

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA KAVČIČ

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA KAVČIČ

**VPLIV POMOŽNIH SNOVI NA TERMOREVERZIBILNE
LASTNOSTI POLOKSAMERNIH HIDROGELOV**

**THE IMPACT OF EXCIPIENTS ON THE
THERMOREVERSIBLE PROPERTIES OF POLOXAMER
HYDROGELS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar za strokovne nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem Maji Radivojša Matanović za vpeljavo v samostojno izdelavo naloge ter tehnični sodelavki Tatjani Hrovatič za pomoč pri delu v laboratoriju.

Nenazadnje se želim še posebno zahvaliti celotni družini za tako moralno, kot tudi finančno podporo v času študija.

Izjava

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

Ljubljana, 2015

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh

Član diplomske komisije: doc. dr. Nina Kočever Glavač

Vsebina

| | |
|--|----|
| Vsebina | 3 |
| Povzetek | 5 |
| Abstract | 6 |
| Ključne besede | 7 |
| Keywords..... | 7 |
| Seznam okrajšav..... | 7 |
| 1. Uvod | 8 |
| 1.1. Hidrogeli | 8 |
| 1.1.1. Termoreverzibilni hidrogeli | 8 |
| 1.1.2. Poloksameri..... | 9 |
| 1.1.3. Priprava termoreverzibilnih hidrogelov | 12 |
| 1.1.4. Mehanizem tvorbe hidrogela..... | 13 |
| 1.1.5. Temperatura geliranja termoreverzibilne formulacije..... | 14 |
| 1.1.6. Pomožne snovi, ki vplivajo na temperaturo geliranja | 15 |
| 1.1.5. Raztapljanje hidrogelov..... | 19 |
| 1.2. Parenteralna aplikacija..... | 19 |
| 1.2.1. Podkožna aplikacija učinkovine..... | 20 |
| 1.3. Reologija..... | 21 |
| 1.3.1. Reometrija..... | 21 |
| 2. Namen dela | 23 |
| 3. Materiali in metode..... | 24 |
| 3.1. Materiali | 24 |
| 3.2. Naprave | 24 |
| 3.3. Metode..... | 25 |
| 3.3.1. Postopek priprave termoreverzibilnih hidrogelov | 25 |
| 3.3.2. Določanje temperature geliranja termoreverzibilnih hidrogelov | 27 |
| 3.3.3. Postopek raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov..... | 30 |
| 3.3.4. Določanje sposobnosti injiciranja termoreverzibilnih formulacij | 30 |
| 4. Rezultati in razprava..... | 32 |

| | |
|--|----|
| 4.1. Določanje temperature geliranja in reoloških lastnosti vzorcev..... | 32 |
| 4.1.1. Formulacije s P407 | 32 |
| 4.1.2. Formulacije s P407 in P188 | 33 |
| 4.1.3. Formulacije s P407, P188 in HPMC | 37 |
| 4.1.4. Formulacije s P407, P188 in MC..... | 40 |
| 4.1.5. Formulacije s P407, P188 in HEC..... | 43 |
| 4.1.6. Formulacije s P407, P188 in CMC..... | 44 |
| 4.1.7. Formulacije s P 407, P 188 in NaCl | 44 |
| 4.1.8. Formulacije s P407, P188 in PEG | 45 |
| 4.1.9. Formulacije s P407, P188 in NaCl, MC ali HPMC..... | 46 |
| 4.1.10. Formulacije s P407, P188 in HPMC, MC ali HEC..... | 47 |
| 4.3. Raztapljanje termoreverzibilnih hidrogelov..... | 48 |
| 4.4. Sposobnost injiciranja termoreverzibilnih formulacij..... | 50 |
| 5. Sklep | 52 |

Povzetek

Termoreverzibilni hidrogeli so zelo privlačen dostavni sistem zaradi biorazgradljivosti, netoksičnosti, nadzorovanega sproščanja učinkovine ter stabilnosti. Zanje je značilno, da so pri nizki (4–5 °C) in visoki (nad 70 °C) temperaturi v tekočem agregatnem stanju, pri sobni ali telesni temperaturi pa v odvisnosti od koncentracije poloksamera tvorijo gel. Primerni so za različne načine aplikacije. Proučevali smo možnost podkožne aplikacije termoreverzibilne formulacije, katere sestava temelji na poloksamerih P407 ter P188. Temperaturo geliranja, primerno za subkutano aplikacijo, smo poskušali doseči s spreminjanjem vsebnosti posameznega poloksamera (P407 ali P188) ter z dodatkom pomožnih snovi, kot so hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), metilceluloza (MC), hidroksietilceluloza (HEC), karboksimetilceluloza (CMC), natrijev klorid in polietilenglikol. Pripravljenim formulacijam smo določili temperaturo geliranja s tremi različnimi metodami (s pomočjo magnetnega mešala ter z rotacijsko in oscilacijsko reologijo), čas raztapljanja in sposobnost injiciranja. Želeli smo izdelati formulacijo s temperaturo geliranja med 34 in 36 °C. V primeru nižje temperature geliranja bi lahko prišlo do nastanka gela med aplikacijo (injiciranjem), v primeru višje temperature geliranja pa pri temperaturi podkožja ne bi nastal dovolj viskozen gel, posledično bi se učinkovina prehitro sprostila. Dodatne zahteve za formulacijo so bile: čas raztapljanja hidrogela je moral znašati najmanj 5 dni, saj naj bi hidrogel omogočal podaljšano sproščanje vgrajene učinkovine in pa sposobnost iztisa preko igle 25G, oziroma vsaj 21G, saj sta ti igli primerne premera za podkožno aplikacijo.

Ugotovili smo, da lahko s spreminjanjem vsebnosti poloksamerov in z dodatkom raznih pomožnih snovi vplivamo tako na temperaturo geliranja formulacije kot tudi na čas raztapljanja in sposobnost injiciranja slednje. Večje koncentracije poloksamera P407 ter pomožnih snovi HPMC, HEC, MC in NaCl povečajo viskoznost in znižajo temperaturo geliranja, P188 pa temperaturo geliranja zviša in zniža viskoznost. Dodatek CMC preveč zviša viskoznost, zato smo te formulacije izločili iz nadaljnjih preiskav, PEG pa znatno zviša viskoznost in temperaturo geliranja, vendar učinka ne naraščata sorazmerno z njegovo koncentracijo. Glede na pridobljene rezultate smo ugotovili, da so za podkožno aplikacijo najbolj ustrezni hidrogeli s sestavo 20 % P407/7 % P188/1 % MC, 18 % P407/5 % P188/1,5 % MC, 18 % P407/5 % P188/1,25 % HPMC, 20 % P407/7 % P188/0,25 % HPMC in 20 % P407/7 % P188/0,5 % HPMC.

Abstract

Thermoreversible hydrogels are a very appealing delivery system due to their biodegradability, non-toxicity, controlled release of the substance and stability. At low (4-5 °C) and high (above 70 °C) temperatures they are in a liquid state, whereas at room or body temperature (depending on the concentration of the poloxamer) they form a gel. They are suitable for different types of applications. We have studied the possibility of subcutaneous administration of a thermoreversible formulation with a composition based on poloxamers P407 and P188. We have tried to achieve the gelation temperature suitable for subcutaneous application by varying the concentration of the individual poloxamer (P407 or P188) and the addition of auxiliary substances, such as hydroxypropylmethylcellulose, methylcellulose, hydroxyethylcellulose, carboxymethylcellulose, sodium chloride and polyethylene glycol. The gelation temperature of the prepared formulations was determined by using three different methods (using a magnetic stirrer and the rotation and oscillation rheology), dissolution time and injectability. We wanted to produce a formulation with a gelation temperature between 34 and 36 °C. Lower gelation temperatures could lead to the formation of a gel during the administration (injection), whereas higher gelation temperatures at a subcutaneous tissue temperature would not form sufficiently viscous gel and consequently the active ingredient would be released too rapidly. Additional requirements for the formulation were as follows: time of dissolution of the hydrogel had to be at least five days since the hydrogel should allow sustained release of the incorporated active substance, and the ability of outflow through 25G, or at least 21G needles, as they are of a suitable diameter for subcutaneous administration. We have found that by varying the concentrations of poloxamers and by adding various excipients, we influence the gelation temperature of the formulation as well as the dissolving time and the ability of the injection of the latter. Larger concentrations of poloxamer P407 and excipients HPMC, HEC, MC and NaCl increase the viscosity and reduce the gelation temperature, while P188 increases the gelation temperature and reduces viscosity. Since the CMC additive increases viscosity too much, we have excluded these formulations from further tests. On the other hand, PEG significantly increases viscosity and gelation temperature but the effects do not increase proportionally to its concentration. Given the obtained results, we have found that the most appropriate hydrogels for the subcutaneous application are those with the composition of 20 % P407/7 % P188/1 % MC, 18 % P407/5 % P188/1.5 % MC, 18 % P407/5 %

P188/1.25 % HPMC, 20 % P407/7 % P188/0.25 % HPMC and 20 % P407/7 % P188/0.5 % HPMC.

Ključne besede: termoreverzibilni hidrogeli, poloksameri, podkožna aplikacija, iztisljivost skozi iglo.

Keywords: thermoreversible hydrogels, poloxamers, subcutaneous application, syringeability.

Seznam okrajšav

BASF – Badische Anilin- und Soda Fabric (kemijsko podjetje)

CMC – karboksimetilceluloza

DMSO – dimetilsulfoksid

EHEC – etil(hidroksietil)celuloza

G' – elastični modul

G'' – viskozni modul

HEC – hidroksietilceluloza

HPMC – hidroksipropilmetilceluloza

LCST – spodnja kritična temperatura raztopine

MC – metilceluloza

NaCMC – natrijeva karboksimetilceluloza

P188 – poloksamer 188

P407 – poloksamer 407

PAS – površinsko aktivna snov

PBS – izotonični fosfatni pufer (angl. phosphate buffered saline)

PEG – polietilenglikol

PEO – polietilenoksid

PPO – polipropilenoksid

Tgel – temperatura geliranja

UCST – zgornja kritična temperatura raztopine

1. Uvod

1.1. Hidrogeli

Hidrogel oziroma hidrofilni gel je tridimenzionalna mreža z visoko vsebnostjo vode, ki v presežku vode ne razpade niti se ne raztopi (1). Sestavljen je iz polimerov naravnega in/ali sinteznega izvora. Hidrogele glede na tip premreženja delimo na kemijske in fizikalne (2). Pri fizikalno premreženih hidrogelih se polimerne verige povežejo z ionskimi, vodikovimi ter hidrofobnimi vezmi, pri kemijskih hidrogelih pa s kovalentnimi vezmi. Fizikalni hidrogeli so v primerjavi s kemijskimi primernejši v vlogi makromolekularnih dostavnih sistemov, saj predstavljajo boljši nosilni sistem za proteine in celice (3). Hidrogele lahko delimo še na konvencionalne in novejšje stimulacijsko odzivne. Za slednje je značilno geliranje *in situ* in z njimi lahko dostavimo učinkovino z injiciranjem brez invazivnega kirurškega posega, zato so boljši od njihovih predhodnikov, ki jih je bilo potrebno pred implantacijo v organizem oblikovati v končno obliko (4). Stimulacijsko odzivni polimeri so topni v vodi in nabrekajo/se krčijo glede na dražljaje iz okolice, kot so temperatura, svetloba, pH ali ionska moč (2, 5).

Proces geliranja zmesi polimerov, pomožnih snovi in izbrane učinkovine za namen biomedicinske aplikacije mora potekati pod milimi pogoji, saj lahko v nasprotnem primeru pride do razpada vgrajene učinkovine (1).

1.1.1. Termoreverzibilni hidrogeli

Temperatura je najpogosteje uporabljeni sprožilec za dolgotrajnejše sproščanje učinkovine iz dostavnega sistema, pri tem procesu pa niso udeležene niti kemijske niti encimske reakcije (6).

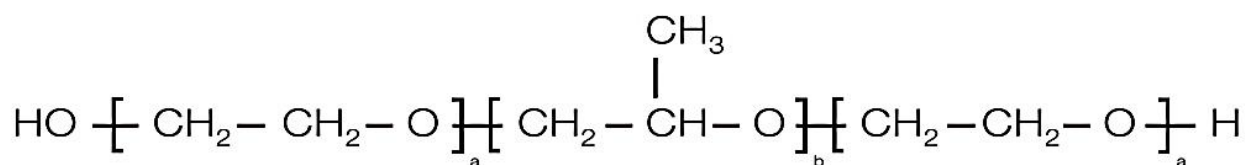
Termoreverzibilni oziroma termoodzivni hidrogeli se na spremembo temperature namesto s krčenjem/nabrekanjem odzovejo s prehodom iz sol stanja (tekočega agregatnega stanja) v gel stanje (poltrdno agregatno stanje). Do prehoda sol-gel lahko pride zaradi zvišanja ali znižanja temperature okolice. Glede na to jih delimo v hidrogele s spodnjo kritično temperaturo raztopine (LCST), pri katerih pride do prehoda sol-gel pri povišanju temperature, in hidrogele z zgornjo kritično temperaturo raztopine (UCST), pri katerih se

tvori gel pri ohlajanju raztopine. Za podkožno aplikacijo in geliranje *in situ* so uporabni hidrogeli z LCST (5).

Kot sestavino za pripravo temperaturno odzivnih hidrogelov za namen farmacevtske aplikacije najpogosteje proučujejo »pametne« polimere, ki temeljijo na N-izopropilakrilamidu, ki spada med poliakrilamide. Druge skupine temperaturno odzivnih polimerov so še poliestri, hitosan in njegovi derivati, polifosfazeni, nekateri poloksameri, poli(trimetilenkarbonat) ter polipeptidi (1). Termoreverzibilne hidrogele proučujejo za namen lokalne dostave protitumornih učinkovin, proteinov, antibiotikov in DNA, pa tudi za tkivni inženiring z možnostjo injiciranja, za zaščito ran in pri dolgotrajnejšem slikanju z magnetno resonanco. Za biomedicinske aplikacije so primerni zaradi biorazgradljivosti, netoksičnosti, nadzorovanega sproščanja učinkovine ter stabilnosti (3). Hidrogeli, ki nastanejo pod vplivom spremembe temperature, povzročajo v primerjavi s hidrogeli, ki so odvisni od drugih dražljajev, manj neželenih učinkov na tkiva, lažje pa jih tudi apliciramo (7).

