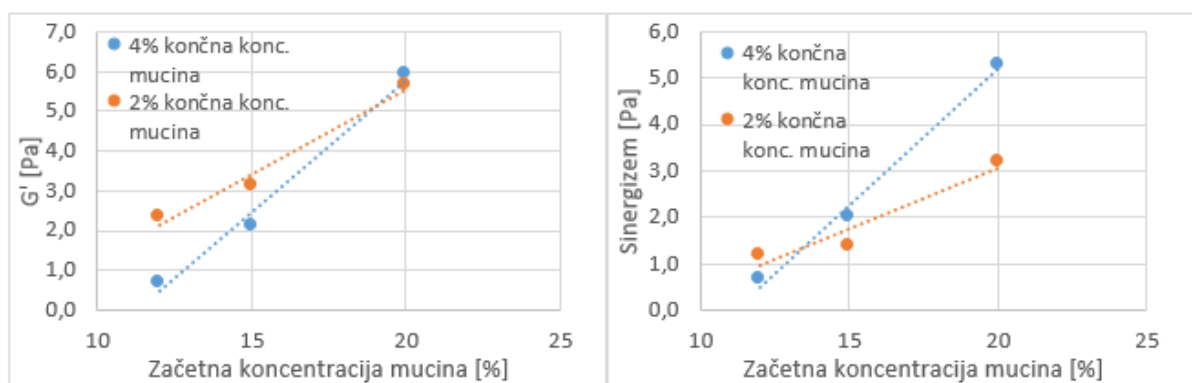
Eksperimenti v tem sklopu so bili zastavljeni na enak način kot pri derivatih poliakrilne kisline, saj smo najprej želeli ugotoviti, ali obstaja mejna koncentracija mucina, pri kateri ne pride več do povečanja reoloških interakcij in če uporaba različnih začetih koncentracij disperzij mucina vpliva na izmerjene reološke parametre.

Preglednica XIX: Prikaz rezultatov reoloških meritev vzorcev s PVP-K90 z različnimi koncentracijami mucina

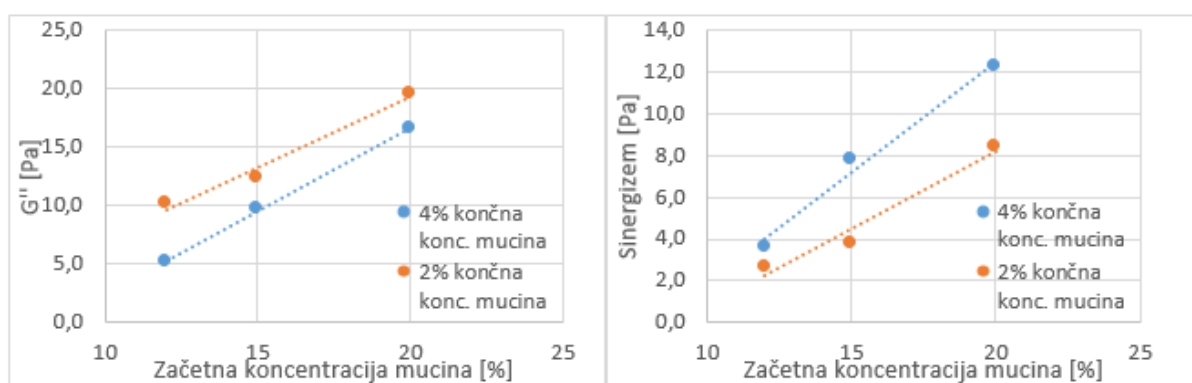
Vzorec	Polimer	Zač. Konc. polimera [%]	Konc. mucina v začetni disperziji [%]	Končna konc. mucina/vode v združenem vzorcu [%]	Razmerje vzorcev PVP-K90:mucin	Konc. PVP-K90 v zmesi [%]
001PZ/V	PVP-K90	10,00	12	4	66,66 : 33,33	6,67
002PZ/V	PVP-K90	10,00	15	4	73,33 : 26,66	7,33
003PZ/V	PVP-K90	10,00	20	4	80,00 : 20,00	8,00
004PZ/V	PVP-K90	10,00	12	2	83,33 : 16,66	8,33
005PZ/V	PVP-K90	10,00	15	2	86,66 : 13,33	8,66
006PZ/V	PVP-K90	10,00	20	2	90,00 : 10,00	9,00
Vzorec	Frekvenca meritve [Hz]		G' [Pa]		G« [Pa]	η* in [Pas]
001PZ	1		0,700		5,204	0,836
001PV	1		0,007		1,553	0,247
002PZ	1		2,138		9,669	1,576
002PV	1		0,093		1,782	0,284
003PZ	1		5,920		16,675	2,816
003PV	1		0,598		4,283	0,688
004PZ	1		2,363		10,145	1,658
004PV	1		1,135		7,410	1,194
005PZ	1		3,113		12,460	2,013
005PV	1		1,716		8,563	1,390
006PZ	1		5,661		19,630	3,252
006PV	1		2,433		11,080	1,805
Vzorec	Frekvenca meritve [Hz]		Sinergizem G' [Pa]		Sinergizem G« [Pa]	Sinergizem η* [Pas]
001P	1		0,669		3,565	0,574
002P	1		2,020		7,801	1,278
003P	1		5,297		12,307	1,608
004P	1		1,204		2,649	0,450
005P	1		1,373		3,812	0,608
006P	1		3,204		8,464	1,432



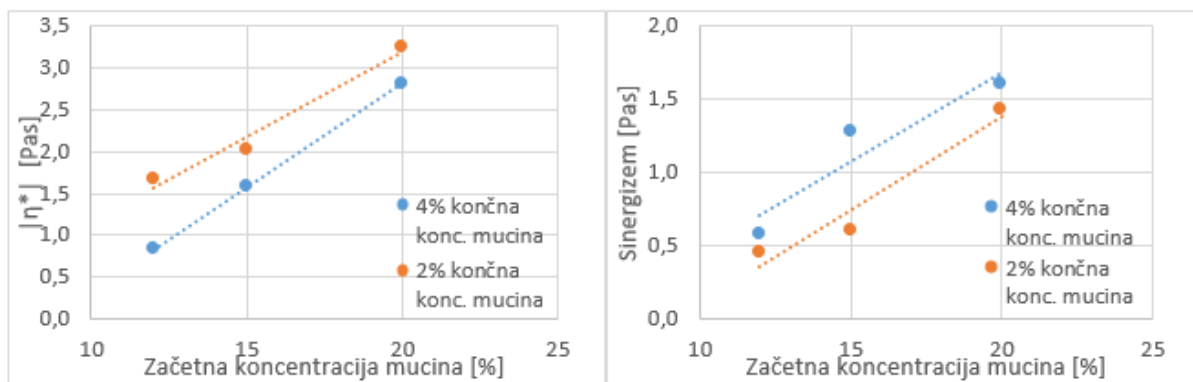
Slika 6: Rezultati G' , G'' in kompleksne viskoznosti v odvisnosti od masnega deleža vzorca pri vzorcih redčenih z vodo (oznaka V)



Slika 7: Vpliv začetne koncentracije mucina v disperziji na G' (levo) in na synergizem G' (desno)



Slika 8: Prikaz vpliva začetne koncentracije mucina v disperziji na G'' (levo) na synergizem G'' (desno)



Slika 9: Vpliv začetne koncentracije mucina v disperziji na $|\eta^*|$ (levo) in na sinergizem $|\eta^*|$ (desno)

Pregled numeričnih rezultatov za G' in G'' v Preglednici XIX pokaže, da nobeden izmed pripravljenih vzorcev ni izkazoval lastnosti gela (G' je namreč povsod nižji kot G''), ne glede na to ali smo ga pomešali z vodo ali z mucinom. Parametri vzorcev razredčenih z vodo (V), so se z večjim deležem vode oz. manjšim deležem vzorca smiselno zmanjševali (od 006PV proti 001PV), najbolj občutno pa se je zmanjševal G'' .

Zelo zanimivo je dejstvo, da ob istih končnih koncentracijah mucina dobimo različne vrednosti tako za sinergizme kot za posamezne reološke parametre. To pomeni, da je razmerje, v katerem združimo vzorce polimera z mucinom pomembno, posledično pa tudi koncentracija polimera. Če pogledamo grafe sinergizma (desni grafi) (Slika 7, Slika 8, Slika 9), bi bilo na prvi pogled lahko takoj očitno, da višja kot je končna koncentracija mucina v vzorcu večja je reološka interakcija. Vrednosti sinergizmov za 4 % končne koncentracije mucina so namreč višje kot za 2 %, razen pri 12 % odstotnem začetnem mucinu. Na podlagi tega bi lahko rekli, da je končna koncentracija mucina odločilen faktor, s katerim dosežemo močnejše interakcije z mucinom in ne koncentracija polimera. Vendar, če pogledamo kako je sestavljena enačba za izračun sinergizma to morda ni res. Upoštevati moramo, da enačba za sinergizem vsebuje tudi člen vzorca polimera razredčenega z vodo. Bolj kot razredčimo vzorec, manjše so vrednosti reoloških parametrov, večji je sinergizem, ne glede na to, ali so vrednosti reoloških parametrov zmesi sorazmerno večje. Če pogledamo grafe, kjer ne primerjamo sinergističnih parametrov, ampak reološke parametre zmesi (Slike 7, 8 in 8 levo), vidimo drugačno sliko. Vrednosti parametrov 2 % zmesi, kjer je delež PVP-K90 večji, so večinoma višje, kot vrednosti parametrov 4 % zmesi, kjer je delež PVP-K90 nižji. To kaže na dejstvo, da je pomembna tudi koncentracija polimera in ne samo koncentracija mucina. Izjema, ki bi lahko kazala na popolno razmerje in bližanju platoju interakcije, se pojavi pri 20 % začetni koncentraciji mucina. To lahko vidimo iz grafa za G' (Slika 7 levo), kjer je vrednost pri 4 % končni koncentraciji višje

kot pri 2 %, vrednosti pa sta si blizu. Iz grafov lahko interpretiramo, da je interakcija odvisna od obojega – tako koncentracije polimera, kot tudi od koncentracije mucina. Glede na to, da so si reološki parametri z uporabo 20 % disperzije mucina najbolj blizu in da z njimi dosežemo tudi največji sinergizem, smo se odločili, da bomo za nadaljnje poskuse mešali vzorce s polimerom z disperzijo mucina v razmerju 80:20, uporabljali pa bomo 20 % disperzijo mucina. Na tak način smo torej dobili 4 % končno koncentracijo mucina v zmesi.

Ker smo želeli potrditi ali višja koncentracija PVP-K90 daje močnejšo interakcijo z mucinom in večji reološki sinergizem, smo v istem razmerju in z isto začetno disperzijo mucina zmešali vzorce z različnimi koncentracijami PVP-K90.