1.1.2. Poloksameri

Poloksameri ali Pluronic® (tržno ime BASF Corporation ZDA) ali Lutrol (tržno ime BASF Corporation Evropa) so sintezni blok kopolimeri tipa A-B-A, sestavljeni iz etilenoksida ter propilenoksida. So amfifilni, saj daje del, ki vsebuje etilenoksid, poloksameru hidrofilne, del s propilenoksidom pa lipofilne lastnosti. Pogosto so označeni kot funkcionalne pomožne snovi, saj igrajo vlogo temeljnih komponent v formulacijah. Vse poznane poloksamere zajema spodnja kemijska struktura (slika 1), iz katere je razvidno, da se razlikujejo v molekularni masi ter številu blokov etilenoksida in propilenoksida (8, 9).



Slika 1: Splošna kemijska struktura poloksamerov: (a) predstavlja število enot polietilenoksida, (b) pa število enot polipropilenoksida (10)

Poloksameri so topni tako v vodi kot tudi v polarnih in nepolarnih organskih topilih. Poloksamerne gele uvrščamo med hidrogele, ki gelirajo *in situ* (4). Sposobnost geliranja

posameznega poloksamera je odvisna od njegove molekulske mase, tisti z višjo molekulsko maso imajo pri nižjih koncentracijah to sposobnost bolj izraženo. Vodne raztopine z dovolj visoko koncentracijo poloksamera so pri temperaturi 4–5 °C in nad 70 °C v tekočem agregatnem stanju, pri sobni temperaturi oziroma temperaturi med sobno in 70 °C pa v obliki gela.

Poloksameri v nizkih koncentracijah delujejo kot modulatorji viskoznosti tekočih formulacij (10). V farmacevtski industriji jih uporabljamo kot detergente, snovi za dispergiranje, emulgiranje, geliranje, izboljšanje topnosti in kot pospeševalce absorpcije. Med poloksameri najbolj pogosto uporabljamo poloksamera P188 z molekulsko maso med 7680 in 9510 Da ter P407 z molekulsko maso med 9840 in 14600 Da (9). P188 in P407 imata sposobnost termoreverzibilnosti, ki je ponavljajoče se segrevanje in ohlajanje raztopine ne izničita. Prav to je glavni razlog njune uporabe na nekaterih farmacevtskih področjih, kot so nadzorovano sproščanje učinkovine, aplicirane podkožno, bukalno, okularno ali rektalno, nadzor plodnosti in vpliv na bolečino (4, 10). Erlandsson je proučeval stabilnost poloksamerov P188 ter P407, in sicer na osnovi videza snovi, pH, vsebnosti kislin in aldehyda, molekulske mase in vsebnosti butilhidroksitoluena. Dokazal je, da je P407 bolj stabilen kot P188 (11).

Poloksamer 188

PEO80 – PPO27 – PEO80

Kot je razvidno tudi iz zgornje strukture, v P188 približno 80 % molekulske mase predstavlja polioksietilenski del. Poloksamer P188 oziroma Lutrol® F 68 uporabljamo kot vlažilec, emulgator, solubilizator ter koemulgator v kremah in emulzijah ter v tekočih farmacevtskih oblikah za parenteralno aplikacijo. Primeren je tako za pripravo trdnih disperzij kot tudi za izboljšanje topnosti, absorpcije in biološke uporabnosti slabo topnih učinkovin v trdnih peroralnih farmacevtskih oblikah. Za raztopine P188 so značilne newtonske lastnosti, ki se z naraščanjem koncentracije poloksamera spremenijo v nenevtonske lastnosti. Za sposobnost termoreverzibilnega geliranja je potrebna vsaj 20-odstotna koncentracija poloksamera (10).

Poloksamer 407

PEO101 – PPO56 – PEO101

Poloksamer P407 oziroma Lutrol® F127 z razmerjem med PEO in PPO 2 : 1, vsebuje približno 70 % polietilenoksida, kar prispeva k njegovi hidrofilnosti. Bolje je topen v hladni kot v vroči vodi, saj s povišanjem temperature cepimo vodikove vezi in s tem vplivamo na dinamično obnašanje molekul topila in polimera v raztopini (7). Je izrazito bolj viskozen kot P188, pogosto ga uporabljamo predvsem zaradi zelo izražene sposobnosti termoreverzibilnega geliranja v vodnih raztopinah že pri koncentracijah 16–30 % (m/m). Lahko ima vlogo zgoščevala, koemulgatorja, ojačevalca konsistence v kremah in tekočih emulzijah ter stabilizatorja v suspenzijah za dermalno uporabo, zobnih pastah in ustnih vodah. Primeren je tudi kot pomoč pri raztapljanju številnih slabo topnih učinkovin ter eteričnih olj v farmacevtskih pripravkih (10).

Gele, ki vsebujejo poloksamer P407, so proučevali za različne aplikacije, kot so okularna, nazalna, peridontalna, vaginalna, rektalna, transdermalna in subkutana. Uporabnost dostavnega sistema v obliki gela s poloksamerom P407 je omejena z relativno hitrim raztapljanjem gela v območju fizioloških pogojev. Poskušali so izboljšati mehansko trdnost, mukoadhezivnost ter čas zadrževanja gela s spremembo strukture poloksamera oziroma z dodatkom natrijevega alginata, karagenana ali hitosana. Slednji naj bi izboljšal tako mukoadhezivnost kot tudi mehansko trdnost poloksamernih gelov ter rahlo povišal temperaturo geliranja raztopine (12).

Pomankljivosti poloksamerov

- Slabe lastnosti poloksamerov so nizka mehanska trdnost ter to, da niso popolnoma biorazgradljivi, zaradi česar lahko uporabljamo le poloksamere z nižjo molekularno maso, ki se lahko izločijo preko ledvic (4, 13).
- Če vodno raztopino z visoko koncentracijo poloksamera v obliki sol stanja injiciramo v tkivo, se struktura hidrogela ne zadrži dovolj dolgo, da bi bila primerna za dostavo vgrajenih proteinov (3).
- Poloksamerni hidrogeli v splošnem veljajo za netoksične, a so opazili tudi sistemske neželene učinke, kot sta pojav hiperholesterolemije in hipertrigliceridemije (13).

Kljub pogosti uporabi poloksamerov na različnih področjih je v literaturi opisanih zelo malo analiznih tehnik, s katerimi bi lahko določili njihove značilnosti. Kvantitativno

določanje nizkih vrednosti poloksamera v farmacevtskih formulacijah so v svoji študiji izvedli Mao in sodelavci, ki so za ta namen želeli razviti natančno, občutljivo, ponovljivo in enostavno metodo. Uporabili so dve metodi, in sicer metodo kromatografije z ločevanjem po velikosti, ki so jo označili kot boljšo, ter kolorimetrično metodo. Pri izvedbi kromatografije z ločevanjem po velikosti pri vsebnosti poloksamera P188 ali P407 od 0,3 do 10 % so dobili rezultate, primerljive s teoretičnimi vrednostimi, medtem ko so bili rezultati kolorimetrične metode, ki temelji na tvorbi obarvanega kompleksa med poloksamerom in kobaltovim tiocianatom, ustrezni le pri višjih vsebnostih poloksamerov, nanje pa so vplivale tudi druge prisotne snovi (9).

1.1.3. Priprava termoreverzibilnih hidrogelov

Poznamo dve različni metodi priprave termoreverzibilnih hidrogelov, hladni ter topli postopek. Pri pripravi gelov z enako vsebnostjo P407 s hladnim oziroma toplim postopkom ni bilo opaznih razlik v viskoznosti.

Hladni postopek

Izbrani poloksamer popolnoma raztopimo v vodi pri temperaturi 5 °C. Aktivne snovi, ki so v vodi netopne, raztopimo v etanolu, izopropanolu ali propilenglikolu in raztopino naknadno dodamo vodni raztopini poloksamera, ohlajeni na 5 °C. Proces izberemo zlasti, če je ena od aktivnih snovi občutljiva na povišano temperaturo. Da bi preprečili ujetje zračnih mehurčkov v gel, moramo slednjega izpostaviti pogoju vakuumu, še preden začne gelirati. Gel se tvori, ko formulacijo izpostavimo ustrezni temperaturi.

Seo in sodelavci so termoreverzibilno formulacijo pripravili tako, da so ločeno raztopili poloksamera P407 in P188 v destilirani vodi, tako da sta koncentraciji znašali 32 % in 20 % (m/m), združili obe raztopini, tako da sta končni koncentraciji poloksamerov znašali 16 % in 20 %, ter dodali še pomožne snovi (14). Yong pa je s sodelavci termoreverzibilno formulacijo pripravil tako, da je najprej dispergiral oziroma raztopil natrijev klorid in natrijev diklofenak v destilirani vodi, raztopino ohladil na 4 °C in ob kontinuiranem mešanju postopoma dodajal poloksamera P407 ter P188. Vzorec so nato shranili pri temperaturi 4 °C, dokler ni nastala bistra raztopina (15).

Topel postopek

Poloksamer raztopimo v vodi, ki smo jo predhodno segreti na približno 70 °C. Aktivne snovi, ki niso topne v vodi, raztopimo v etanolu, izopropanolu ali propilenglikolu in raztopino dodamo topli vodni fazi. Gel nastane, ko se raztopina ohladi, temperatura geliranja pa je odvisna od formulacije (10).

1.1.4. Mehanizem tvorbe hidrogela

Na tvorbo poloksamernega hidrogela vpliva tako koncentracija uporabljenega poloksamera kot tudi sprememba temperature, ki ji je izpostavljena formulacija (3).

Vpliv koncentracije uporabljenega poloksamera.

Ko je v vodni raztopini poloksamera presežena kritična micelska koncentracija, začnejo polimerne molekule agregirati in tvoriti micelle. Pri nižjih koncentracijah so poloksameri v raztopini prisotni v obliki sferičnih micelov, pri višjih koncentracijah pa pride do združevanja micelov, ki najprej tvorijo različne faze tekočih kristalov, nato pa se pretvorijo v gel. Polipropilenoksid pri tem tvori centralno hidrofobno jedro, metilne skupine na polipropilenoksidu pa preko Van der Waalsovih sil pritegnejo nepolarne molekule. Polietilenoksid je odgovoren za vodotopnost poloksamera zaradi tvorbe vodikovih vezi med etrskim kisikom in molekulami vode (7, 14).

Vpliv povišanja temperature

Pod določeno temperaturo, imenovano kritična micelska temperatura (CMT), so tako PEO kot tudi PPO bloki hidratirani in PPO je relativno topen v vodi. Z naraščanjem temperature pa postanejo verige PPO čedalje slabše topne v vodi (8, 14). Spremenijo se intermolekularne interakcije med polimerom in vodo (prevladajo interakcije med molekulami vode, interakcije polimer-voda postanejo neugodne) (6). Nad kritično micelsko temperaturo ter pri ustrezni koncentraciji polimera (20–30 % (m/m)) tvorijo miceli fizikalno premrežen gel, vlogo fizikalnega premreževala igrajo interakcije med miceli (8, 14). Za dinamičen prehod iz sol stanja v gel stanje mora biti v polimerni strukturi vzpostavljeno ravnotežje med hidrofilnim in hidrofobnim delom. Pri povišanju temperature pride do povečanja hidrofobnega efekta in posledičnega združevanja polimerov. S tem

polimeri zmanjšajo hidrofobno površino, ki je v stiku z vodo in pri tem tvorijo hidrogelsko mrežo (6).

Če gel obdaja veliko odvečne vode, težko ohranja obliko celo pri temperaturah, višjih od temperature geliranja. Če raztopino redčimo in tako znižamo koncentracijo poloksamera pod kritično micelsko koncentracijo, pa pride do zelo hitrega razpada micelske strukture (14).

1.1.5. Temperatura geliranja termoreverzibilne formulacije

Temperatura geliranja je določena kot temperatura, pri kateri vzorec nakaže prehod iz predhodno viskoznega obnašanja, za katerega je značilno, da je G'' večja od G' , v elastično obnašanje, za katerega je značilno, da je G' večja od G'' oziroma kot temperatura, pri kateri se sekata krivulji G' in G'' . G' podaja informacijo o elastičnosti oziroma energiji, shranjeni v materialu med deformacijo, medtem ko G'' opisuje viskoznost oziroma energijo, ki se izgubi v obliki toplote (16).

Vrednost elastičnega modula, ki je sprva nizka, se zelo poveča z naraščanjem temperature, ko pa pride do tvorbe gela, postane neodvisna od temperature. Odziv hidrogelov na spremembo temperature lahko spremljamo z različnimi tehnikami, kot sta reologija in diferenčna dinamična kalorimetrija (7).

Pri poloksamernih termoreverzibilnih gelih s povečanjem molekulske mase hidrofobnega bloka poloksamerov ter zmanjšanjem molekulske mase hidrofilnega bloka nastopi prehod sol-gel pri nižji koncentraciji polimerov ter nižji temperaturi. Dodatek polimera, pri katerem je bolj izražena težnja po intrinzičnem združevanju, prav tako zniža koncentracijo polimera in temperaturo, ki sta potrebni za nastop prehoda sol-gel (1).

Mayol in sodelavci so temperaturno odvisnim hidrogelom iz kombinacije poloksamerov P188 in P407 ter hialuronske kisline, ki je biokompatibilen mukoadhezivni polimer, s pomočjo reologije proučevali viskoelastične lastnosti, temperaturo geliranja in bioadhezivne sile. Temperaturo geliranja so določili s pomočjo detektiranja spreminjanja elastičnega in viskoznega modula v temperaturnem območju od 10 do 40 °C, pri tem pa so uporabili frekvenco 0,01 Hz. Dokazali so, da dodatek hialuronske kisline k zmesi poloksamerov P188 in P407 ne ovira procesa geliranja, temveč le zniža temperaturo, pri

kateri proces poteče, in sicer 2 % dodane hialuronske kisline bolj kot 1 %. Intenzivnost tega vpliva se spreminja glede na masno razmerje uporabljenih poloksamerov. Hialuronska kislina že v manjših količinah izboljša mehanske lastnosti poloksamernege gela, s tem ko poveča mehansko moč gela, ta pa nelinearno narašča s količino dodane kisline (16).