4.4 Vpliv različne koncentracije PVP-K90 in uporaba različne serije komercialno dostopnega mucina na reologijo

Preglednica XX: Rezultati reoloških parametrov, kompleksne viskoznosti in sinergizmov pri vzorcih z različnimi koncentracijami PVP-K90 in dvema različnima serijama komercialno dostopnega mucina

Vzorec	Frekvenca meritve [Hz]	G' [Pa]	G'' [Pa]	$ \eta^* $ [Pas]	G''-G' [Pa]
007PZ1	1	2,074	9,236	1,507	/
007PZ2	1	2,780	9,171	1,526	/
Povprečje	1	2,427	9,204	1,517	6,777
007PV	1	0,094	2,544	0,405	2,450
008PZ1	1	7,641	24,835	4,136	/
008PZ2	1	7,658	24,455	4,079	/
Povprečje	1	7,650	24,645	4,108	16,996
008PV	1	2,379	9,360	1,539	6,981
009PZ1	1	33,040	77,435	13,410	/
009PZ2	1	29,680	73,495	12,620	/
Povprečje	1	31,360	75,465	13,015	44,105
009PV1	1	8,577	34,595	5,673	26,018
Vzorec	Frekvenca meritve [Hz]	Sinergizem G' [Pa]	Sinergizem G'' [Pa]	Sinergizem $ \eta^* $ [Pas]	G''-G' [Pa]
007P1	1	1,980	6,693	1,101	/
007P2	1	2,686	6,627	1,120	/
Povprečje		2,333	6,66	1,1105	4,327
RSD	/	21,41 %	0,70 %	1,21 %	/
008P1	1	5,262	15,475	2,598	/
008P2	1	5,279	15,095	2,540	/
Povprečje		5,271	15,285	2,569	10,015
RSD	/	0,22 %	1,76 %	1,58 %	/

009P1	1	24,463	42,840	7,737	/
009P2	1	21,103	38,900	6,947	/
Povprečje		22,783	40,87	7,342	18,087
RSD	/	10,43 %	6,82 %	7,61 %	/

Legenda: številka 1 pri vzorcu pomeni mucin 1, številka 2 pri vzorcu pomeni mucin 2

Iz rezultatov v Preglednici XX lahko vidimo, da vzorci PVP-K90 razredčeni z vodo v nobeni izmed koncentracij niso izkazovali lastnosti gela ($G' < G''$), kar pomeni, da prevladujejo viskozne lastnosti. Z višjo koncentracijo polimera (vzorci 007P proti 009P) se obe vrednosti povečujeta, kar pomeni, da so tako viskozne kot elastične lastnosti v tej formulaciji predvsem posledica koncentracije PVP-K90 in ne toliko ostalih komponent v formulaciji. Absolutno gledano, se razlika med G'' in G' povečuje, kar pomeni, da PVP-K90 v osnovi izraža več viskoznih kot elastičnih lastnosti, podobno kot mucin.

Ko oboje združimo v zmes, prav tako ne nastanejo geli, saj so G' še vedno nižji od G'' , imajo pa te zmesi občutno višje vrednosti reoloških parametrov in viskoznosti kot vzorci z vodo. Vrednosti smiselno naraščajo tudi s povečano koncentracijo PVP-K90. Tudi razlika med G'' in G' v zmesih z večjo količino PVP-K90 narašča, k čemer pripomore tudi mucin, ki izraža več viskoznostnih lastnosti G'' . Ne najdemo torej nobene anomalije, s katero bi lahko potrdili, da med polimerom in mucinom pride do specifične interakcije, ki bi kateri parameter nesorazmerno povečala ali zmanjšala. Tako PVP-K90 kot mucin bolj povečata G'' kot G' in oboje se sorazmerno poveča v zmesi, kar bi enostavno lahko bila posledica prispevka obeh.

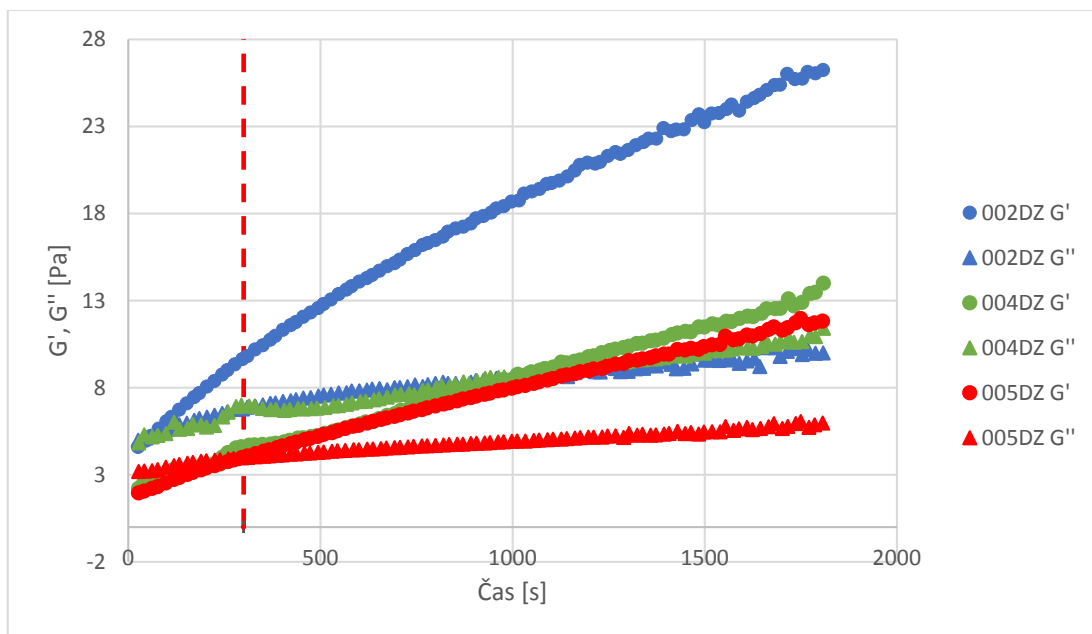
Visoke vrednosti sinergizmov v Preglednici XX kažejo na to, da interakcija med polimerom in mucinom kljub temu obstaja. Z večjo koncentracijo polimera se zvišuje tudi sinergizem, kar kaže na mukoadheivne lastnosti PVP-K90. Za potrditev bi potrebovali korelacijo s kakšno izmed drugih metod.

Kot že rečeno, kljub temu, da sta se mucina med seboj nekoliko razlikovala v barvi, vonju in velikosti delcev, po dispergiranju med njima ni bilo bistvenih razlik v obnašanju ali barvi. Želeli smo ugotoviti ali z vzorci vseeno tvorita podobne ali različne interakcije. Če pogledamo Preglednico XX, lahko vidimo, da so vrednosti reoloških parametrov in sinergizmov z uporabo različnih mucinov med seboj relativno podobne glede na red velikosti. Iz tega lahko sklepamo, da PVP-K90 tvori podobne interakcije z obema mucinoma in bi lahko na podlagi obeh določili, da z višjo koncentracijo polimera lahko dosežemo večji reološki sinergizem. Če pogledamo deviacije, opazimo, da je najmanjši RSD pri vseh parametrih pri 10 % koncentraciji PVP-K90 (vzorec 008P). To bi lahko pomenilo, da sta koncentracija mucina in PVP-K90 v idealnem

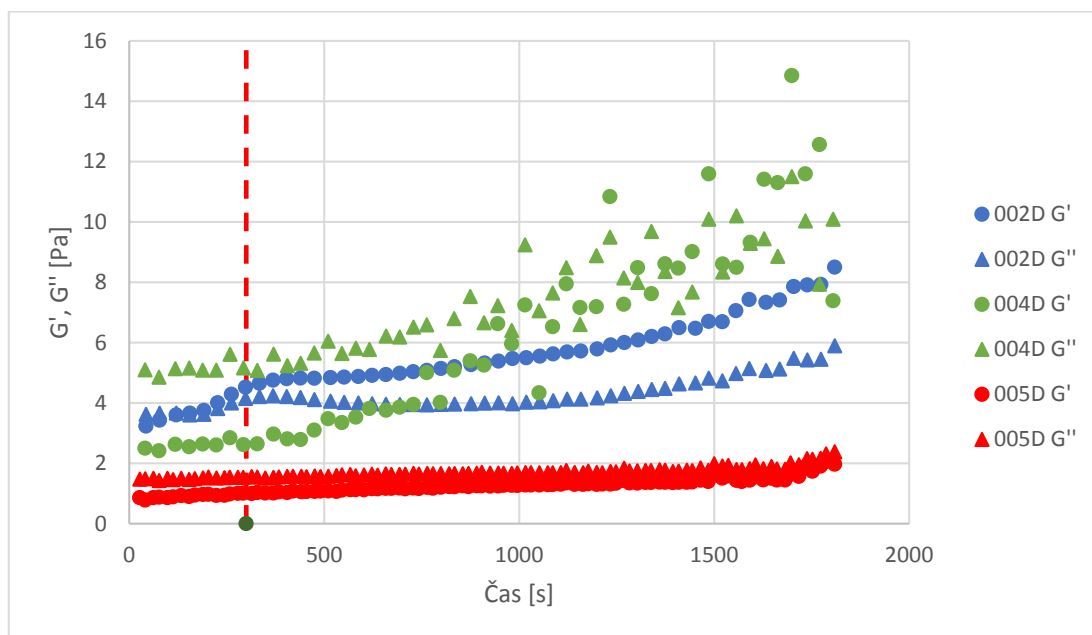
razmerju, enake interakcije pa se pojavijo z obema mucinoma. Večja odstopanja so opazna pri G' pri vzorcu 007P (RSD 21,41 %) in pri vseh parametrih vzorca 009P (RSD med 6,82 in 10,43 %). Vzroka ne znamo natančneje razložiti, lahko pa na podlagi rezultatov sklepamo, da je primerjava med njima mogoča in zadovoljivo dobra, vsekakor pa je priporočljivo, da za vzorce, ki jih želimo med seboj primerjati, uporabljamo isto serijo mucina. Navsezadnje je mucin tipa II neprečiščen, pridobljen iz posušenega mucina iz svinjskega želodca, na specifikaciji pa ima predpisano samo vrednost sialne kisline, ki mora biti okrog 1 %. Biološka variabilnost mucina je lahko torej pomemben faktor, če želimo vrednosti natančno kvantificirati ali jih korelirati s kakšno izmed drugih metod merjenja mukoadhezivnosti. V tem primeru bi bilo smiselno uporabljati isto serijo. Če pa je naš cilj samo približno ovrednotiti, katera izmed podobnih formulacij izkazuje boljše interakcije z mucinom, bi lahko uporabljali tudi različne mucine. Za nadaljnje raziskave z DoE vzorci smo se odločili, da bomo uporabljali samo eno serijo mucina in sicer LOT: SLBQ2688V, saj smo se želeli izogniti napaki, nastali zaradi različnih mucinov.

4.5 Časovni preizkus vzorcev narejenih po DoE

Vzorci, ki smo jih pripravili po DoE, med drugim vsebujejo Avicel RC-591 kot polimer. Avicel RC-591 izraža viskoelastične lastnosti – natančneje tiksotropijo. Pri tiksotropnih materialih viskoznost z naraščujočo silo in časom pada, njihova struktura pa se po prenehanju obremenitve obnovi. Posledica tega je, da je čas, ki ga potrebujemo od premešanja vzorca do reološke meritve lahko ključen za interpretacijo rezultatov, sploh če pri meritvi uporabljamo nizko obremenitev, ki strukture med meritvijo ne poruši. Vse do sedaj pripravljene poskuse smo pred meritvijo pustili 5 minut v reometru, da smo čas, kot komponento meritve, poenotili. Pri tem poskusu smo želeli ugotoviti, koliko časa je smiselno, da vzorci stojijo v reometru pred meritvijo, da tiksotropija ne bi pomembno vplivala na naše meritve. Izmed pripravljenih vzorcev smo s tem postopkom analizirali tri vzorce. Dva vzorca, ki imata povišanega enega izmed variiranih faktorjev (002D in 004D) in vzorec s ciljanima vrednostma Avicela RC-591 in Maldexa 150 (005D). Vse tri vzorce smo združili tudi z 20 % disperzijo mucina v razmerju 80:20 (oznaka DZ pri vzorcu) in jih pomerili. Meritev smo izvajali 30 minut pri konstantnih pogojih pri amplitudi 0,001 Pa in frekvenci 1 Hz.



Slika 10: Vpliv časa na reološke parametre vzorcev 002DZ, 004DZ in 005DZ



Slika 11: Vpliv časa na reološke parametre vzorcev 002D, 004D in 005D

Preglednica XXI: Rezultati točke prekrivanja (angl. »crossover«) vzorcev 002D(Z), 004D(Z) in 005D(Z)

Vzorec	Čas točke prekrivanja ($G'=G''$) (s)	Avicel RC-591	Maldex 150
002D	138,9	+	0
002DZ	57,29	+	0
004D	1137	0	+
004DZ	1064	0	+
005D	vedno $G'' > G'$	0	0
005DZ	294	0	0

Legenda: + predstavlja povišano količino polimera, 0 pa ciljano.

Da bi določili čas stanja vzorca v reometrom pred začetkom meritve, smo s pomočjo spremljanja časovne odvisnosti reoloških parametrov določili točko, kjer so se parametri razmeroma ustalili in se spreminjali linearno. Prav tako nismo želeli močno podaljšati meritve. Kot dober kompromis med obojim smo se odločili za čas 300 s oz. 5 min (navpična črtkana črta na Sliki 10 in Sliki 11), ki je enak času, ki smo ga uporabljali že pri prejšnjih meritvah. Metoda je torej ostala nespremenjena, smo pa tako dobili pomembne informacije o obnašanju vzorcev v kombinaciji z mucinom.

Iz Slike 10 in Slike 11 lahko razberemo, da vrednosti reoloških parametrov res naraščajo s časom meritve. To je najbolj opazno pri 002DZ, kjer naraste G' za trikrat v pol ure in ves čas enakomerno narašča. Takšno naraščanje elastičnega modula vzorca lahko pripišemo povišani količini Avicela RC-591, ki se obnaša viskoelastično/tiksotropno, zato ta lastnost vzorca pride bolj do izraza. Pri ostalih dveh vzorcih z mucinom (razlikujeta se po vsebnosti Maldexa 150, količina Avicela je enaka), je bilo naraščanje G' in G'' manj opazno, premice naraščanja pa so si skoraj vzporedne. To pomeni, da je Avicel RC-591 res tisti, ki povzroči časovno odvisno obnašanje vzorca na reološke parametre, medtem ko povečana količina Maldexa 150 nima tega vpliva. Presenetilo nas je, da pri vzorcih z mucinom (Slika 10) G' hitreje in bolj narašča kot pri vzorcih brez mucina (Slika 11), medtem ko na naraščanje G'' mucin ni imel velikega vpliva. Predhodno smo namreč ugotovili, da ima 20 % disperzija mucina višji G'' kot G' , zato bi bilo smiselno, da ima mucin večji vpliv na G'' kot na G' in ne obratno, kot tukaj. Iz tega lahko sklepamo, da med Avicelom RC-591 in mucinom pride do interakcije, ki omogoča Avicelu hitrejšo vzpostavitev gelske strukture oz. da lahko z mucinom v svoji rešetki tvori močnejši gel. V Preglednici XXI lahko vidimo zbrane točke prekrivanja obeh modulov, kjer iz viskozne tekočine nastane gel ($G' > G''$) ali obratno ($G'' > G'$). Višja vsebnost Avicela (002D) skrajša čas do ponovne vzpostavitve gela, mucin pa ta čas še bolj skrajša (002DZ). Da mucin skrajša čas vzpostavitve gela lahko vidimo tudi pri povišani količini Maldexa 150 (004D(Z)). Pri vzorcih 004D in 004DZ so časi do geliranja zelo dolgi, kar pomeni, da Maldex geliranje zavira. Zelo nas je presenetil vzorec s ciljanima vrednostma obeh faktorjev (005D(Z)), ki ni geliral. Pričakovali bi namreč, da čez čas nastane gel, glede na to, da nastane tudi pri vzorcu 004D(Z), ki ima povišano količino Maldexa, ki geliranje zavira. Kaj je razlog, ne znamo pojasniti, lahko pa vidimo, da se z dodatkom mucina gelska struktura vzpostavi relativno hitro.

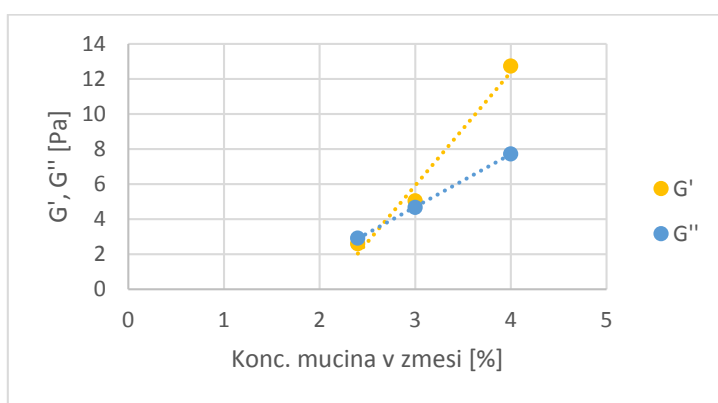
Rezultati nam povedo, da dodatek mucina lahko povzroči hitrejšo geliranje in ga morda celo inducira v vzorcih, ki drugače ne gelirajo (005D→005DZ).

4.6 Vpliv koncentracije mucina na G' , G'' in sinergizem DoE vzorcev

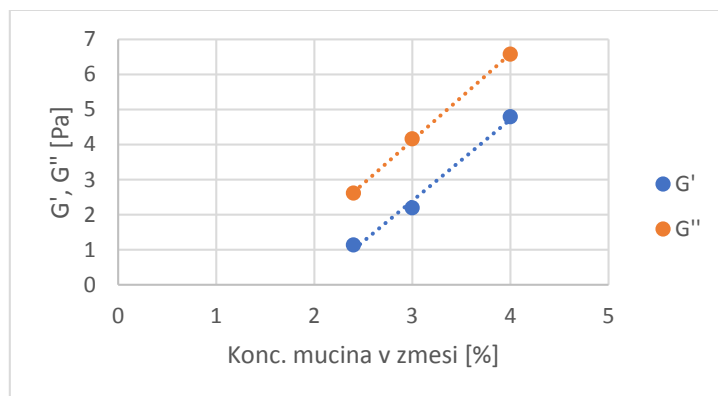
Ker smo s časovnim preizkusom ugotovili, da nekateri izmed vzorcev v kombinaciji z mucinom tvorijo gelsko strukturo, smo želeli ugotoviti, ali je za to pomembna končna koncentracija mucina v vzorcu. Tokrat smo vse naše vzorce z mucinom redčili v enakem razmerju (80:20), uporabljali pa smo različne koncentracije začetne disperzije mucina. Preverili smo tudi vpliv koncentracije mucina na sinergizem.

Preglednica XXII: Rezultati vpliva koncentracije mucina na G' , G'' in sinergizem vzorcev 002D, 004D in 005D

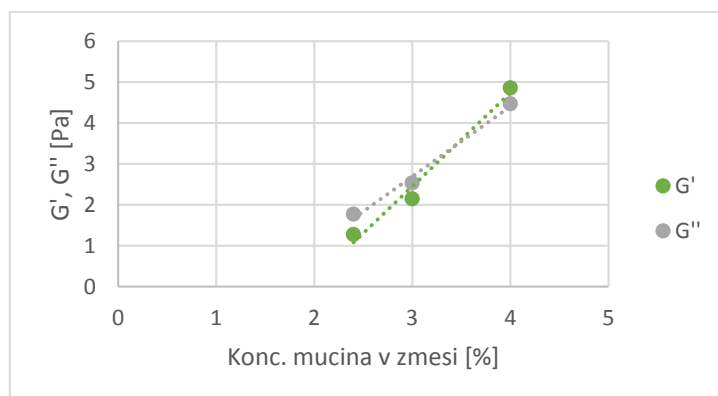
Vzorec	Avicel RC-591	Maldex 150	Konc. mucina v začetni disperziji [%]	Končna količina mucina v združenem vzorcu [%]	G' [Pa]	G'' [Pa]	Sinergizem G' [Pa]	Sinergizem G'' [Pa]
002DV	+	0	0	0	0,548	1,081	/	/
002DZ	+	0	20	4	12,727	7,718	12,178	6,637
002DZ2	+	0	15	3	5,045	4,672	4,496	3,591
002DZ3	+	0	12	2,4	2,593	2,918	2,044	1,837
004DV	0	+	0	0	0,260	0,965	/	/
004DZ	0	+	20	4	4,790	6,573	4,530	5,608
004DZ2	0	+	15	3	2,193	4,159	1,934	3,194
004DZ3	0	+	12	2,4	1,132	2,612	0,872	1,647
005DV	0	0	0	0	0,141	0,484	/	/
005DZ	0	0	20	4	4,856	4,469	4,715	3,985
005DZ2	0	0	15	3	2,145	2,532	2,004	2,047
005DZ3	0	0	12	2,4	1,271	1,769	1,130	1,284