Seo in sodelavci so temperaturo geliranja termoreverzibilnega hidrogela določali s pomočjo segrevanja vodne kopeli s hitrostjo 1°C/minuto. 10-mililitrsko vialo s 5 mL vzorca in magnetom so postavili v kopel in na magnetno mešalo. Temperaturo, pri kateri se je magnet ustavil, so definirali kot temperaturo geliranja (14).

Ur-Rehman in sodelavci so dokazali inverzno korelacijo med pH in temperaturo geliranja, saj so ugotovili, da prisotnost oetne kisline brez kakršnih koli drugih dodatkov povzroči povišanje temperature geliranja (12). Nizke vrednosti pH vplivajo na viskoznost in temperaturo, pri kateri nastopi prehod sol-gel (14).

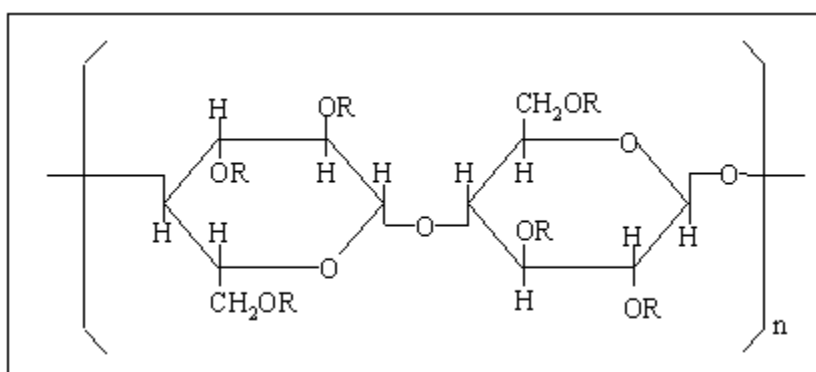
1.1.6. Pomožne snovi, ki vplivajo na temperaturo geliranja

Na sposobnost geliranja raztopine polimerov vpliva tudi dodatek različnih snovi, kot so poloksameri, etilceluloza in hidrosietilceluloza (16). Na prehod sol-gel pri temperaturno odzivnih poloksamerih imajo precejšen vpliv različne pomožne snovi, ki vplivajo tudi na temperaturo geliranja hidrogela. Pri dodajanju površinsko aktivnih snovi, MgCl₂ ali alkoholov (propilenglikol ima večji vpliv kot etanol) zmesi 16-odstotnega P407 in 10-odstotnega P188 temperatura geliranja narašča, DMSO pa jo zniža. Tudi na viskoznost lahko vpliva prisotnost elektrolitov, alkoholov ali površinsko aktivnih snovi. Dodatek približno 1 % elektrolita poveča viskoznost, na sol-gel prehod pa skorajda nima vpliva, medtem ko višje koncentracije v večji meri povečajo vrednosti viskoznosti, znižajo pa tudi temperaturo geliranja (14).

Derivati celuloze

Celuloza je najbolj razširjen polisaharid v naravi, saj tvori strukturne komponente rastlin. Je rigidna ravna veriga, sestavljena iz ponavljajočih se enot monomera glukoze (slika 2). Vsaka posamezna enota vsebuje tri proste funkcionalne hidrosilne skupine na drugem, tretjem in šestem ogljikovemu atomu, ki tvorijo dobro urejeno mrežo vodikovih vezi. Zaradi visoke kristaliničnosti je netopna v večini organskih topil, saj so polimeri z večjim

deležem kristaliničnega dela v primerjavi z amorfnimi polimeri bolj odporni tudi proti topilom. Slaba topnost zmanjšuje njeno uporabnost, izboljšamo pa jo lahko s kemijsko modifikacijo, torej z dodajanjem različnih kemijskih skupin na hidroksilne skupine glikozidnih enot (17, 18). Dodane kemijske skupine morajo biti bolj hidrofobne, ustrezni sta metilna ter hidroksipropilna skupina (2). Tako je prišlo do izdelave raznih celuloznih derivatov, kot so karboksimetilceluloza, celulozni acetat in metilceluloza. Njihova najpomembnejša lastnost v primerjavi z nemodificirano celulozo je povečana topnost v organskih topilih, izboljšana vodotopnost pa je prisotna predvsem pri metiliranih in karboksimetiliranih derivatih (17, 18).



Slika 2: Splošna kemijska struktura celuloze

Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC)

Hidroksipropilmetilceluloza je najpogosteje uporabljeni vodotopni polimer v hidrofilnih ogrodnih tabletah. Sproščanje učinkovine iz slednjih reguliramo z uporabo HPMC z različnimi molekulskimi masami ter stopnjami substitucije. Je kompatibilna s številnimi učinkovinami in kemično stabilna (19). Bolje se raztaplja v hladni kot v topli vodi. Vzrok za to je njena kemijska struktura, kjer gre za kombinacijo ene hidroksipropilne skupine z eno metilno skupino, ki sta pritrjeni na osnovno strukturo celuloze (20).

Vodna raztopina, v kateri je 1–10 % HPMC, prehaja v gel pri temperaturi med 75 in 90 °C. Temperaturo sol-gel prehoda lahko znižamo na približno 40 °C, če zmanjšamo število hidroksipropilnih substituentov (21).

Metilceluloza (MC)

Ena najpomembnejših lastnosti metilceluloze je sposobnost termoreverzibilnega geliranja v odvisnosti od stopnje substitucije. V primerjavi z drugimi celuloznimi etri, ki vsebujejo

metilne skupine, ima metilceluloza najnižjo temperaturo geliranja, slednja pada z naraščanjem koncentracije metilceluloze v uporabljeni raztopini. Prvo sistematično študijo inverzne sol-gel transformacije, ki je značilna za MC pri povišanju temperature, so izvedli že leta 1935. Motnost, do katere pride med faznim prehodom, so pojasnili kot posledico dehidracije metilceluloznih verig pri visoki temperaturi. Od takrat so termoreverzibilni fazni prehod metilceluloze v vodnih raztopinah temeljito raziskali s pomočjo različnih tehnik, kot so reologija, kalorimetrija in mikrodiferencialna dinamična kalorimetrija. Pozneje so Li in sodelavci termodinamični mehanizem med geliranjem opredelili kot proces, ki ga povzroča entropija, nadzira pa ga toplotno inducirano uničenje vodikovih vezi med vodnimi molekulami in verigami MC. Študije so dokazale, da z naraščanjem koncentracije MC pada temperatura geliranja, z dodatkom soli oziroma sladkorjev v vodne raztopine pa se ta učinek še bolj izrazi, medtem ko dodatek alkoholov deluje nasprotno (18). Ker je temperatura geliranja MC še vedno izrazito višja od fiziološke temperature, jo kombiniramo z drugimi polimeri. Večina raziskovalcev se strinja, da segrevanje povzroča dehidracijo hidratiranih metoksi skupin, posledica tega pa so hidrofobne interakcije med polimernimi verigami, ki vsebujejo metoksi skupine, kar vodi v nastanek gela (2).

Vodna raztopina s koncentracijo MC 1 do 10 % gelira pri temperaturi med 40 in 50 °C. Formulacija, ki vsebuje kombinacijo poloksamera, MC z nizko molekulsko maso ter docetaksela v vlogi učinkovine, gelira pri temperaturi med 15 in 40 °C, nastali gel pa sprošča docetaksel dlje kot 30 dni (21).

Hidroksietilceluloza

Hidroksietilceluloza ima v kemijski strukturi relativno enostavno dostopne hidroksilne skupine, ki se lahko vežejo s številnimi funkcionalnimi skupinami. Zaradi različne topnosti posameznih HEC, ki je posledica različnih stopenj etrenja, snovi delimo na vodotopne in druge, ki so topne v alkalnih topilih. Uporaba vodotopne HEC je zelo razširjena, saj ima lahko vlogo stabilizatorja hrane in kozmetičnih izdelkov, veziva v tabletah in zgoščevala v lateksnih barvah, medtem ko je uporaba HEC, topne v alkalnih topilih, zelo omejena (19).

Karboksimetilceluloza (CMC)

Karboksimetilceluloza je derivat celuloze, ki jo uporabljamo v prehrani, farmaciji, kozmetiki, tekstilni industriji in še mnogih drugih industrijah. Je topna v vodi in deluje kot regulator viskoznosti (22).

Med celuloznimi etri je samo CMC polielektrolit, občutljiva je tudi na spremembo pH in ionske moči ter zato sodi med »pametne« polimere. Ima zelo dobro sposobnost nabrekanja in na voljo je v obliki natrijeve soli. Nabrekanje hidrogelov je odvisno od elastičnosti verig polimerov, ki so vključeni v mrežo hidrogela. Kinetika nabrekanja je odvisna od sestave, stopnje premreženja, temperature, pH in ionske moči.

Gorgieva in Kokol sta pripravila hidrogel s kombinacijo NaCMC in HEC v razmerjih od 3 : 1 do 1 : 1, kot premreževalo pa sta dodala citronsko kislino. Naraščanje koncentracije NaCMC poveča zmogljivost nabrekanja hidrogela, ta je pri hidrogelu, ki vsebuje NaCMC in HEC v razmerju 3 : 1 kar za 10–20 % višja kot pri razmerju 1 : 1. Hidrogeli, ki so vsebovali večjo koncentracijo HEC, so bili manj stabilni, vzrok za to pa je nižja sposobnost premreženja zaradi višje stopnje substitucije kot posledice manj dostopnih hidroksilnih skupin pri HEC kot pri NaCMC. Povečana koncentracija NaCMC povzroči zvišanje temperature steklastega prehoda (23).

Natrijev klorid (NaCl)

Yong je s sodelavci izdelal temperaturno odzivno rektalno farmacevtsko obliko z natrijevim diklofenakom, ki je pri sobni temperaturi v tekoči obliki, pri telesni temperaturi pa se pretvori v gel. Proučevali so vpliv dodanega NaCl na fizikalno-kemijske lastnosti poloksamernih formulacij, kot so temperatura geliranja, mehanska moč gela in bioadhezivnost. Zaradi zelo dobre topnosti NaCl v vodi je bila olajšana priprava poloksamernih gelov, ki so vsebovali natrijev diklofenak, ne da bi slednjega oborili. Dodatek natrijevega diklofenaka poloksamerni formulaciji zviša temperaturo geliranja, medtem ko jo dodatek NaCl zniža, odvisno od koncentracije prisotnega NaCl in prisotnosti natrijevega diklofenaka, saj NaCl v prisotnosti slednjega bolj zniža temperaturo geliranja, kot če je učinkovina odsotna. Z dodajanjem od 0–1 % NaCl se je temperatura geliranja zniževala. Natrijev klorid poveča mehansko moč gela, učinek se povečuje z višanjem koncentracije dodanega NaCl od 0–1% (15).

Pri dodajanju NaCl do 1 % temperatura geliranja raztopine, ki vsebuje 16 % P407 in 10 % P188, pade s 44 na 42,5 °C, pri nadaljnjem višanju koncentracije pa ni več opaznih

sprememb. Možen vzrok za ta proces je učinek izsoljevanja, ki ga ima NaCl na segmente polietilenoksida, ki so del poloksamera (14).

Polietilenglikol (PEG)

Polietilenglikol je hidrofilna makromolekula oziroma neionski polimer, za katerega so značilne interakcije z vodo. Li in sodelavci so dokazali, da PEG stabilizira tudi encime, npr. β -ciklodekstrin-glikoziltransferazo. PEG so uporabili kot stacionarno fazo v reverznofazni tekočinski kromatografiji. Polimer, funkcionaliziran s PEG, zagotavlja stacionarno fazo za ločitev malih in velikih molekul (24).

Pri kombinaciji PEG in PLGA so ugotovili, da dodatek PEG, ki predstavlja hidrofilni del, zmanjša topnost PEG/PLGA v vodi ter zniža temperaturo prehoda sol-gel, medtem ko dodatek PEG vodni raztopini poloksamera poviša temperaturo sol-gel prehoda (1).

Druge pomožne snovi

Tudi vodne raztopine etil(hidroksietil)celuloze izkazujejo termoodzivno obnašanje, vendar niso uporabne za gele, ki nastajajo *in situ*, saj njihova viskoznost z naraščanjem temperature pada. Če pa jim dodamo ionsko površinsko aktivno snov, pride pri povišanju temperature s sobne na 30–40 °C do prehoda iz sol v gel stanje (13).

1.1.5. Rastapljanje hidrogelov

Cirillo in sodelavci so za preizkus sproščanja učinkovine iz termoreverzibilnega hidrogela kot medij uporabili pufer PBS s pH 7,0. Ugotovili so, da so tako strukturne značilnosti hidrogela kot tudi sproščanje nesteroidne protivnetne učinkovine odvisni od sestave in debeline hidrogelnega filma (6).

1.2. Parenteralna aplikacija

Pri parenteralni aplikaciji gre za vnos učinkovin v telo mimo prebavnega trakta. Vzrok za to vrsto aplikacije je lahko sam pacient, ki ne more, ne sme oziroma ne želi zaužiti zdravila, zdravilo z zelo obsežnim predsistemskim metabolizmom, zdravilo, ki se slabo absorbira iz prebavil ali pa obstaja potreba po hitrem sistemskem učinku oziroma po čim bolj individualnem in natančnem odmerjanju zdravila.