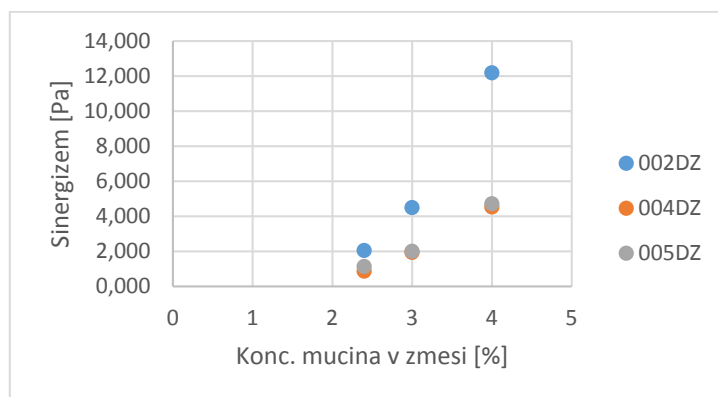
Slika 12: Vpliv koncentracije mucina na G' in G'' zmesi 002DZ-002DZ3



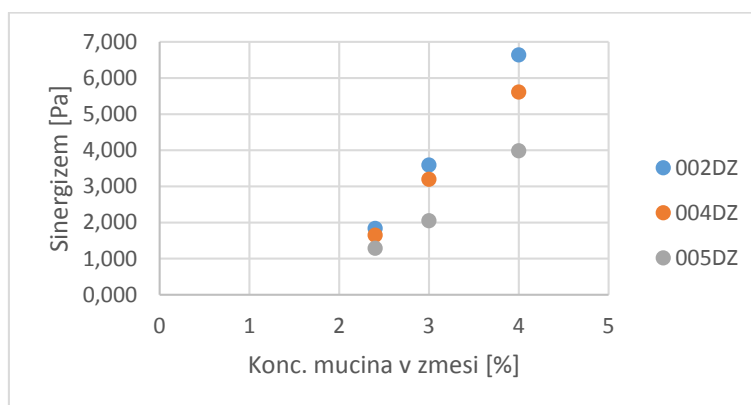
Slika 13: Vpliv koncentracije mucina na G' in G'' zmesi 004DZ-004DZ3



Slika 14: Vpliv koncentracije mucina na G' in G'' zmesi 005DZ-005DZ3



Slika 15: Vpliv koncentracije mucina na sinergizem G' za vzorce 002DZ, 004DZ in 005DZ



Slika 16: Vpliv koncentracije mucina na sinergizem G'' za vzorce 002DZ, 004DZ in 005DZ

Iz rezultatov zbranih v Preglednici XXII in iz Slik 15, 16 in 17 lahko zaključimo, da je koncentracija mucina v zmesi zelo pomemben faktor za dosego točke prekrivanja in tako vzpostavitev gelske strukture, kjer je $G' > G''$. Pomembna pa je tudi sestava vzorca. Pri 002DZ, kjer imamo povišan delež Avicela, je za tvorbo gela potrebna nižja koncentracija mucina okrog 2,5 %, za razliko od 005DZ (oba ciljana faktorja), kjer je potrebna koncentracija mucina okrog 3,5 %. Pri 004DZ, ki ima povečano količino Maldexa 150 do geliranja v preučevanem območju sploh ne pride, vzporednost premic pa nakazuje, da morda sploh ne more priti. To je torej še en argument, ki kaže da Maldex 150 onemogoča vzpostavitev gelske strukture in da smo se pravilno odločili, da smo uporabili 20 % disperzijo mucina in 4 % končno koncentracijo mucina. Prav tako to potrjuje, da med Avicelom RC-591 in mucinom res obstaja interakcija in da večja količina mucina vodi v močnejšo interakcijo, saj se G' močno poveča, čeprav se na podlagi njegovih reoloških lastnosti ne bi smel.

Iz Slik 18 in 19 lahko opazimo, da to interakcijo lahko potrdimo tudi na podlagi sinergizma. Pri vzorcu s povečanim deležem Avicela (002DZ) sinergizem namreč zelo narašča. Pri vzorcih 004DZ in 005DZ imamo enako koncentracijo Avicela, razlikujeta se samo v količini Maldexa. Točke teh dveh vzorcev se na Sliki 18 prekrivajo, kar pomeni, da z mucinom interagira le Avicel. Pri vseh vzorcih je z višjo koncentracijo mucina sinergizem G' in G'' višji, kar ponovno potrjuje, da je pomembna tako koncentracija mucina kot polimera, ki ga preučujemo.

4.7 Vpliv koncentracije/količine Avicela RC-591 in Maldexa 150 na reološke parametre in reološki sinergizem

Vzorci z oznako D predstavljajo čiste nerazredčene vzorce. Vzorci z oznako Z predstavljajo vzorce polimera združene z 20 % disperzijo mucina v razmerju 80:20. Vzorci z oznako V predstavljajo vzorce polimera, združene z vodo v razmerju 80:20.

Preglednica XXIII: Rezultati meritev DoE vzorcev za postavitev modela

Vzorec	Avicel RC-591	Maldex 150	G' [Pa]	G'' [Pa]	$ \eta^* $ [Pas]
001D	+	+	6,485	9,647	1,850
002D	+	0	5,980	3,993	1,145
003D	+	-	6,729	2,598	1,149
004D	0	+	2,773	5,143	0,931
005D	0	0	1,100	1,617	0,311
006D	0	0	1,205	1,663	0,327
007D	0	-	1,306	1,261	0,290
008D	-	+	0,753	2,340	0,391
009D	-	0	0,152	0,529	0,088
010D	-	-	0,058	0,230	0,038
Vzorec	Avicel RC-591	Maldex 150	G' [Pa]	G'' [Pa]	$ \eta^* $ [Pas]
4 % razt. mucina	/	/	0,0139	0,0881	0,014
Vzorec	Avicel RC-591	Maldex 150	G' [Pa]	G'' [Pa]	$ \eta^* $ [Pas]
001DZ	+	+	10,965	10,790	2,449
002DZ	+	0	12,727	7,718	2,369
003DZ	+	-	13,797	5,606	2,371
004DZ	0	+	4,790	6,573	1,295
005DZ	0	0	4,856	4,469	1,050
006DZ	0	0	3,856	3,979	0,882
007DZ	0	-	5,022	3,052	0,936
008DZ	-	+	1,325	3,197	0,552
009DZ	-	0	0,521	1,444	0,244
010DZ	-	-	0,526	1,066	0,189
Vzorec	Avicel RC-591	Maldex 150	G' [Pa]	G'' [Pa]	$ \eta^* $ [Pas]
001DV	+	+	0,592	1,639	0,277
002DV	+	0	0,548	1,081	0,193
003DV	+	-	0,435	0,788	0,143
004DV	0	+	0,260	0,965	0,159
005DV	0	0	0,141	0,484	0,080
006DV	0	0	0,117	0,458	0,075
007DV	0	-	0,142	0,372	0,063
008DV	-	+	0,051	0,451	0,072
009DV	-	0	0,014	0,189	0,030
010DV	-	-	0,006	0,113	0,018

Vzorec	Avicel RC-591	Maldex 150	Sinergizem G'	Sinergizem G''	$ \eta^* $
001D	+	+	10,286	9,063	2,157
002D	+	0	12,203	6,549	2,162
003D	+	-	13,296	4,730	2,213
004D	0	+	4,539	5,520	1,121
005D	0	0	4,712	3,896	0,956
006D	0	0	3,724	3,433	0,792
007D	0	-	4,870	2,592	0,858
008D	-	+	1,261	2,658	0,466
009D	-	0	0,490	1,167	0,200
010D	-	-	0,498	0,865	0,157

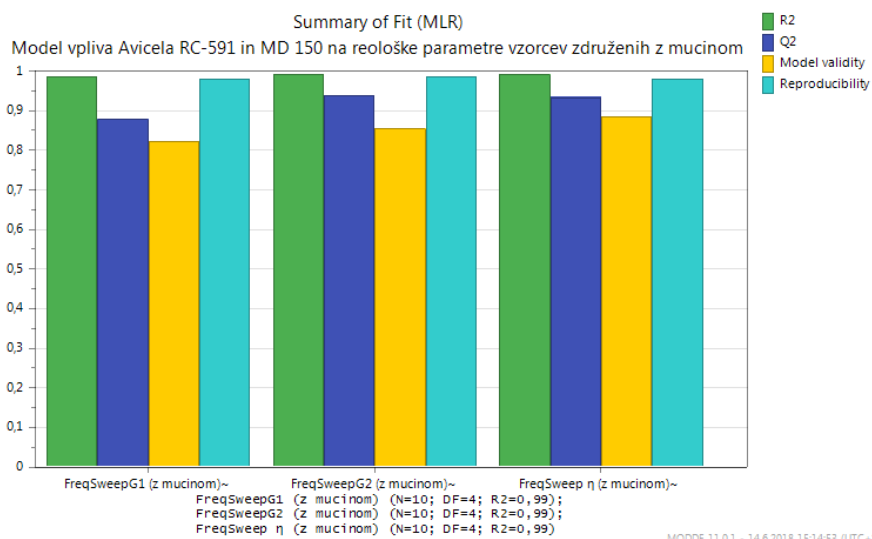
V Preglednici XXIII so zbrani vsi rezultati DoE vzorcev, kjer smo variirali količino/koncentracijo Avicela RC 591 in Maldexa 150 okrog ciljne vrednosti. Za postavitve modela smo uporabili program MODDE in metodo multiple linearne regresije. Postavili smo 8 različnih modelov – 3, ki opisujejo G', G'' in kompleksno viskoznost pri vzorcih pomešanih z mucini (DZ), 2 pri čistih vzorcih (D) in 3, ki opisujejo sinergizem G', G'' in kompleksne viskoznosti. Iz grafov »Replicate plot« smo ugotovili, da je variacija med paralelnimi eksperimenti (005D in 006D) in variacija med vsemi ostalimi eksperimenti majhna. Graf »Residuals normal probability« je pokazal, da nimamo izstopajočih vrednosti, rezultate pa smo pravilno logaritmično transformirali, saj so rezultati eksperimentov ležali na premici. Z grafom »Summary of Fit« smo s pomočjo parametrov R^2 , Q^2 , veljavnosti (»model validity«) in ponovljivosti (»reproducibility«) ocenili, če je postavljen model dober.

Dober model ima naslednje karakteristike:

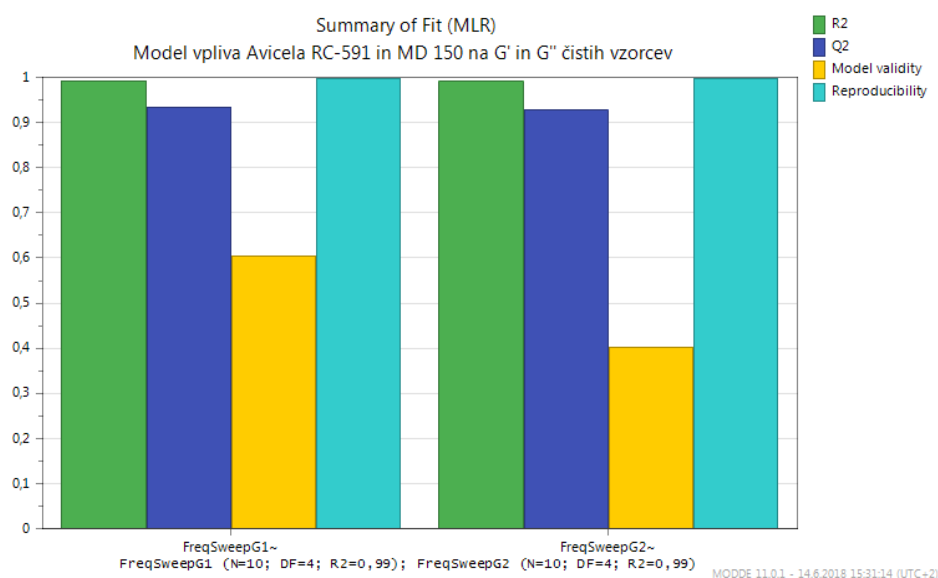
- razlika med R^2 in Q^2 ($R^2 - Q^2$) < 0,2-0,3;
- $Q^2 > 0,5$, odličen model ima $Q^2 > 0,9$;
- veljavnost modela (model validity) > 0,25;
- ponovljivost (reproducibility) > 0,5 (65).

Slika 17 v obliki stolpcev prikazuje kakovostne parametre izdelanih modelov vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na reološke parametre v vzorcih pomešanih z mucinom. Vidimo lahko, da so vsi trije modeli zelo dobri, saj so vrednosti R^2 pri vseh vzorcih 0,99. Vsi trije modeli imajo med seboj podobne kakovostne parametre, imajo pa tudi visoke vrednosti Q^2 (>0,97), veljavnosti (>0,8) in ponovljivosti (>0,97). Postavljeni modeli so torej odlični in lahko ponovljivo dajejo ustrezne rezultate ter jih tudi napovedo.

-

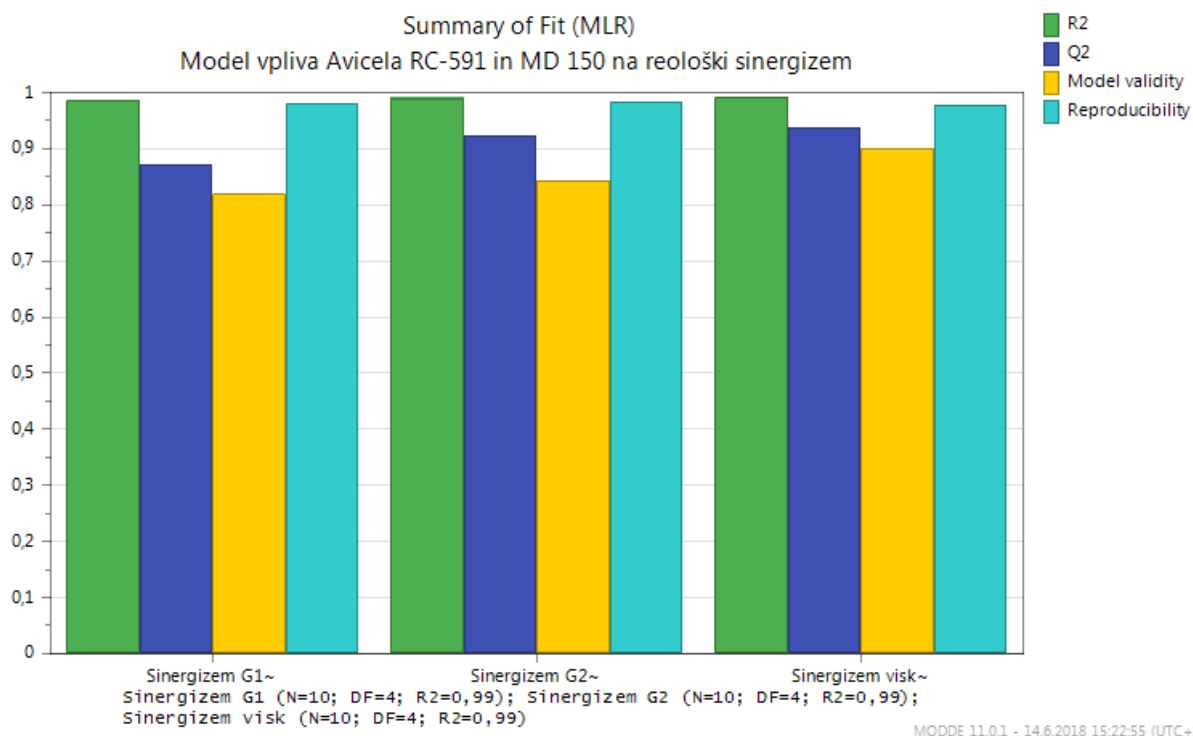


Slika 17: Grafični prikaz kvalitete postavljenega modela vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G' , G'' in $|\eta^*|$ za vzorce združene z mucinom (DZ)



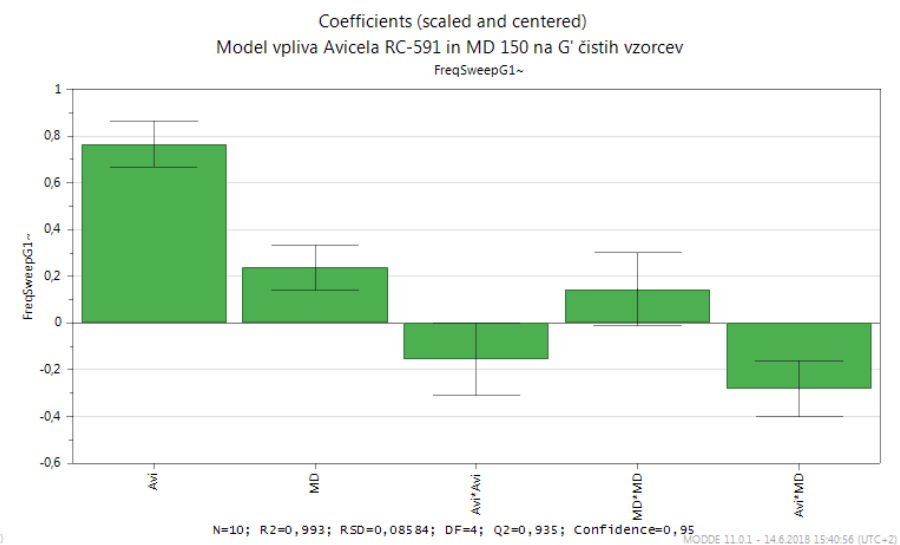
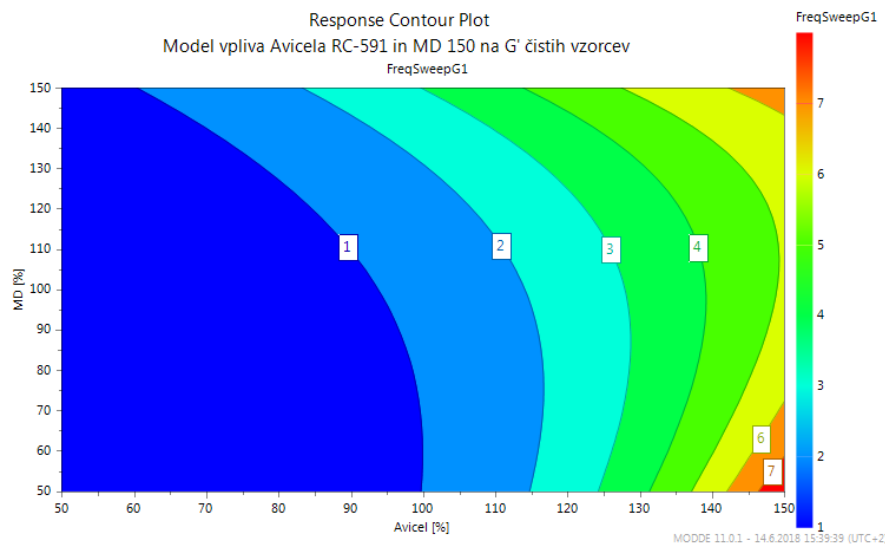
Slika 18: Grafični prikaz kvalitete postavljenega modela vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G' in G'' za čiste vzorce (D)

Slika 18 prav tako prikazuje kakovostne parametre, tokrat za modela vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G' in G'' za vzorce združene z mucinom. Tudi ta modela sta zelo dobra, saj imata visoko vrednost R^2 (0,99), Q^2 ($> 0,99$) in ponovljivosti ($> 0,97$). Veljavnost teh dveh modelov je nekoliko manjša kot pri ostalih. To je posledica zelo podobnih meritev paralelnih vzorcev (005D in 006D). Model interpretira, da morajo biti tudi ostale meritve tako točne, vendar niso, zaradi česar je veljavnost nižja kot pri ostalih. Še vedno je model veljaven saj zadostuje pogoju $> 0,25$ in ga lahko uporabljamo za interpretacijo ter napovedovanje rezultatov.

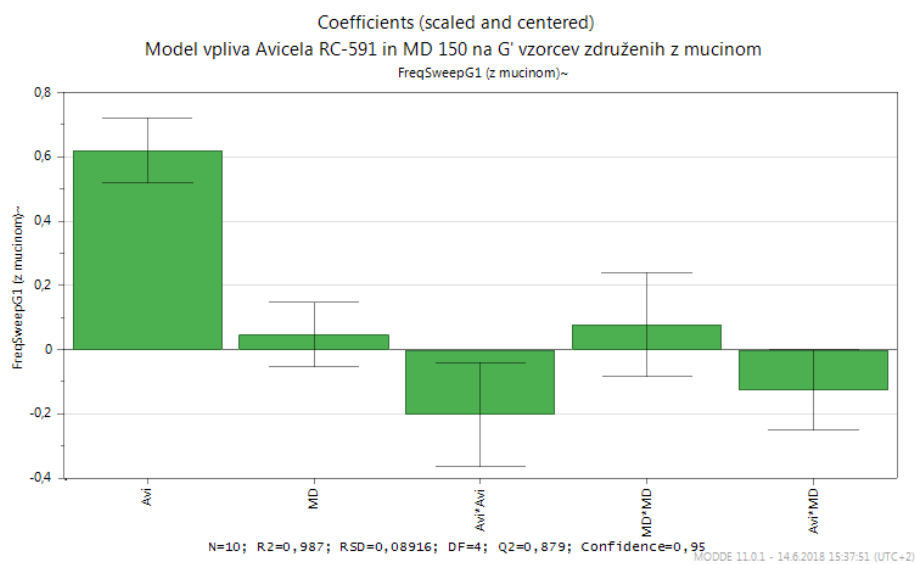
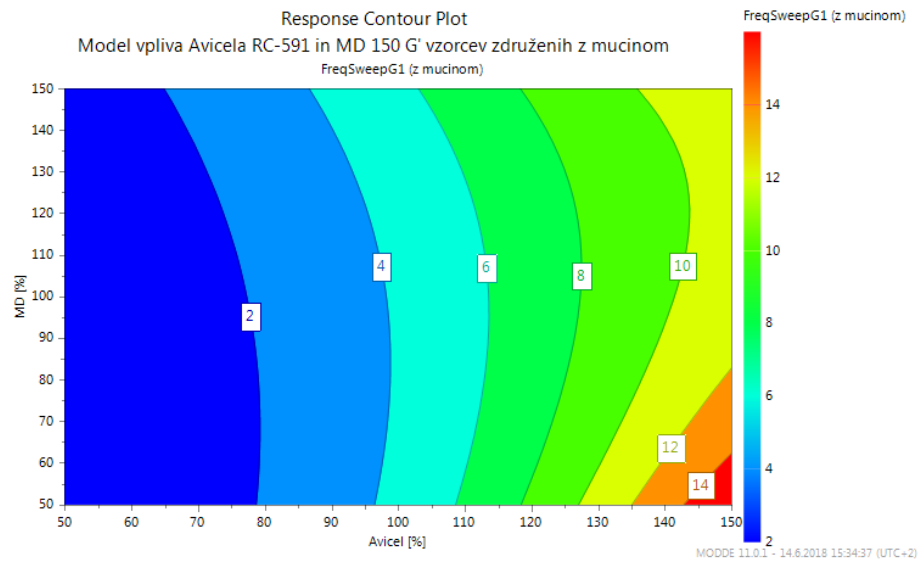