Prednosti te vrste aplikacije zdravil so hiter učinek, ki je tudi sorazmeren apliciranemu odmerku, omogočena je velika natančnost odmerjanja, izognemo pa se tudi gastrointestinalnim motnjam, ki bi jih povzročile določene učinkovine. Slabosti parenteralne aplikacije so, da injiciranje predstavlja invaziven poseg v organizem, kar ima lahko negativne posledice za bolnika (okužba, alergične reakcije na parenteralno aplicirane biomolekule), ta način aplikacije ni najbolj prijeten niti ni enostaven, saj je zanj potreben usposobljen zdravstveni delavec. Zdravila lahko apliciramo parenteralno na različne načine: intramuskularno, subkutano in intravensko.

1.2.1. Podkožna aplikacija učinkovine

Podkožno oziroma subkutano aplikacijo izberemo, če je potrebna počasna, enakomerna ter dolgotrajnejša absorpcija zdravilne učinkovine. Absorpcija je počasnejša kot pri intramuskularni injekciji zaradi slabše prekrvljenosti podkožja, kljub temu pa je učinek hitrejši kot pri peroralni aplikaciji, saj ga lahko pričakujemo že v 15 do 30 minutah. Z ustreznimi modifikacijami farmacevtske oblike lahko dosežemo tudi podaljšano delovanje zdravila. Največji volumen enkratnega odmerka je 1 do 2 mL, saj je zaradi večje oživčenosti podkožje v primerjavi z mišicami občutljivejše.

Subkutana aplikacija je primerna za pogosto uporabo, saj je relativno neboleča, uporabimo jo lahko pri zelo viskoznih necitotoksičnih in nedražečih zdravilih, ki se dobro absorbirajo iz maščobnega in vezivnega tkiva, uporabljene raztopine pa morajo biti izotonične in blago alkalne. Če so parenteralno aplicirane raztopine hipertonične, kisle ali močno bazične lahko pride do okvare ali celo nekroze tkiva (25).

Sposobnost iztisa skozi iglo

V člankih v angleškem jeziku sta prisotna izraza *syringeability* in *injectability*. Izraz *syringeability* opredeljuje sposobnost prehajanja proučevane formulacije iz okolice v brizgo skozi hipodermalno iglo, injektabilnost (*injectability*) pa iztis preiskovane formulacije iz brizge v okolico skozi iglo, pritrjeno na brizgo.

Ur-Rehman in sodelavci so pripravljene raztopine poloksamera P407 določali injektabilnost, in sicer so raztopine poskusili iztisniti preko injekcijske igle s premerom 0,4 mm (27 G) ter 0,6 mm (23 G). Formulacije so razdelili v štiri razrede: raztopine, ki prehajajo skozi iglo 27 G brez opaznega upora, raztopine, ki jih iztisnemo skozi iglo 27 G

z manjšim uporom, raztopine, ki jih je težko iztisniti skozi iglo 27 G in prehajajo v obliki kapljic, ter raztopine, ki jih ni mogoče iztisniti preko igle 27 G, zlahka pa prehajajo skozi iglo 23 G. Pred določanjem injektabilnosti formulacij so bile le-te shranjene v hladilniku pri temperaturi 4–8 °C (12).

1.3. Reologija

Reologija proučuje obnašanja tekočih, poltrdnih ali trdnih snovi pod vplivom strižne sile v območju, kjer veljata Newtonov in Hookov zakon.

Sisteme delimo glede na reološko obnašanje na newtonske ter nenenewtonske. Pri prvih je viskoznost pri določenem tlaku in temperaturi neodvisna od smeri, jakosti in časa delovanja striga. Realni sistemi izkazujejo newtonsko obnašanje le v določenem območju strižnih hitrosti oziroma temperature. Realni sistemi večinoma izkazujejo nenenewtonske lastnosti, kar pomeni, da njihova viskoznost pri določenem tlaku in temperaturi ni konstantna, spreminja se glede na jakost in smer delovanja strižne sile, lahko pa je odvisna tudi od časa delovanja striga. Poznamo časovno neodvisne nenenewtonske sisteme, pri katerih je viskoznost odvisna le od jakosti delovanja strižne sile ter časovno odvisne nenenewtonske sisteme, pri katerih se viskoznost pri konstantnih strižnih pogojih spreminja s časom in smerjo delovanja striga. Pri tiksotropnih sistemih se viskoznost zmanjšuje s časom delovanja striga pri danih strižnih pogojih, medtem ko je za sisteme, ki izkazujejo antitiksotropijo oziroma reopeksijo značilno, da njihova viskoznost s časom delovanja striga narašča.

1.3.1. Reometrija

Za proučevanje reoloških lastnosti tekočin uporabljamo viskozimetre in reometre. Z reometrom merimo reološke lastnosti tekočin, poltrdnih in trdnih snovi, z viskozimetrom pa viskoznost. Viskozimetre delimo na enostavne s senzorjem v obliki diska, valja ali turbine in rotacijske, pri katerih je nastavljiva strižna hitrost, pri novejših izvedbah pa tudi strižna napetost. Pri rotacijskih reometrih ter viskozimetrih je merilni sistem sestavljen iz rotorja in statorja. Rotacijski reometer, ki meri strižno napetost, ima nastavljivo strižno hitrost, pri tistem, ki meri strižno hitrost, pa lahko spreminjamo strižno napetost.

Rotacijski reometri in viskozimetri

Reometer z nastavljivo strižno hitrostjo je zgrajen iz statičnega in rotirajočega dela, znani sta dve izvedbi, in sicer sistem Searle, pri katerem notranji valj rotira, zunanji pa miruje, in sistem Coulette, pri katerem zunanji valj rotira, notranji pa miruje. Pri obeh je zunanji valj spodnja plošča, medtem ko je notranji valj stožec ali pa zgornja plošča. Reometer z nastavljivo strižno napetostjo je namenjen merjenju strižne deformacije oziroma strižne hitrosti. Prednosti uporabe reometra z nastavljivo strižno napetostjo v primerjavi z reometrom z nastavljivo strižno hitrostjo so možnost izvedbe meritev pri izrazito nizkih strižnih deformacijah pri stacionarnih oziroma oscilatornih tokovnih pogojih, možnost uporabe večjega števila različnih merilnih tehnik in da lahko izbrane vzorce testiramo v neprekinjenemu procesu v širokem območju strižnih napetosti.

Senzorski sistem pri rotacijskih reometrih

Senzorski sistem izberemo na podlagi vrste tekočine, pogojev pri merjenju, temperaturnega območja izvajanja meritev in dodatnih posebnih pogojev, kot so inertna atmosfera ali povišan tlak. Za merjenje pri pogojih enostavnega strižnega toka so na voljo trije različni senzorski sistemi: sistem koaksialnih valjev, sistem dveh vzporednih plošč in sistem stožca in plošče. Za sistem stožca in plošče je značilno, da se vzorec nahaja v reži med stožcem in ploščo. Prednosti tega sistema so enostavno odmerjanje vzorca, enostavno čiščenje merilnega sistema in majhne količine vzorca, potrebne za izvedbo meritev. Pri uporabi tega sistema lahko pride do določenih eksperimentalnih problemov, kot so temperaturne spremembe vzorca zaradi viskoznega gretja bolj viskozne tekočine pri visokih strižnih hitrostih, spremenjena vrednost navora zaradi deformacije proste površine tekočine, ki je posledica robnega efekta na fazni meji tekočina-zrak, ter prehod iz laminarnega v turbulenten tok zaradi delovanja centrifugalnih sil (26).

2. Namen dela

Namen magistrske naloge je izdelava termoreverzibilnega hidrogela, katerega temperatura geliranja je kar najbližje temperaturi podkožja, saj mora biti formulacija na sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju, da je izvedljivo podkožno injiciranje, na mestu aplikacije pa se mora v najkrajšem možnem času pretvoriti v gel, da se v podkožju zadrži dlje časa in počasi sprošča zdravilno učinkovino.

Za izdelavo hidrogela bomo izbrali hladni postopek. Pripravili bomo različne kombinacije poloksamerov P188 in P407 ter jim določili temperaturo geliranja. Slednjo bomo poskušali kar najbolj približati temperaturi podkožja s spreminjanjem sestave in z dodajanjem različnih pomožnih snovi, kot so hidroksipropilmetilceluloza, metilceluloza, karboksimetilceluloza, natrijev klorid ter polietilenglikol. Vsem pripravljenim formulacijam bomo določili temperaturo geliranja s tremi različnimi metodami, in sicer s pomočjo magnetnega mešala ter z rotacijsko in oscilacijsko reometrijo. Pri rotacijski reometriji bomo opazovali spreminjanje viskoznosti hidrogela s temperaturo v območju 20–45 °C, temperaturo geliranja pa določili znotraj intervala, kjer se hitrost naraščanja viskoznosti izrazito zmanjša. Temperaturo geliranja vzorcev bomo določili tudi z oscilacijsko reometrijo v območju 10–45 °C, predstavljala pa bo zadnje presečišče krivulj strižne napetosti in strižne deformacije.

Formulacijam z ustrežno temperaturo geliranja (med 34 in 36,5 °C) bomo določili čas raztapljanja in pri tistih, katerih čas raztapljanja bo dovolj dolg (vsaj sedem dni), preverili še možnost injiciranja preko igle. Hidrogele, ki bodo ustrezali vsem postavljenim kriterijem, bomo označili kot uporabne.

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

Materiali za izdelavo termoreverzibilnih hidrogelov

Lutrol® F127, INCI: (Poloksamer 407) (a=101, b=56, Ludwigshafen, Nemčija

Lutrol® F 68, INCI: (Poloksamer 188) (a=80, b=27), Ludwigshafen, Nemčija

CMC Na: Fluka, Švica

HEC: Merck, Nemčija

Methocel K4M Premium (HPMC): Colorcon, Velika Britanija

MC: Sigma chemical, Nemčija

NaCl: Merck, Darmstadt, Nemčija

PEG (4000): Merck, Nemčija

Reagenti za pripravo PBS pufra

dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4): Merck, Darmstadt, Nemčija

kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4): Merck, Darmstadt, Nemčija

kalijev klorid (KCl): Merck, Darmstadt, Nemčija

klorovodikova kislina (HCl): Merck, Darmstadt, Nemčija

natrijev klorid (NaCl): Merck, Darmstadt, Nemčija

Uporabljena topila

Destilirana voda: v destilirani vodi smo raztapljali poloksamere in pomožne snovi

Šestkrat destilirana voda: za pripravo pufra PBS

3.2. Naprave

- Analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- Digitalna tehtnica, EB-1200 C, Železniki, Slovenija
- Inkubator gkembH, Waldems, Nemčija
- Reometer, Physica MCR 301, Anton Paar, GmbH, Gradec, Avstrija
- Magnetno mešalo in grelnik, IKA RCT basic, Nemčija
- Brizga BD discardit II LS 2mL/0,1mL, Medias international d.o.o., Ljubljana, Slovenija
- Injekcijska igla Luer-lock tip 21G (0,8x38mm), TIK d.o.o., Kobarid, Slovenija
- Injekcijska igla Luer-lock tip 25G (0,5x16mm), TIK d.o.o., Kobarid, Slovenija

3.3. Metode

3.3.1. Postopek priprave termoreverzibilnih hidrogelov

Za pripravo termoreverzibilnih hidrogelov smo uporabili hladni postopek.

V 50-mililitrsko erlenmajerico smo natehtali 20,0 g destilirane vode in jo postavili na ledeno kopel. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo postopoma dodajali zmes poloksamerov P188 in P407 ter izbrane pomožne snovi. Kot pomožne snovi smo uporabili hidroksipropilmetilcelulozo, metilcelulozo, hidroksietilcelulozo, karboksimetilcelulozo, natrijev klorid in polietilenglikol.

Če smo dodali preveliko količino zmesi naenkrat, je prišlo do nastanka večje tvorbe zlepljene zmesi, za raztopitev katere je bilo potrebnega precej časa. Po končanem dodajanju zmesi v vodno raztopino smo mešali še približno pol ure oziroma dokler nismo dobili homogenega vzorca. Pripravljene vzorce smo pred nadaljnjim testiranjem shranjevali v hladilniku vsaj 24 ur. Primer deležev posameznih sestavin v formulaciji prikazuje preglednica I, v preglednicah II do VIII pa je predstavljena sestava posameznih vzorcev, ki smo jim določili temperaturo geliranja.

Preglednica I: Primer deležev posameznih sestavin v formulaciji, ki vsebuje 15 % P407 in 10 % P188

| Sestavina | Delež sestavine (% m/m) | Masa sestavine |
|------------------------|-------------------------|----------------|
| P407 | 15 % | 4,03 g |
| P188 | 10 % | 2,67 g |
| Prečiščena voda | 75 % | 20 g |

Preglednica II: Deleži posameznih poloksamerov v termoreverzibilnih formulacijah

| Gel | P188 (%) | P407 (%) |
|----------------------------|----------|----------|
| 18 % P407 | / | 18 |
| 21 % P407 | / | 21 |
| 15 % P407/10 % P188 | 10 | 15 |
| 18 % P407/5 % P188 | 5 | 18 |
| 20 % P407/5 % P188 | 5 | 20 |
| 18 % P407/10 % P188 | 10 | 18 |
| 20 % P407/7 % P188 | 7 | 20 |
| 19 % P407/7 % P188 | 7 | 19 |

Preglednica III: Deleži posameznih poloksamerov in HPMC v termoreverzibilnih formulacijah

| Gel | P188 (%) | P407 (%) | HPMC (%) |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|
| 18 % P407/5 % P188/0,25 % HPMC | 5 | 18 | 0,25 |
| 18 % P407/5 % P188/0,5 % HPMC | 5 | 18 | 0,5 |
| 18 % P407/10 % P188/1 % HPMC | 10 | 18 | 1 |
| 18 % P407/5 % P188/1 % HPMC | 5 | 18 | 1 |
| 18 % P407/10 % P188/1,5 % HPMC | 10 | 18 | 1,5 |
| 18 % P407/5 % P188/1,5 % HPMC | 5 | 18 | 1,5 |
| 20 % P407/7 % P188/1,5 % HPMC | 7 | 20 | 1,5 |
| 18 % P407/5 % P188/1,25 % HPMC | 5 | 18 | 1,25 |
| 20 % P407/7 % P188/0,25 % HPMC | 7 | 20 | 0,25 |
| 20 % P407/7 % P188/0,5 % HPMC | 7 | 20 | 0,5 |

Preglednica IV: Deleži posameznih poloksamerov in MC v termoreverzibilnih formulacijah

| Gel | P188 (%) | P407 (%) | MC (%) |
|--------------------------------------|----------|----------|--------|
| 20 % P407/ 7 % P188/ 1,5 % MC | 7 | 20 | 1,5 |
| 20 % P407/ 7 % P188/ 1 % MC | 7 | 20 | 1 |
| 18 % P407/ 5 % P188/ 1,5 % MC | 5 | 18 | 1,5 |
| 19 % P407/ 7 % P188/ 1 % MC | 7 | 19 | 1 |
| 19 % P407/ 7 % P188/ 1,5 % MC | 7 | 19 | 1,5 |

Preglednica V: Deleži posameznih poloksamerov in HEC v termoreverzibilnih formulacijah

| Gel | P188 (%) | P407 (%) | HEC (%) |
|-------------------------------------|----------|----------|---------|
| 20 % P407/7 % P188/1,5 % HEC | 7 | 20 | 1,5 |
| 20 % P407/7 % P188/1 % HEC | 7 | 20 | 1 |

Preglednica VI: Deleži posameznih poloksamerov in CMC v termoreverzibilnih formulacijah

| Gel | P188 (%) | P407 (%) | CMC (%) |
|--------------------------------------|----------|----------|---------|
| 20 % P407/7 % P188/1 % CMC | 7 | 20 | 1 |
| 20 % P407/7 % P188/1,5 % CMC | 7 | 20 | 1,5 |
| 20 % P407/7 % P188/0,5 % CMC | 7 | 20 | 0,5 |
| 20 % P407/7 % P188/0,25 % CMC | 7 | 20 | 0,25 |

Preglednica VII: Deleži posameznih poloksamerov in NaCl v termoreverzibilnih formulacijah

| Gel | P188 (%) | P407 (%) | NaCl (%) |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|
| 18 % P407/5 % P188/1 % NaCl | 5 | 18 | 1 |
| 18 % P407/5 % P188/1,5 % NaCl | 5 | 18 | 1,5 |
| 18 % P407/5 % P188/2 % NaCl | 5 | 18 | 2 |

Preglednica VIII: Deleži posameznih poloksamerov in PEG v termoreverzibilnih formulacijah

| Gel | P188 (%) | P407 (%) | PEG (%) |
|-------------------------------------|----------|----------|---------|
| 20 % P407/5 % P188/1 % PEG | 5 | 20 | 1 |
| 20 % P407/5 % P188/1,5 % PEG | 5 | 20 | 1,5 |
| 20 % P407/5 % P188/2 % PEG | 5 | 20 | 2 |

3.3.2. Določanje temperature geliranja termoreverzibilnih hidrogelov

Določanje temperature geliranja z magnetnim mešalom

25-mililitrsko čašo, v katero smo natehtali 8 g vzorca v tekočem agregatnem stanju, smo postavili v petrijevko s hladno vodo in na magnetno mešalo. Vzorce smo predhodno hranili v hladilniku pri temperaturi 4–5 °C, da smo preprečili geliranje. Čašo, v katero smo namestili magnet, smo vpeli tako, da je bil celoten vzorec obdan z vodo v petrijevki, ni pa se dotikal njenega dna. Hitrost mešanja je bila 450–500 vrtljajev/minuto. Z vpetim termometrom smo merili temperaturo kopeli, medtem ko smo vzorec segrevali s hitrostjo 0,1 °C/s. Temperaturo geliranja smo določili vizualno, ko se je magnet ustavil. Rezultat smo podali kot povprečno vrednost treh zaporednih meritev istega vzorca.



Slika 3: Priprava za določanje temperature geliranja formulacij z magnetnim mešalom

Določanje temperature geliranja termoreverzibilne formulacije z metodo z magnetnim mešalom ni bilo vedno izvedljivo, težavno je bilo predvsem pri gelih, v katerih so določene dodane snovi povečale penjenje, zato smo temperaturo geliranja nekaterih formulacij določili le s pomočjo oscilacijske in rotacijske reologije.

Določanje temperature geliranja z oscilacijsko in rotacijsko reometrijo

Za določanje temperature geliranja vzorcev z oscilacijsko in rotacijsko reometrijo smo uporabljali reometer Physica MCR 301. Uporabljali smo senzorski sistem stožec-plošča CP 50-2, merili pa smo pri konstantni frekvenci 0,01 Hz in strižni deformaciji 0,02 %.

Nanos vzorca

Vzorci smo najprej s pomočjo vodne kopeli izpostavili temperaturi, ki je bila višja od temperature geliranja. Gelirane vzorce smo s spatulo nanesli na spodnjo ploščo reometra ter nastavili stožec v pozicijo za merjenje, ko širina reže znaša 209 mikrometrov. Odvečen vzorec je stožec izpodrinil, zato smo ga pred izvajanjem meritev odstranili. Pred začetkom merjenja smo počakali, da je vzorec dosegel ustrezno temperaturo, pri rotacijski reometriji 20 °C, pri oscilacijski pa 10 °C.



Slika 4: Reometer Physica MCR 301

Rotacijska reometrija

Na reometru smo izvajali meritev viskoznosti v odvisnosti od temperature. Vzorce smo nanegli po zgoraj opisanem postopku. Začetna temperatura je znašala 20 °C, postopoma smo jo višali do 40 °C oziroma 45 °C pri tistih gelih, katerih točka geliranja je bila glede na rezultate predhodno opravljenega testa s pomočjo magnetnega mešala višja od 38 °C. Temperaturo smo višali s hitrostjo 1 °C/min, oziroma 0,017 °C/s. Poskus smo izvajali pri strižni hitrosti 10/s, izvedli pa smo 60 zaporednih meritev. Rezultate smo predstavili v obliki grafa, ki je predstavljal odvisnost viskoznosti od temperature in temperaturni interval, znotraj katerega je termoreverzibilna formulacija gelirala, določili kot interval, v katerem se izrazito zmanjša hitrost naraščanja viskoznosti vzorca. Za vsak vzorec smo izvedli dve ponovitvi in rezultate predstavili kot povprečno vrednost.

Oscilacijska reometrija

Vzorec smo nanegli po zgoraj opisanem postopku. Merili smo vrednosti elastičnega ter viskoznega modula pri konstantni frekvenci in strižni deformaciji ter naraščanju temperature, ki ji je bil izpostavljen vzorec. Meritve so potekale v temperaturnem intervalu 10–40 °C oziroma 10–45 °C pri gelih, katerih točka geliranja, pridobljena s postopkom z

magnetnim mešalom, je bila višja od 38 °C. Hitrost segrevanja je bila 0,015 °C/s. Temperaturo geliranja smo, tako kot Mayol s sodelavci (16), odčitali iz zadnjega presečišča krivulj strižne napetosti ter strižne deformacije.

3.3.3. Postopek raztapljanja termoreverzibilnih hidrogelov

V plastične epruvete z zamaškom smo nalili 1 mL termoreverzibilnega hidrogela ter jih vstavili v inkubator, nastavljen na temperaturo 37 °C. Ko so vzorci gelirali, smo dodali 2 mL pufru PBS s pH 7,4. Epruvete smo namestili v ustrezne odprtine v inkubatorju in vsakih 24 ur preverili delež raztopljenega gela. Vsakič smo odlili tekoči del ter stehali preostali še neraztopljeni gel. 1 mL odstranjene zmesi pufru in raztopljenega gela smo vrnili v epruveto ter dodali še 1 mL svežega pufru, ki smo ga predhodno segreli na 37 °C, da ne bi prišlo do raztapljanja hidrogela zaradi nenadnega znižanja temperature in posledično napačnih rezultatov. Epruveto smo po končanem tehtanju vrnili v inkubator.

Preskus raztapljanja smo opravljali na šestih vzorcih, ki so imeli ustrezno temperaturo geliranja in ustrezno viskoznost pri sobni temperaturi. Izvajali smo ga deset dni. Kot medij za raztapljanje hidrogelov smo, tako kot Cirillo s sodelavci (6), uporabili pufer PBS.

Priprava pufru PBS s pH 7,4

Natehtali smo 8 g NaCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl in 0,24 g KH₂PO₄ in jih s pomočjo kratkotrajnega mešanja na magnetnem mešalu raztopili v bidestilirani vodi. Z dodatkom HCl smo umerili pH na 7,4, torej kar najbližje vrednosti, ki bi ji bil gel izpostavljen v organizmu (27).

3.3.4. Določanje sposobnosti injiciranja termoreverzibilnih formulacij

Za ugotavljanje sposobnosti injiciranja smo uporabili formulacije, pri katerih je raztapljanje potekalo najmanj 7 dni. To so naslednje formulacije:

- 20 % P407/7 % P188/1 % MC,
- 18 % P407/5 % P188/1,5 % MC,
- 18 % P407/5 % P188/1,25 % HPMC

– in 20 % P407/7 % P188/0,5 % HPMC.

Vzorci, ki smo jih predhodno hranili v hladilniku, smo napolnili v 2-mililitrsko brizgo. Na slednjo smo najprej nataknilo iglo 21 G ($0,8 \times 38\text{mm}$), če je bil iztis vzorca mogoč, pa smo poskus ponovili še z iglo 25 G ($0,5 \times 16\text{mm}$) ter tako ugotovili, če obstaja možnost injiciranja termoreverzibilne formulacije v podkožje.

4. Rezultati in razprava

Želeli smo pripraviti formulacije, ki bi bile pri sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju in iztisljive skozi iglo ustreznega premera. Pri temperaturi podkožja bi gelirale, se zadržale na mestu aplikacije in počasi ter kontrolirano sproščale vgrajeno učinkovino (13).

4.1. Določanje temperature geliranja in reoloških lastnosti vzorcev

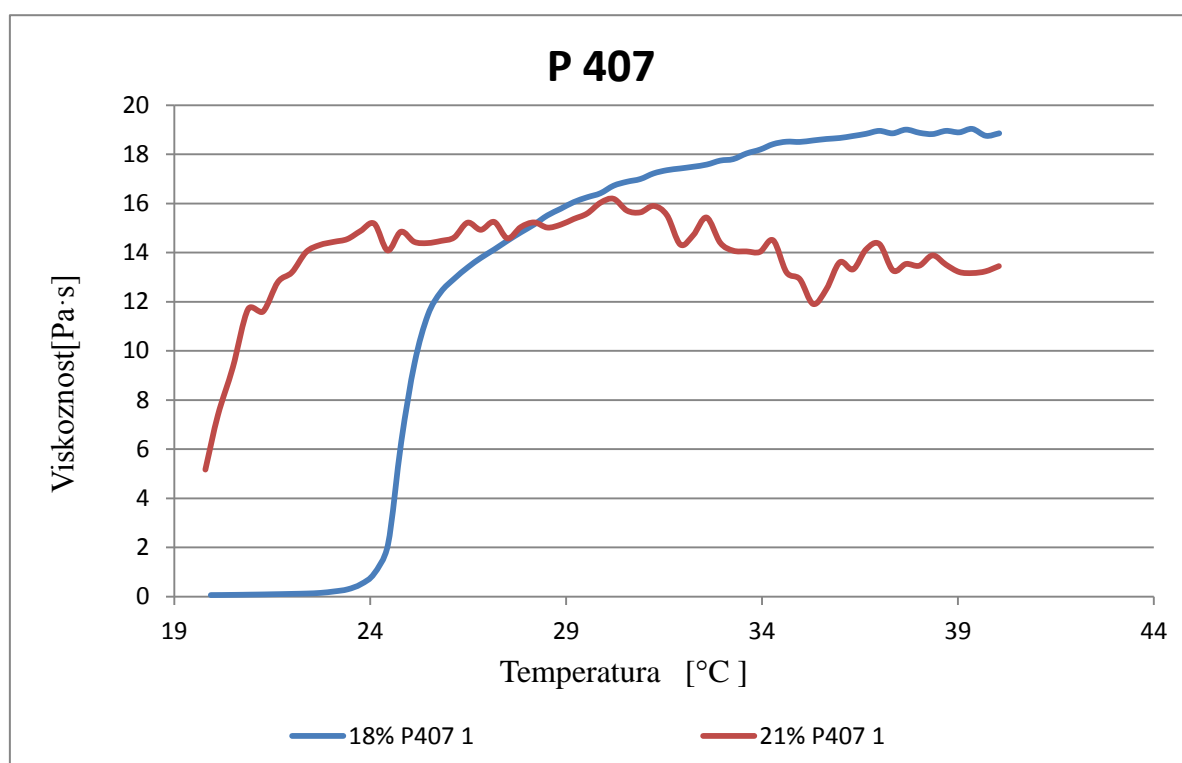
4.1.1. Formulacije s P407

Na podlagi rezultatov vseh treh metod določitve temperature geliranja formulacij smo ugotovili, da je temperatura geliranja tako formulacije z 18 % kot tudi z 21 % P407, določena z magnetnim mešalom, zajeta znotraj temperaturnega intervala, ki smo ga dobili s pomočjo rotacijske reometrije, kar je razvidno iz preglednice IX. Dokazali smo, da sta metodi določitve temperature geliranja hidrogela s pomočjo magnetnega mešala in z rotacijsko reometrijo primerljivi. Pri nekaterih vzorcih zaradi penjenja metode z magnetnim mešalom nismo mogli izvesti. Nastale pene močno motijo določitev temperature, slednja je precej višja od prave vrednosti, saj se magnet preneha vrteti pozneje zaradi kombinacije tekočine in ujetega zraka. Pri takšnih vzorcih smo temperaturo geliranja določili le z metodama rotacijske in oscilacijske reometrije. Pri oscilacijski reometriji niso bili vsi pridobljeni rezultati ustrezni, pri nekaterih vzorcih pa sploh ni prišlo do preseka krivulj G' in G'' , ki so ga Mayol in sodelavci definirali kot točko, iz katere lahko določimo temperaturo geliranja (16).