Slika 19: Grafični prikaz kvalitete postavljenega modela vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na sinergizem G' , G'' in $|\eta^*|$

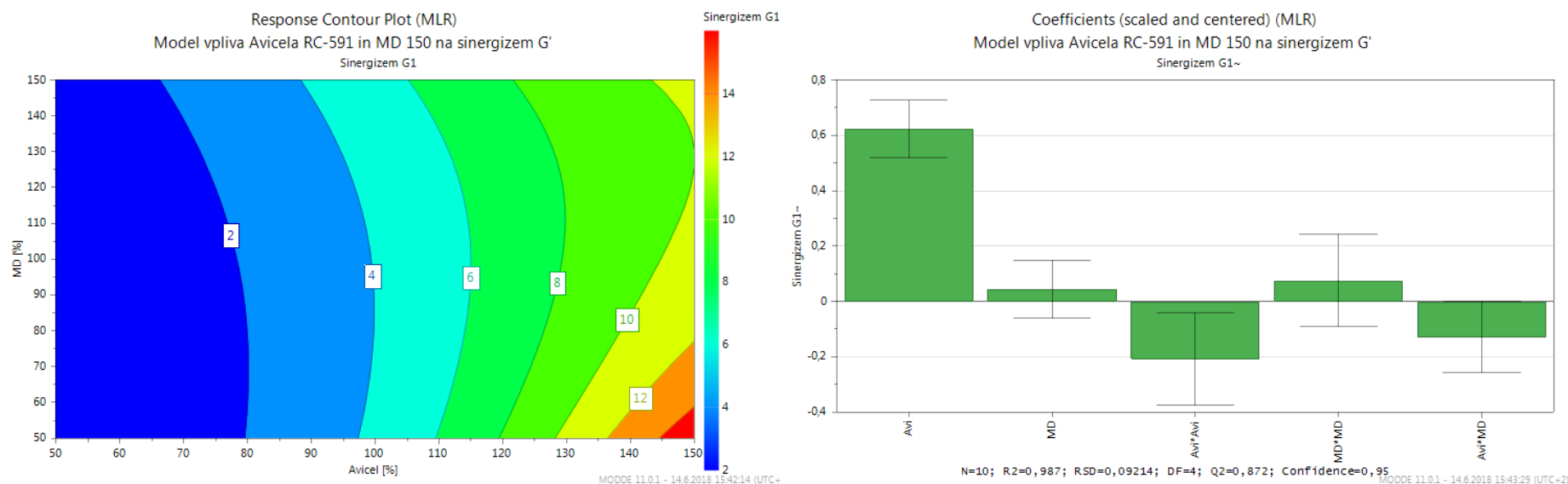
Slika 19 prikazuje model vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na sinergizem reoloških parametrov, iz njega pa lahko razberemo, da ima prav tako odlične kakovostne parametre kot predhodno postavljeni modeli. Tudi tukaj so vrednosti R^2 0,99, $Q^2 > 0,85$, veljavnost $> 0,8$ in ponovljivost $> 0,97$.



Slika 20: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G' čistih vzorcev (D)



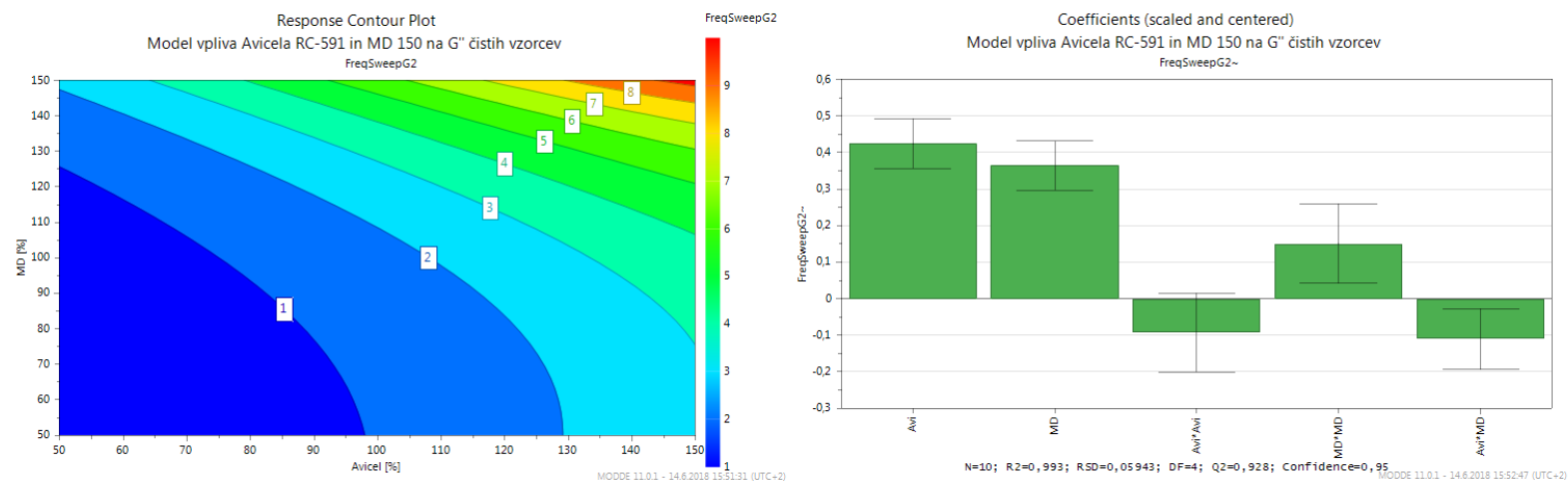
Slika 21: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G' vzorcev pomešanih z mucinom (DZ)



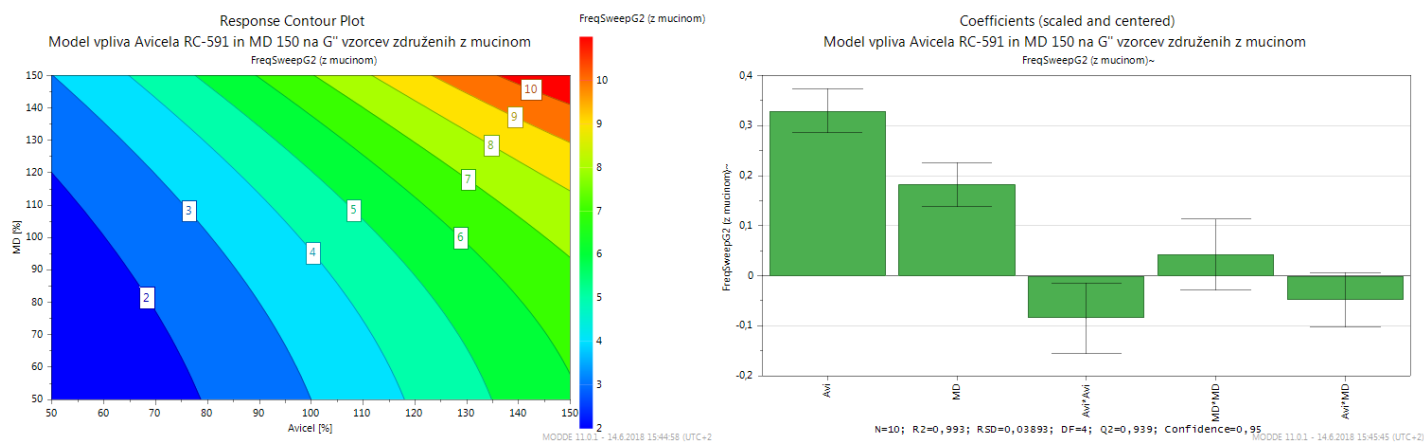
Slika 22: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na sinergizem G'

V levem delu Slik 20, 21 in 22 so v obliki izočrtnega diagrama prikazani rezultati G' za pomerjene čiste vzorce, zmesi vzorcev z mucinom in sinergizem G'. Desni del slik prikazuje koeficiente pripadajočih vzorcev, iz katerih lahko razberemo, kakšen je vpliv Avicela RC-591 ali Maldexa 150 na preiskovane parametre. Na podlagi koeficientov lahko trdimo, da ima Avicel RC-591 najmočnejši vpliv na G' tako v čistih vzorcih kot v zmesih mucinov (višji čisto levi stolpci), vpliva pa tudi na njegov sinergizem. To je posledica delovanja Avicela, saj tvori rešetko in vzpostavi gelsko strukturo, kar se izraža na povišanih G'. Vrednosti G' so bile pri zmesih celo višje kot pri čistih vzorcih, kljub temu, da je koncentracija Avicela RC-591 v zmesi nižja in da disperzije samega mucina ne izkazujejo gelskih lastnosti. Z modelom lahko torej ponovno potrdimo mukoadhezivno interakcijo med mucinom in Avicelom. Maldex 150 ni imel vpliva na G' v vzorcih z mucinom in na sinergizem. To nam pokaže interval zaupanja, ki prečka Y os, stolpec pa je znotraj intervala zaupanja. Maldex 150 je imel vpliv le pri čistih vzorcih. Rezultate potrjujejo tudi

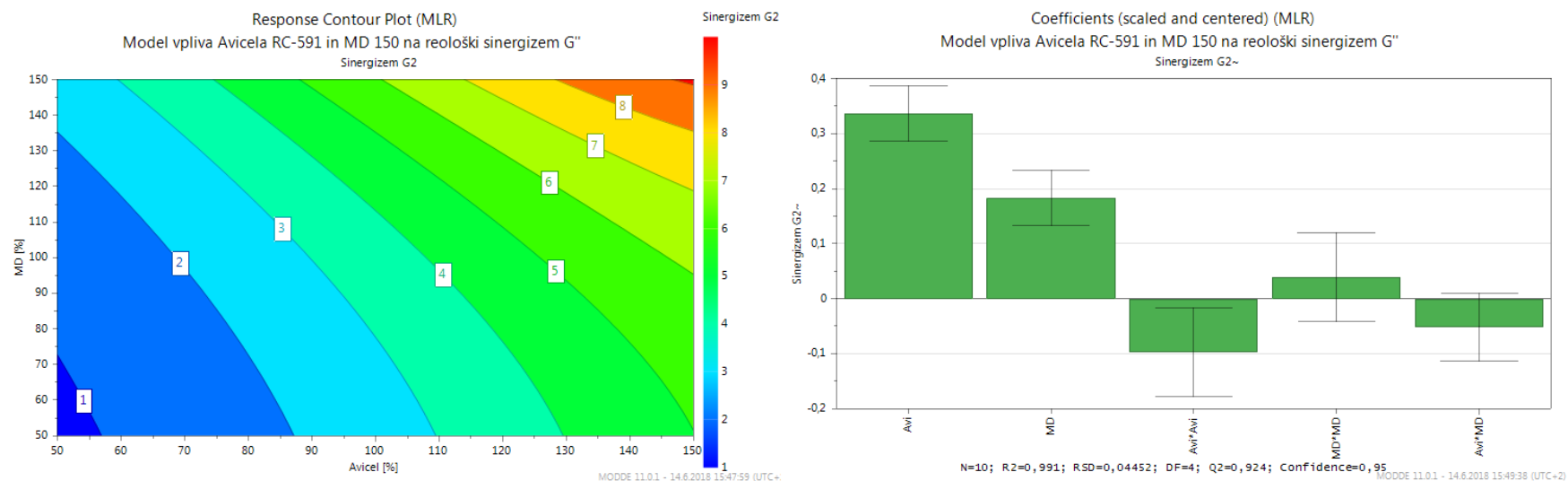
izočrtni diagrami – pri čistih vzorcih so izočrte bolj zaobljene za razliko od vzorcev z mucinom in pri synergizmu, kjer so bolj navpične. To pomeni, da pride v zmesi do interakcije med mucinom in Avicelom, kar potrjuje, da je Avicel deloval bolj mukoadhezivno, medtem ko Maldex 150 na mukoadhezijo ni imel bistvenega vpliva.



Slika 23: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G'' čistih vzorcev (D)



Slika 24: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G'' vzorcev pomešanih z mucinom (DZ)



Slika 25: Izočrtni diagram (levo) in graf koeficientov (desno) vpliva Avicela RC-591 in Maldexa 150 na sinergizem G''

Iz Slik 23, 24 in 25 lahko razberemo, da sta imela oba faktorja vpliv na G'' tako v čistih vzorcih kot v vzorcih z mucinom, vplivala pa sta tudi na sinergizem G'' . Pri čistih vzorcih je bil vpliv Maldexa 150 večji kot pri vzorcih z mucinom, kar je smiselno. Mucin namreč prav tako kot Maldex 150 izraža bolj viskozne lastnosti (G''). Posledično je bil torej v zmesi vpliv Maldexa 150 na G'' manjši, saj je imel vpliv na G'' tudi mucin, ki pa je v vseh zmesih konstanten. Ponovno smo opazili interakcijo mucina z Avicelom RC-591. Na Sliki 23 lahko namreč vidimo, da izočrte čistih vzorcev naraščajo relativno počasi glede na količino Avicela v vzorcu (proti desni). Na Sliki 24 vrednosti proti desni naraščajo hitreje, kar ponovno potrjuje, da interakcija med mucinom in Avicelom obstaja. Sinergizem G'' bi tako lahko bil še eden izmed napovednikov mukoadhezije vzorcev oz. bi se ga lahko uporabljalo v kombinaciji z interpretacijo sinergizma za G' . Glede na to, da so vsi postavljeni modeli zelo dobri, bi se lahko uporabljali za deformulacijo orginatorskega izdelka, kjer poznamo kvalitativno sestavo mukoadhezivnih polimerov, ne poznamo pa kvantitativne sestave. Z reološko metodo bi lahko natančneje določili količino Avicela RC-591 in Maldexa 150 v orginatorskem izdelku ter tako razvili ustrezen generik.

5 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo razvili reološko metodo, s katero lahko vrednotimo mukoadhezivne lastnosti nakaterih mukoadhezivnih polimerov. Osredotočili smo se na naslednje mukoadhezivne polimere: Carbopol 974P, Noveon AA-1, PVP-K90, Avicel RC-591 in Maldex 150. Postavili smo model, s katerim smo ovrednotili vpliv količine Maldexa 150 in Avicela RC-591 na mukoadhezivne lastnosti proučevane sestave. Mukoadhezivne lastnosti smo določali preko interakcij z mucinom, ki smo jih ovrednotili z reološkimi parametri G' , G'' , $|\eta^*|$ in reološkim sinergizmom. Z reološkim sinergizmom ovrednotimo interakcijo med mucinom in mukoadhezivnim polimerom. Večji kot je sinergizem, večja je interakcija. V magistrski nalogi smo ugotovili naslednje:

Razvoj reološke metode

- Razvita metoda reološkega vrednotenja mukoadhezivnosti obsega amplitudni in frekvenčni preizkus. Preizkuse smo izvajali na rotacijskem reometeru Haake Rheostress RS75, uporabljali pa smo geometrijo stožec (60 mm, 2°), ploščica (60 mm). Za meritve smo uporabljali naslednje parametre:

Preglednica XXIV: Povzetek parametrov reoloških meritev za vrednotenje mukoadhezivnosti

	Zvezno spremenjena vrednost	Konstantna vrednost	Št. merjenih točk:
Oscilacijski amplitudni test	Strižna napetost τ : 0,1 Pa – 10,0 Pa	Kotna frekvenca ω : 1,000 Hz	20
Oscilacijski frekvenčni test	Kotna frekvenca ω : 0,1000 Hz – 10,00 Hz	Strižna napetost τ : 0,4 Pa	20
Temperatura	23,00 °C $\pm$ 0,10 °C		
Širina reže	~ 0,095 mm		

- Glavni del razvoja je bil razvoj priprave vzorca in predpriprave pred meritvijo. Preiskovane vzorce z mukoadhezivnim polimerom smo združili z 20 % disperzijo mucina v razmerju 80:20, da smo dobili 4 % končno koncentracijo mucina. Vzorce smo čez noč pustili v hladilniku in jih pred meritvijo premešali. Vzorce smo nalili v reometer in jih pustili stati 5 min pred začetkom meritve.

- Za analizo podatkov uporabimo vrednosti iz frekvenčnega testa pri frekvenci 1 Hz.

Ugotovitve na osnovi izbrane reološke metode

- Disperzije mucina ne izražajo gelskih lastnosti, ne glede na koncentracijo.
- Reološke lastnosti disperzije mucina, razredčene na koncentracijo v združenem vzorcu so zanemarljive, saj imajo konsistenco vode. V izračunu sinergizma jih zato ni smiselno upoštevati.
- Pri vzorcih s PVP-K90, Avicelom RC-591 in Maldexom 150 smo ugotovili, da večja kot je končna koncentracija mucina v združenem vzorcu in manj kot vzorec pri združitvi razredčimo, večji je sinergizem. Najvišje sinergizme smo dosegli z 20 % začetno disperzijo mucina, ki smo jo združili z vzorcem v razmerju 80:20 (vzorec:mucin). Tako smo dobili 4 % končno koncentracijo mucina v vzorcu.
- Polimeroma Carbopol 974P in Noveon AA-1 se ob združitvi z disperzijo mucina tipa II poruši gelska struktura in se utekočinita. Izkazujeta negativne reološke sinergizme in tako nista primerna za vrednotenje mukoadhezivnih lastnosti s to metodo.
- Sinergizem se s povečano koncentracijo PVP-K90 zvišuje, kar kaže na mukoadhezivne lastnosti PVP-K90.
- Različne serije komercialno dostopnega mucina nimajo vpliva na reološke in posledično sinergistične rezultate ter so med seboj primerljivi.
- Dodatek mucina vzorcem z Avicelom RC-591 in Maldexom 150 povzroči hitrejšo vzpostavitev gelske strukture in jo lahko pri vzorcih, ki ne gelirajo, inducira.
- Maldex 150 zavira vzpostavitev gelske strukture.
- Mucin in Avicel RC-591 tvorita mukoadhezivno interakcijo, kar se odraža v nesorazmerno povišanih vrednostih reoloških parametrov in sinergizmu.

Postavitev modela

- Postavili smo modele vpliva koncentracija Avicela RC-591 in Maldexa 150 na G' , G'' in reološki sinergizem. Modeli so bili postavljeni z reološko analizo čistih vzorcev in teh vzorcev pomešanih z mucinom. Postavljeni modeli so imeli dobro ujemanje z izhodnimi podatki, dobro napovedno moč in veljavnost. Z modeli smo na podlagi G' , G'' in reološkega sinergizma ugotovili interakcije Avicela RC-591 z mucinom.

Pri tem moramo poudariti, da uporabljena reološka metoda ni primerna za vse polimere, saj smo že pri naših poskusih ugotovili, da so nekateri polimeri z mucinom nekompatibilni. Za vsako formulacijo oz. mukoadhezivni polimer, ki ga želimo analizirati je potrebno

ovrednotiti, ali metoda daje smiselne rezultate. Metoda je primerna za medsebojno primerjavo enakih formulacij z različno kvantitativno sestavo mukoadhezivnih polimerov. Posledično bi se lahko na podlagi modela uporabljala za deformulacijo originatorskih izdelkov. Še prej bi bilo potrebno potrditi napovedno moč modela z vzorci, ki jih nismo vključili v izdelavo modela. Nadalje bi bilo smiselno ovrednotiti še več polimerov in mukoadhezijo ovrednotiti še z drugimi metodami ter rezultate primerjati. Zanimivo bi bila tudi uporaba različnih tipov mucinov ali naravnega mucina, ki bi lahko bolje posnemal dejanske interakcije na sluznici. Absolutna primerjava mukoadhezije med različnimi polimeri je namreč s pomočjo reologije težavna, saj je mukoadhezija kompleksen pojav z različnimi mehanizmi, ki se ne odraža zmeraj v reoloških lastnostih.