Temperatura geliranja je temperatura, pri kateri pride do prehoda tekoče faze v gel (15). Primerna temperatura geliranja za subkutano aplikacijo hidrogelov je med 30 in 36 °C. Nekateri pripravljene hidrogeli so se izkazali za preveč viskozne, zato smo jih izločili iz nadaljnjega testiranja, saj injiciranje ne bi bilo izvedljivo, posledično pa ne bi bili primerni za podkožno aplikacijo.

Primerjava termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujeta 18 % in 21 % P407, kaže, da je začetna viskoznost vzorca, ki vsebuje 21 % P407, višja (slika 5). Vzorec tudi gelira pri temperaturi, nižji za približno 4 °C, iz česar lahko sklepamo, da poloksamer P407 zviša viskoznost ter zniža temperaturo geliranja. Dobljene vrednosti temperature geliranja so se

ujemale z ugotovitvijo Yonga in sodelavcev, da je temperatura geliranja formulacije, ki vsebuje 18–25 % P407 znotraj temperaturnega intervala 13–25 °C (15).



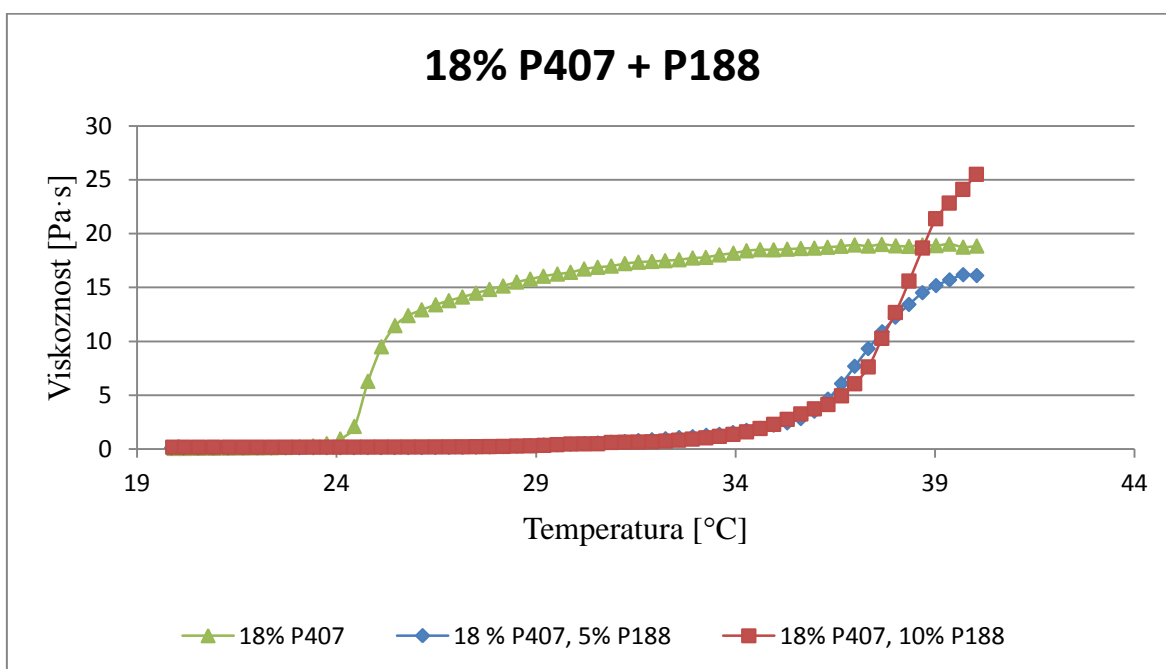
Slika 5: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 18 % oziroma 21 % P407, v odvisnosti od temperature

4.1.2. Formulacije s P407 in P188

S kombiniranjem poloksamerov P188 in P407 smo želeli temperaturo geliranja formulacij kar najbolj približati temperaturi podkožja. Povečanje koncentracije poloksamera P188 do 10 % zviša temperaturo geliranja, kar je razvidno iz temperatur geliranja obeh vzorcev, ki poleg 18 % P407 vsebujeta še 5 % oziroma 10 % P188. Le-ti sta v primerjavi z vzorcem, ki ne vsebuje poloksamera P188, kar za 15,4 °C oziroma 16,7 °C višji. Temperatura geliranja ne narašča linearno z naraščanjem koncentracije dodanega P188, saj jo prvih 5 % dodanega P188 veliko bolj poviša kot naslednjih 5 % (preglednica IX). Potrdili smo rezultate Yonga s sodelavci, ki so dokazali, da dodatek poloksamera P188 zviša temperaturo geliranja (15).

Preglednica IX: Določitev temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala (Tgel1), rotacijske (Tgel2) in oscilacijske (Tgel3) reologije formulacijam, v katerih je prisotna kombinacija poloksamerov P407 in P188 brez pomožnih snovi

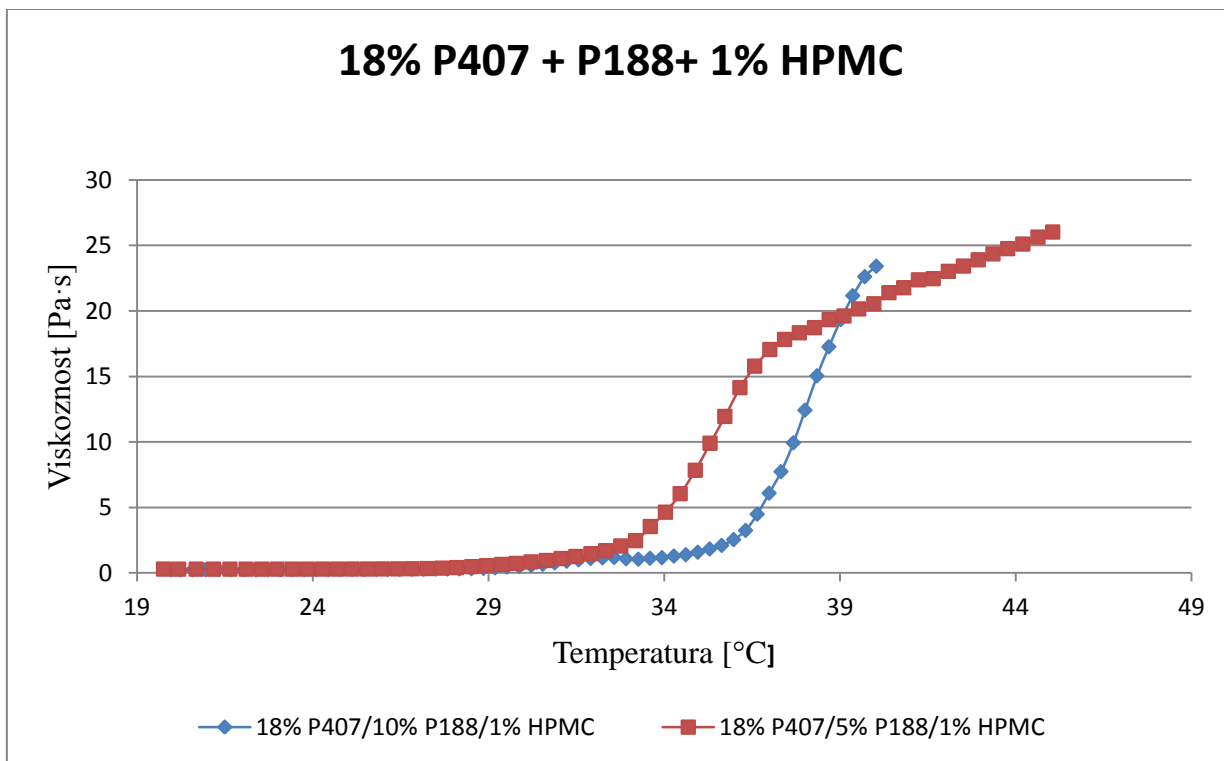
| Gel | Tgel1 (°C) | Tgel2 (°C) | Tgel3 (°C) |
|----------------------------|------------|------------|------------|
| 18 % P407 | 25,0 | 25–27 | / |
| 21 % P407 | 20,8 | 21–23 | 20,9 |
| 15 % P407/10 % P188 | / | / | / |
| 18 % P407/5 % P188 | 40,4 | 39–41 | / |
| 20 % P407/5 % P188 | 34,7 | 33–35 | 33,6 |
| 18 % P407/10 % P188 | 41,6 | 40,5–42,5 | / |
| 20 % P407/7 % P188 | 37,7 | 36,5–38 | 38,1 |
| 19 % P407/7 % P188 | 41,0 | 40–42 | 41 |



Slika 6: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 18 % P407 in različne količine poloksamera P188, v odvisnosti od temperature

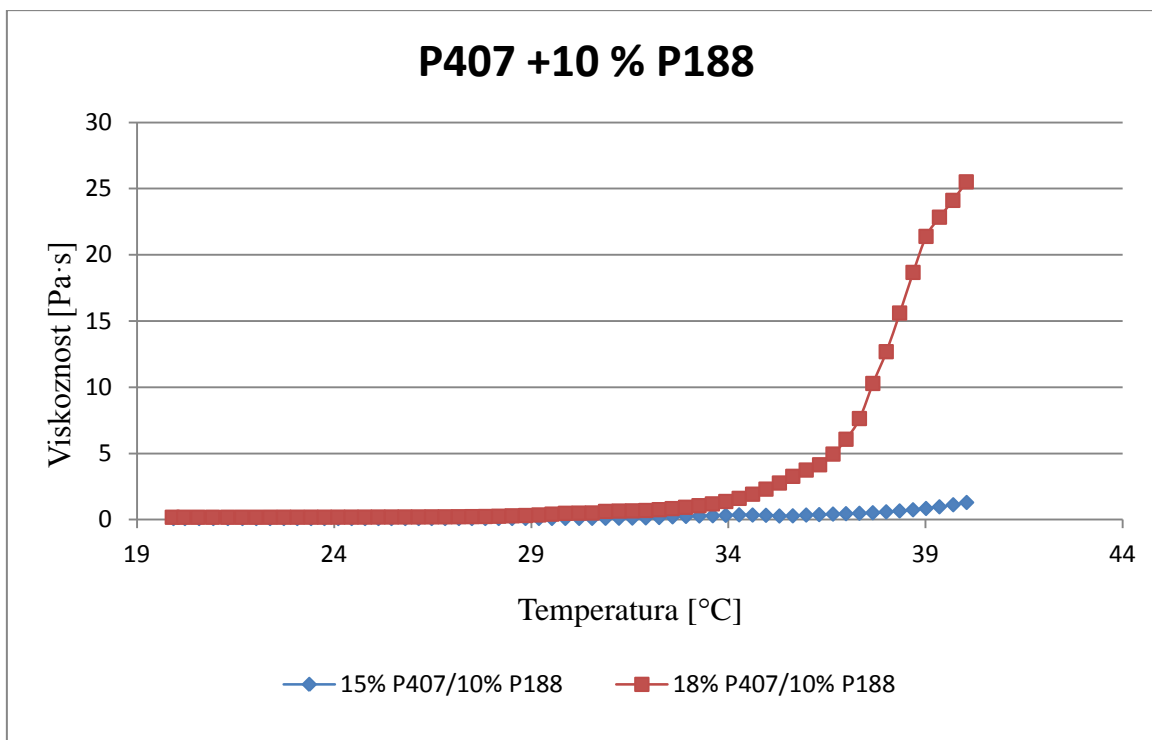
Pri temperaturi 37 °C dodatek P188 izrazito zmanjša viskoznost formulacije, 10 % P188 le malo bolj kot 5 % P188 (slika 6). Ker smo pričakovali bolj izrazito padanje viskoznosti z naraščanjem deleža P188, smo pridobljeni rezultat preverili še z dodatkom 1 % HPMC zgornjima vzorcema. Rezultati so potrdili domnevo, da je viskoznost pri 37 °C ob dodatku 10 % P188 nižja kot ob dodatku 5 % P188. Pri formulaciji, ki poleg P407 in P188 vsebuje

še 1 % HPMC, je v primerjavi s formulacijo brez HPMC opazen večji padec viskoznosti pri 37 °C pri povečanju koncentracije P188. Temperatura geliranja je nižja pri 5 % P188 (slika 7).



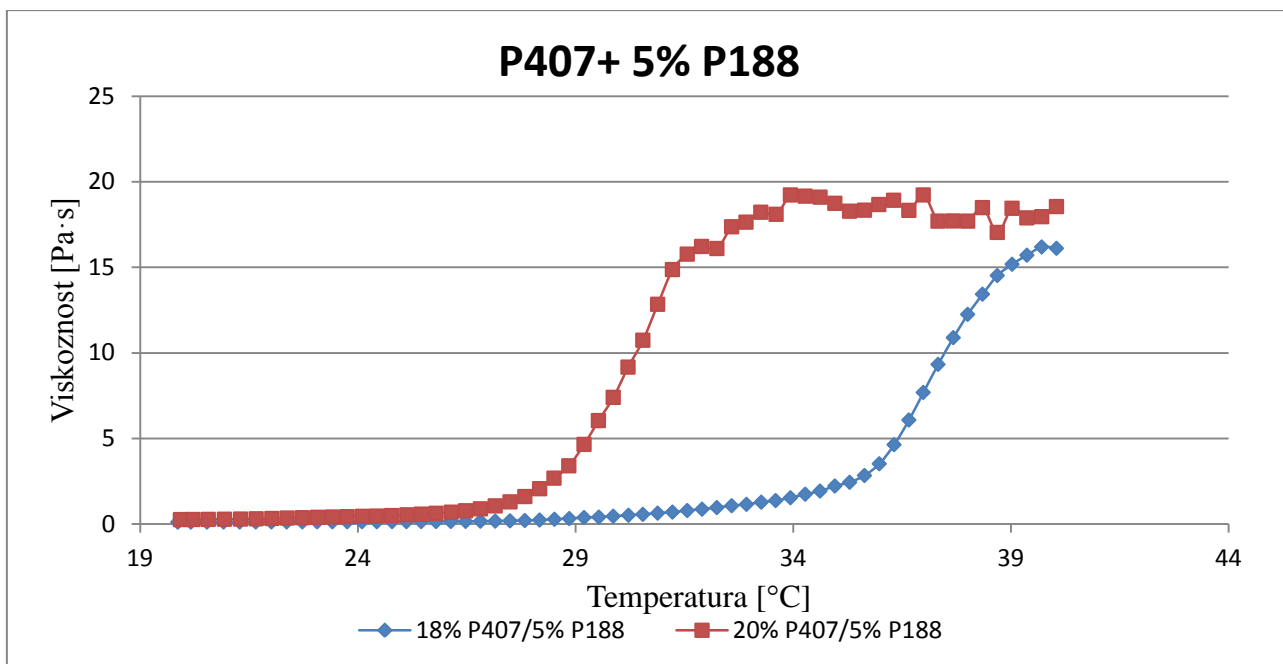
Slika 7: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 18 % poloksamera P407, različne količine P188 ter 1 % HPMC, v odvisnosti od temperature

Pri vzorcih, ki so vsebovali kombinacijo poloksamerov P407 in P188, je bila najbolj optimalna temperatura geliranja ($T = 33\text{--}35\text{ }^{\circ}\text{C}$) tistega, ki je vseboval 5 % P188 in 20 % P407. Formulacijo, ki je vsebovala 7 % P188 ter 20 % P407 in gelirala pri temperaturi 37,7 °C, bi lahko uporabili na področju vnetja, saj slednje poviša temperaturo okolice.