6 LITERATURA

1. Boddupalli B, Mohammed Z., Nath R, Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 2010; 1(4): 381-387.
2. Obreza A, Smid-Korbar J, Humar M, Janes D, Razinger-Mihovec B, Frankic D, Kosirnik B, Lunder M, Jeras M, Marc J, Gasperlin M, Baumgartner S, Kos M, Mrhar A, Cerne D, Svajger B, Hribar M, Tomazin E, Bozic B, Marinko P, Kreft S, Vucko Mole S, et al. *Farmacevtski terminoloski slovar*. Založba ZRC, Ljubljana, 2011: 157-158
3. Ahuja A, Roop K. K, Javed A. Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1997; 23(5): 489–515.
4. Andrews GP, Laverty TP, Jones DS. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 71(3): 505–518.
5. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005; 57(11): 1556–1568.
6. Shaikh R, Raj Singh T, Garland M, Woolfson A, Donnelly R. Mucoadhesive drug delivery systems. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* 2011; 3(1): 89–100.
7. Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005; 57(11): 1595–1639.
8. Carvalho F, Bruschi M, Evangelista R, Gremião M. Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 46(1): 1–17.
9. Nagai T. Adhesive topical drug delivery system. *Journal of Controlled Release* 1985; 2: 121–134.
10. Tsuneji N, Yuji N, Naoki N, Yoshiki S, Kunio S. Powder dosage form of insulin for nasal administration. *Journal of Controlled Release* 1984; 1(1): 15–22.
11. Park K, Robinson JR. Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion. *International Journal of Pharmaceutics* 1984; 19(2): 107–127.
12. Singh R, Sharma D, Garg R. Review on Mucoadhesive Drug Delivery System with Special Emphasis on Buccal Route: An Important Tool in Designing of Novel Controlled Drug Delivery System for the Effective Delivery of Pharmaceuticals. *Journal of Developing Drugs* 2017; 06(01): 1–12.
13. Das NG, Das SK. Development of Mucoadhesive Dosage Forms of Buprenorphine for Sublingual Drug Delivery. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents* 2004; 11(2): 89–95.
14. Acartürk F. Mucoadhesive vaginal drug delivery systems. *Recent patents on drug delivery & formulation* 2009; 3: 193–205.
15. Varum FJO, McConnell EL, Sousa JJS, Veiga F, Basit AW. Mucoadhesion and the gastrointestinal tract. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 2008; 25(3): 207–258.
16. Rao M, Agrawal DK, Shirsath C. Thermoreversible mucoadhesive in situ nasal gel for treatment of Parkinson's disease. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2017; 43(1): 142–150.
17. Batchelor H. Bioadhesive dosage forms for esophageal drug delivery. *Pharmaceutical Research* 2005; 22(2): 175–181.
18. Rajput GC, Majmudar FD, Patel JK, Patel KN, Thakor RS, Patel BP, Nb R. Stomach Specific Mucoadhesive Tablets As Controlled Drug Delivery System – A Review

- Work. International Journal on Pharmaceutical and Biological Research 2010; 1(1): 30–41.
19. Perioli L, Pagano C. Preformulation studies of mucoadhesive tablets for carbamazepine sublingual administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 102: 915–922.
 20. Fonseca-Santos B, Chorilli M. An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation. *Materials Science and Engineering*; 86: 129–143.
 21. Muzib YI, Kumari KS. Mucoadhesive buccal films of glibenclamide: Development and evaluation. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 2011; 1(1): 42–47.
 22. Phanindra B, Krishna Moorthy B, Muthukumaran M. Recent Advances in Mucoadhesive/ Bioadhesive Drug Delivery System: a Review. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 2013; 2(1): 68–84.
 23. <http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/655A85EC8D42B634C12579EC0020013B?opendocument>, dostopano april 2018.
 24. <https://www.drugs.com/onsolis.html>, dostopano april 2018.
 25. Bansil R, Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2006; 11(2–3): 164–170.
 26. Kharenko EA, Larionova NI, Demina NB. Mucoadhesive drug delivery systems (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2009; 43(4): 200–208.
 27. Cook MT, Khutoryanskiy V V. Mucoadhesion and mucosa-mimetic materials - A mini-review. *International Journal of Pharmaceutics* 2015M 495(2): 1-24.
 28. Khutoryanskaya O, Potgieter M, Khutoryanskiy V. Multilayered Hydrogel Coatings Covalently-Linked to Glass Surfaces Showing a Potential to Mimic Mucosal Tissues., *Soft matter* 2010; 6: 551-557.
 29. Cook MT, Smith SL, Khutoryanskiy V V. Novel glycopolymer hydrogels as mucosa-mimetic materials to reduce animal testing. *Chemical Communications*. 2015; 51(77): 14447–14450.
 30. Tangri P, Madhav NVS. Recent advances in oral mucoadhesive drug delivery systems: A review. *International Journal of Pharma Research and Development – Online* 2010; 3(2): 151–162.
 31. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m3895>, dostopano april 2018.
 32. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m2378>, dostopano april 2018.
 33. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m1778>, dostopano april 2018.
 34. Kararli T. T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & Drug disposition* 1995; 16: 351–380.
 35. Kočevár-Nared J, Kristl J, Šmid-Korbar J. Comparative rheological investigation of crude gastric mucin and natural gastric mucus. *Biomaterials* 1997; 18(9): 677–681.
 36. Taylor C, Pearson JP, Draget KI, Dettmar PW, Smidsrød O. Rheological characterisation of mixed gels of mucin and alginate. *Carbohydrate Polymers* 2005; 59(2): 189–195.
 37. Zupancic-Valant A. Uvod v reologijo : opis osnovnih reoloskih pojmov in reoloska klasifikacija tekocin, reoloski modeli, reometrija in slovarček reoloskih izrazov. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2007: 7–50.
 38. Planinsek O, Srcic S. Vaje iz fizikalne farmacije. Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2006: 1–17.
 39. Mazzeo FA. Importance of Oscillatory Time Sweeps in Rheology. 2008: 1–4.
 40. Hassan EE, Gallo JM. A Simple Rheological Method for the in Vitro Assessment of

- Mucin-Polymer Bioadhesive Bond Strength. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* 1990; 7(5): 491–495.
41. Hägerström H, Edsman K. Limitations of the rheological mucoadhesion method: The effect of the choice of conditions and the rheological synergism parameter. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003; 18(5): 349–357.
 42. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wikström C, Wold S. Design of Experiments: Principles and Applications., Umetrics 2008: 1-99.
 43. www.signetchem.com/Content/Upload/tBZ997AvicelRC591NFspec.pdf, dostopano april 2018.
 44. Obreza A, Bevc B, Baumgartner S, Sollner Dolenc M, Humar M. Naslov: Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravlju Spletni učbenik za študente farmacije, industrijske farmacije in kozmetologije. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015: 1-208.
 45. https://www.researchgate.net/profile/Rafik_Karaman/post/What_is_the_purpose_of_lactic_acid_and_acidulants_in_general_in_injectable_formulations/attachment/59d63b8279197b80779988a2/AS%3A411087125139456%401475022217054/download/Handbook-of-pharmaceutical-excipients-6th-edition.pdf, dostopano april 2018.
 46. <https://www.lubrizol.com/Life-Sciences/Regulatory/USP-NF-Listing-of-Lubrizol-Polymers>, dostopano april 2018
 47. Tamburic S, Craig DQM. An investigation into the rheological, dielectric and mucoadhesive properties of poly (acrylic acid) gel systems. *Journal of Controlled Release* 1995; 37: 59–68.
 48. De Souza Ferreira SB, Da Silva JB, Borghi-Pangoni FB, Junqueira MV, Bruschi ML. Linear correlation between rheological, mechanical and mucoadhesive properties of polycarbophil polymer blends for biomedical applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2017; 68: 265–275.
 49. Fogg FJ, Hutton D a, Jumel K, Pearson JP, Harding SE, Allen a. Characterization of pig colonic mucins. *The Biochemical journal* 1996; 316 (3): 937–942.
 50. Mortazavi SA. An in vitro assessment of mucus/mucoadhesive interactions. *International Journal of Pharmaceutics* 1995; 124(2): 173–182.
 51. Riley RG, Smart JD, Tsibouklis J, Dettmar PW, Hampson F, Davis JA, Kelly G, Wilber WR. An investigation of mucus/polymer rheological synergism using synthesised and characterised poly(acrylic acid)s. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 217(1–2): 87–100.
 52. Madsen F, Eberth K, Smart JD. A rheological assessment of the nature of interactions between mucoadhesive polymers and a homogenised mucus gel. *Biomaterials* 1998; 19(11–12): 1083–1092.
 53. Madsen F, Eberth K, Smart JD. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: The effect of mucoadhesive type and concentration. *Journal of Controlled Release* 1998; 50(1–3): 167–178.
 54. Madsen F, Eberth K, Smart JD. A rheological evaluation of various mucus gels for use in in-vitro mucoadhesion testing. *Pharmaceutical Sciences* 1996; 1(1992): 563–566.
 55. Rossi S, Bonferoni MC, Lippoli G, Bertoni M, Ferrari F, Caramella C, Conte U. Influence of mucin type on polymer-mucin rheological interactions. *Biomaterials* 1995; 16(14): 1073–1079.
 56. Rossi S, Bonferoni MC, Ferrari F, Bertoni M, Caramella C. Characterization of mucin interaction with three viscosity grades of sodium carboxymethylcellulose. Comparison between rheological and tensile testing. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996; 4: 189–196.

57. Ivarsson D, Wahlgren M. Comparison of in vitro methods of measuring mucoadhesion: Ellipsometry, tensile strength and rheological measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2012; 92: 353–359.
58. Sriamornsak P, Wattanakorn N. Rheological synergy in aqueous mixtures of pectin and mucin. *Carbohydrate Polymers* 2008; 74(3): 474–481.
59. Thirawong N, Kennedy RA, Sriamornsak P. Viscometric study of pectin-mucin interaction and its mucoadhesive bond strength. *Carbohydrate Polymers* 2008; 71(2): 170–179.
60. Hägerström H, Paulsson M, Edsman K. Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in simulated physiological conditions using a rheological method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000; 9(3): 301–309.
61. Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC, Caramella C. Characterization of chitosan hydrochloride-mucin rheological interaction: influence of polymer concentration and polymer:mucin weight ratio. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; 12(4): 479–485.
62. Tamburic S, Craig DQM. A comparison of different in vitro methods for measuring mucoadhesive performance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1997; 44(2): 159–167.
63. <https://nnf.mit.edu/home/billboard/topic-5>, dostopano april 2018
64. Bell A, Sellers LA, Allen A, Cunliffe W, Morris E, Ross-Murphy SB. Properties of Gastric and Duodenal Mucus: Effect of Proteolysis, Disulfide Reduction, Bile, Acid, Ethanol, and Hypertonicity on Mucus Gel Structure. *Gastroenterology* 1985; 88: 269–280.
65. https://serviceshop.sartorius.com/fileadmin/media/global/products/Manual_BioPAT_MODDE_10.1.pdf, dostopano april 2018.