Slika 8: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo različne količine P407 in 10 % P188, v odvisnosti od temperature

S slike 8 je razvidno, da povečanje koncentracije P407 s 15 % na 18 % pri konstantni koncentraciji 10 % P188 poleg znižanja temperature geliranja poveča tudi viskoznost vzorcev pri 37 °C, saj je slednja pri formulaciji s 15 % P407 in 10 % P188 precej nižja kot pri formulaciji z 18 % P407 in 10 % P188. Vzorec, ki vsebuje 15 % P407, ne izkazuje sposobnosti geliranja v območju do 40 °C, kar je najbrž posledica previsoke koncentracije P188 oziroma prenizke koncentracije P407, medtem ko pri uporabi 18 % P407 že nastopi prehod sol-gel, glede na sliko 8 pri 40–42 °C. V članku Mayol s sodelavci so v nasprotju z našim rezultatom opisali, da gelira tudi formulacija s sestavo 15 % P407 in 10 % P188, in sicer pri temperaturi 37 °C (16). Vpliv poloksamera P407 na viskoznost smo preverili še pri gelih 18 % P407/5 % P188 ter 20 % P407/5 % P188 (slika 9). Prehod sol-gel nastopi pri obeh vzorcih, pri tistem z 20 % P407 nastopi pri nižji temperaturi. Ta gel pa ima pri 37 °C tudi večjo viskoznost.



Slika 9: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo različne količine P407 ter 5 % P188, v odvisnosti od temperature

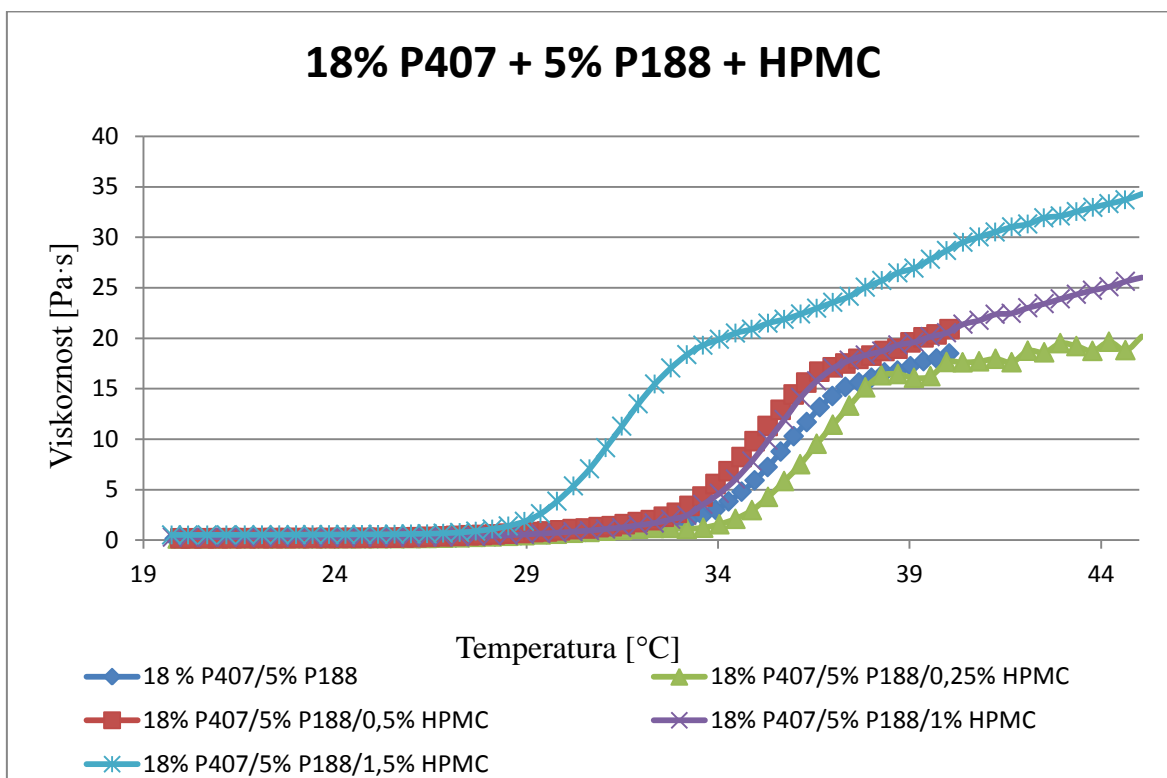
4.1.3. Formulacije s P407, P188 in HPMC

Optimalna je uporaba HPMC do 1,5 %, saj že takšna količina zelo poveča viskoznost vzorca pred geliranjem. Preglednice Xa–Xc vsebujejo rezultate določitve temperatur geliranja formulacijam, ki so sestavljene iz različnih količin P407 in P188 ter z dodatkom HPMC.

Preglednica Xa: Določitev temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala (Tgel1), rotacijske (Tgel2) in oscilacijske (Tgel3) reologije formulacijam, v katerih je prisotnega 18 % P407 in 10 % P188 z dodatkom HPMC

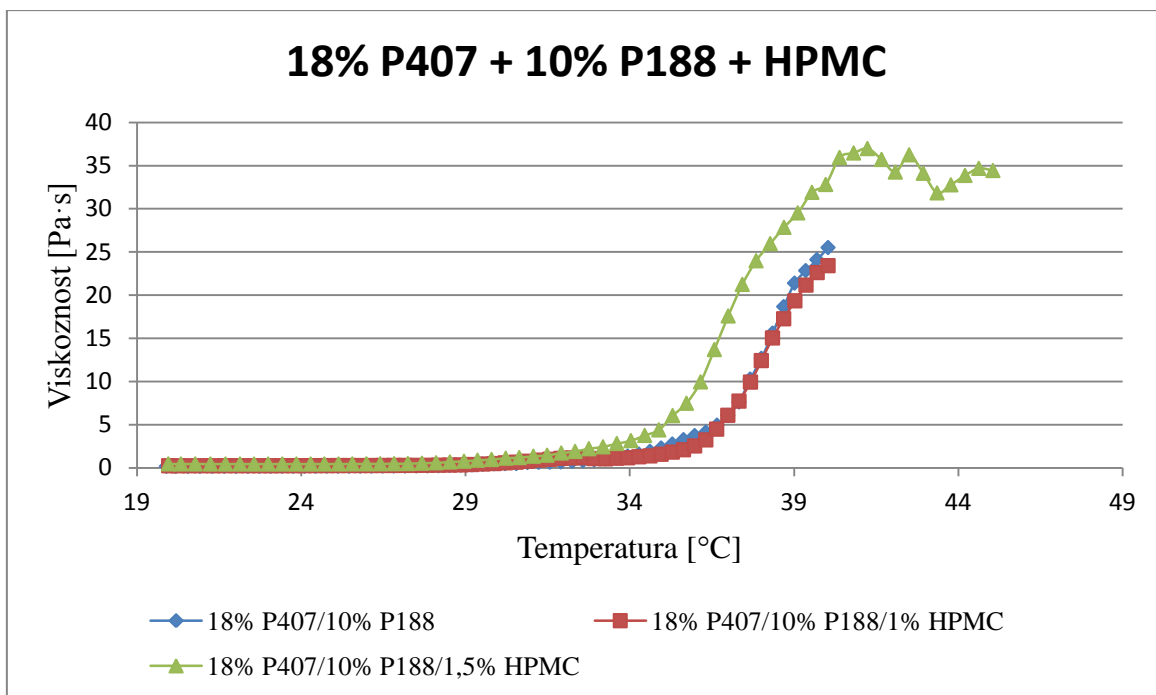
| Gel | T gel1 (°C) | T gel2 (°C) | T gel3 (°C) |
|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 18 % P407/5 % P188 | 40,4 | 38–40 | / |
| 18 % P407/5 % P188/0,25 HPMC | 40,1 | 38–40 | 40,5 |
| 18 % P407/5 % P188/0,5 % HPMC | 39,4 | 37,5–39,5 | / |
| 18 % P407/5 % P188/1 % HPMC | 37,5 | 37–39 | 36,7 |
| 18 % P407/5 % P188/1,25 % HPMC | 37,5 | 35–37 | / |
| 18 % P407/5 % P188/1,5 % HPMC | 34,3 | 33–35 | 34,5 |

Tako iz preglednice Xa kot tudi s slike 10 je razvidno, da pri dodajanju HPMC vzorcu, ki vsebuje 18 % P407 ter 5 % P188, dodatek 0,25 % HPMC povzroči zanemarljivo spremembo temperature geliranja in viskoznosti. Manjši padec temperature geliranja pa tudi povečanje viskoznosti lahko opazimo pri dodatku 0,5 % in 1 % HPMC. 1,5 % HPMC izrazito zniža temperaturo geliranja, vendar tudi precej poveča viskoznost formulacije.



Slika 10: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 18 % P407 ter 5 % P188 in HPMC, v odvisnosti od temperature

Ker se rezultati niso popolnoma ujemali s pričakovanimi (HPMC naj bi že v majhnih koncentracijah močno povečala viskoznost in znižala temperaturo geliranja), smo preverili še vpliv dodatka HPMC formulaciji s sestavo 18 % P407 in 10 % P188. Krivulja formulacije z dodanim 1 % HPMC se delno prekriva s krivuljo osnovne formulacije, medtem ko je pri dodatku 1,5 % HPMC dobro razvidno povečanje viskoznosti in znižanje temperature geliranja (slika 11).



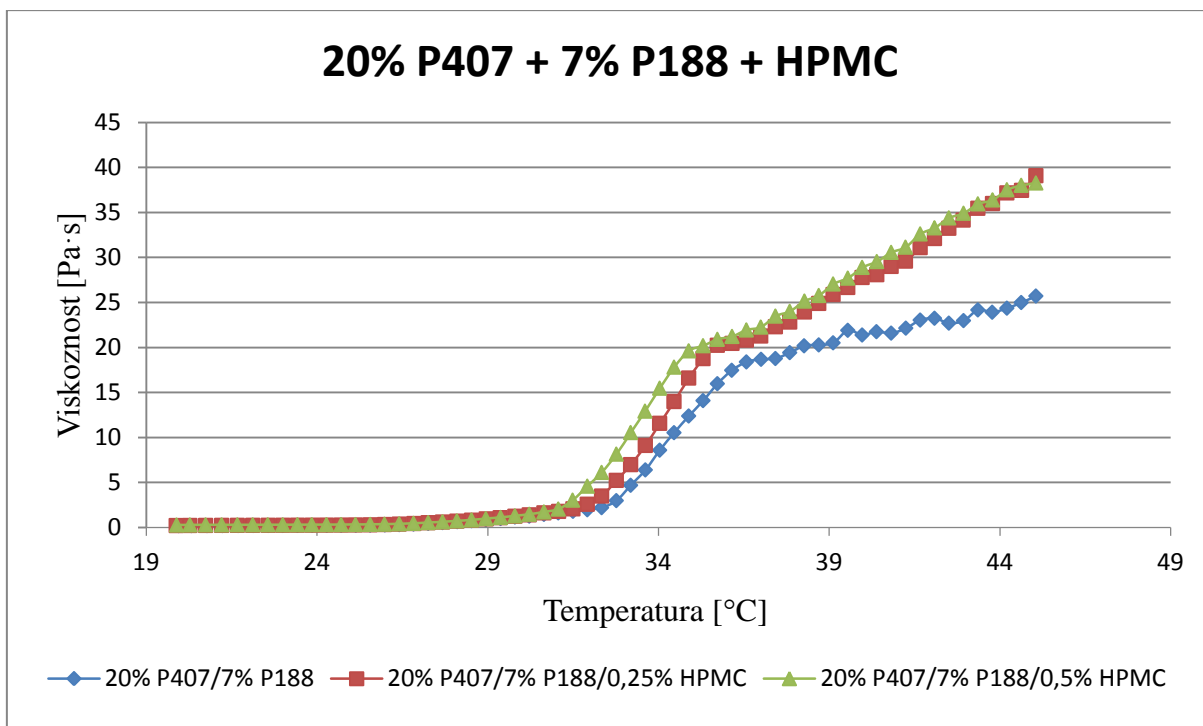
Slika 11: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 18 % P407 ter 10 % P188 in HPMC, v odvisnosti od temperature

Iz preglednice Xb je razvidno, da pri dodajanju HPMC do 1,5 % formulaciji s sestavo 18 % P407 in 10 % P188 dobimo formulacije s previsokimi temperaturami geliranja, zato tej formulaciji nismo več dodajali drugih pomožnih snovi, ki glede na predhodne raziskave manj znižajo temperaturo geliranja kot HPMC.

Preglednica Xb: Določitev temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala (Tgel1), rotacijske (Tgel2) in oscilacijske (Tgel3) reologije formulacijam, v katerih je prisotnega 18 % P407 in 5 % P188 z dodatkom HPMC

| Gel | Tgel1 (°C) | Tgel2 (°C) | Tgel3 (°C) |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|
| 18 % P407/10 % P188 | 41,6 | 41–43 | / |
| 18 % P407/10 % P188/1 % HPMC | 39,5 | 39–41 | 38,6 |
| 18 % P407/10 % P188/1,5 % HPMC | 37,9 | 39–41 | 37,2 |

Vpliv dodatka 0,25 % in 0,5 % HPMC na viskoznost ter temperaturo geliranja smo preverili še pri formulaciji s sestavo 20 % P407 in 7 % P188, saj ima le-ta že v osnovi nižjo temperaturo geliranja, zato smo predvidevali, da bomo prišli do vzorca s prehodom sol-gel pri telesni temperaturi. Rezultati so predstavljeni v preglednici Xc ter na sliki 12. Razvidno je, da dodatek HPMC poveča viskoznost vzorca in zniža temperaturo geliranja. Učinek je viden že pri dodatku 0,25 % HPMC, pri 0,5 % HPMC pa je še bolj izrazit.



Slika 12: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 20 % P407 ter 7 % P188 in HPMC, v odvisnosti od temperature

Preglednica Xc: Določitev temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala (Tgel1), rotacijske (Tgel2) in oscilacijske (Tgel3) reologije formulacijam, v katerih je prisotnega 20 % P407 in 7 % P188 z dodatkom HPMC

| Gel | T gel1 (°C) | T gel2 (°C) | T gel3 (°C) |
|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 20 % P407/7 % P188 | 37,7 | 36,5–38 | 38,1 |
| 20 % P407/7 % P188/0,25 % HPMC | 38,9 | 36–38 | / |
| 20 % P407/7 % P188/0,5 % HPMC | 34,5 | 34–36 | / |
| 20 % P407/7 % P188/1,5 % HPMC | 31,7 | 31–33 | / |

Glede na temperaturo geliranja sta za podkožno aplikacijo najbolj primerni formulaciji s sestavo 18 % P407/5 % P188/1,5 % HPMC in 7 % P188/20 % P407/0,5 % HPMC, saj obe gelirata pri temperaturi med 34 in 36 °C, kar je precej višje od sobne temperature ter nižje od temperature podkožja.

4.1.4. Formulacije s P407, P188 in MC

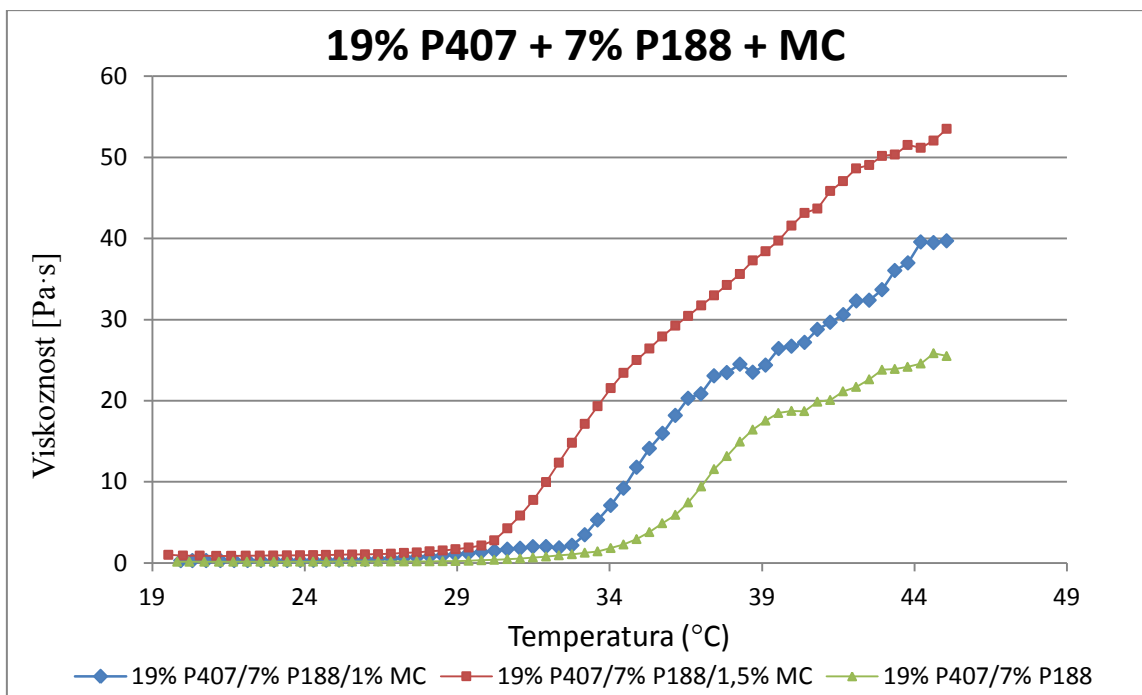
Li s sodelavci je odkril, da z naraščanjem koncentracije MC pada temperatura geliranja vzorca, kar smo potrdili tudi sami (19). Dodatek MC je znižal temperaturo geliranja vseh

treh poloksamernih hidrogelov, učinek pa je naraščal s količino dodane MC (preglednica XI). Najbolj optimalna je bila temperatura geliranja vzorcev s sestavo 20 % P407/7 % P188/1 % MC (35,2 °C) in 19 % P407/7 % P188/1,5 % MC (35 °C).

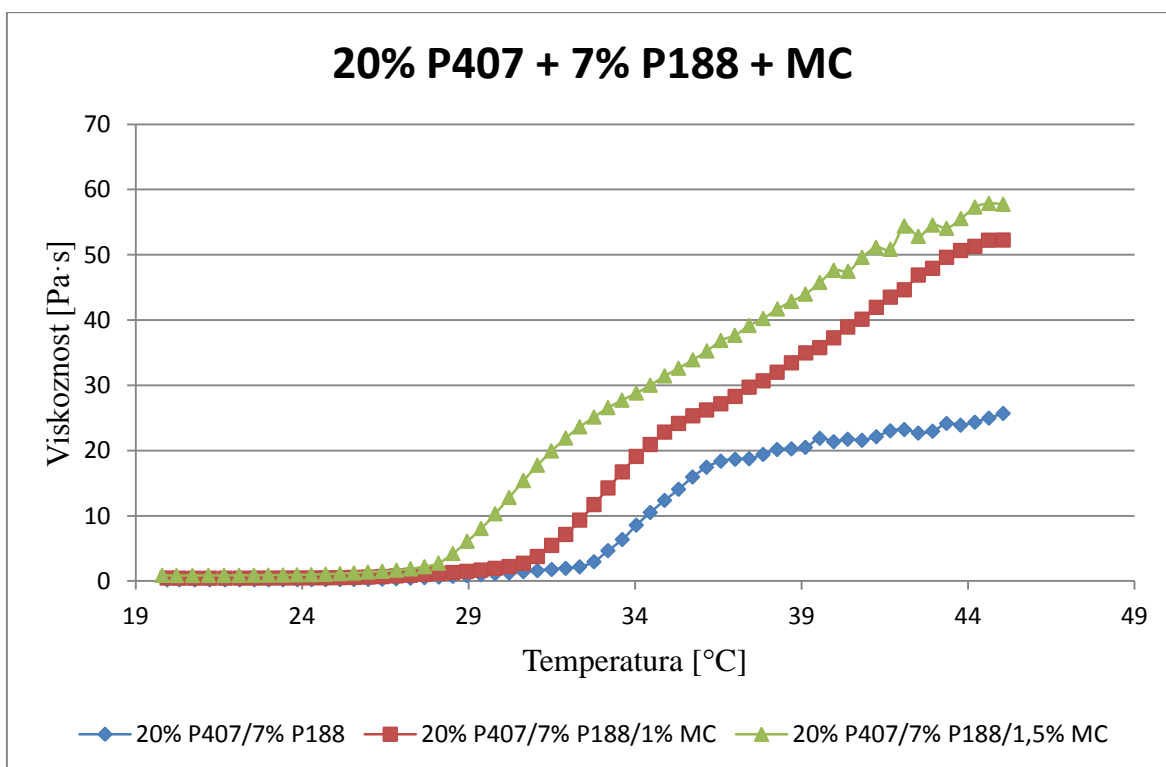
Preglednica XI: Določitev temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala (Tgel1), rotacijske (Tgel2) in oscilacijske (Tgel3) reologije formulacijam, v katerih je prisotna kombinacija poloksamerov P407 in P188 z dodatkom MC

| Gel | Tgel1 (°C) | Tgel2 (°C) | Tgel3 (°C) |
|------------------------------------|------------|------------|------------|
| 20 % P407/7 % P188 | 37,7 | 36,5–38 | 38,1 |
| 20 % P407/7 % P188/1 % MC | 35,2 | 35–37 | 35,5 |
| 20 % P407/7 % P188/1,5 % MC | 32,7 | 32–34 | 32,5 |
| 18 % P407/5 % P188 | 40,4 | 38–40 | / |
| 18 % P407/5 % P188/1,5 % MC | 36,3 | 35–37 | 36,5 |
| 19 % P407/7 % P188 | 41,0 | 39–41 | 41 |
| 19 % P407/7 % P188/1 % MC | 36,6 | 36–38 | / |
| 19 % P407/7 % P188/1,5 % MC | 35 | / | / |

Kot je razvidno s slike 13, dodatek metilceluloze vzorcu, ki vsebuje 19 % P407 in 7 % P188, poveča viskoznost in zniža temperaturo geliranja, dodatek 1,5 % MC pa ima na obe lastnosti precej večji vpliv kot dodatek 1 % MC. Zelo podobne rezultate smo dobili pri dodatku 1 % in 1,5 % MC vzorcu, sestavljenemu iz 20 % P407 in 7 % P188, le viskoznost vzorcev je pri 37 °C znatno višja zaradi večje vsebnosti poloksamera P407, ki prav tako poveča viskoznost formulacije (slika 14).



Slika 13: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 19 % P407 ter 7 % P188 in različne količine MC, v odvisnosti od temperature



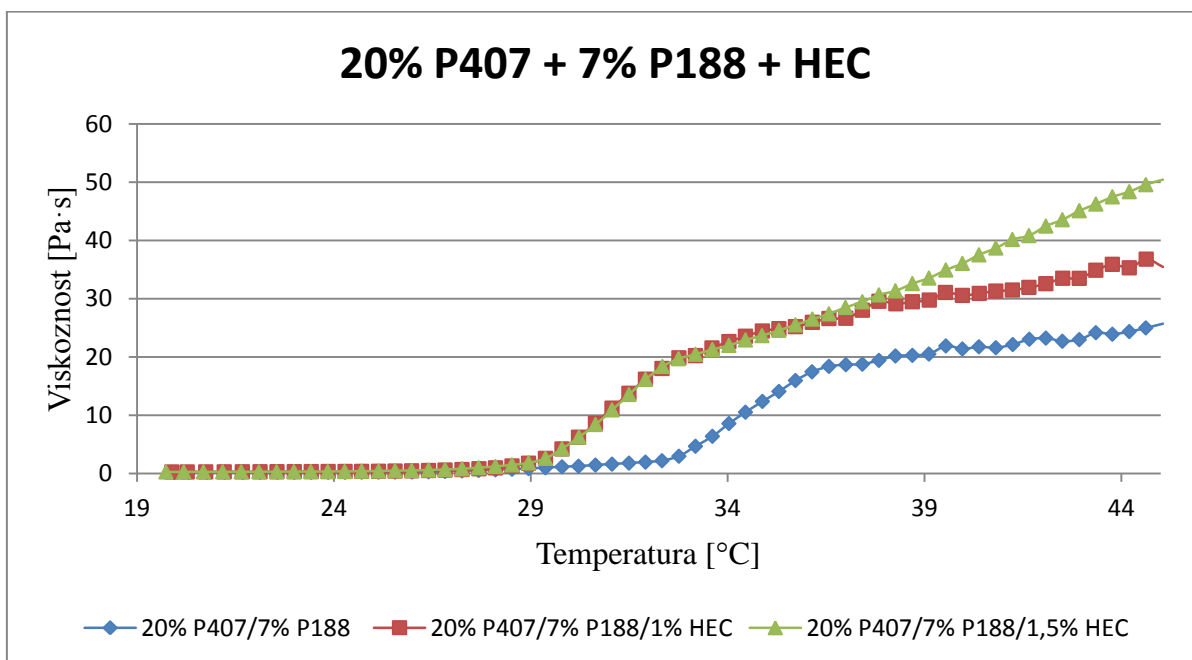
Slika 14: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 20 % P407 ter 7 % P188 in različne količine MC, v odvisnosti od temperature

4.1.5. Formulacije s P407, P188 in HEC

Pri dodajanju HEC zmesi poloksamerov so nastale pene, zaradi katerih smo nekaterim vzorcem določili temperaturo geliranja le s pomočjo rotacijske reometrije (preglednica XII). S slike 15 je razvidno, da dodatek 1 % HEC vzorcu, ki vsebuje 20 % P407 in 7 % P188, zniža temperaturo geliranja za več kot 2 °C in poveča viskoznost, z dodatkom 1,5 % HEC se temperatura geliranja še dodatno zniža, znatno pa se poveča tudi viskoznost hidrogela pri 37 °C. Dodatek HEC torej poveča viskoznost in zniža temperaturo geliranja, učinek se nesorazmerno povečuje z naraščanjem koncentracije HEC. Za podkožno aplikacijo bi bil glede na temperaturo geliranja najbolj primeren vzorec s sestavo 20 % P407/7 % P188/1 % HEC, ki gelira v temperaturnem intervalu od 34 do 36 °C.

Preglednica XII : Določitev temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala (Tgel1), rotacijske (Tgel2) in oscilacijske (Tgel3) reologije formulacijam, v katerih je prisotna kombinacija poloksamerov P407 in P188 z dodatkom HEC

| Gel | Tgel1 (°C) | Tgel2 (°C) |
|------------------------------|------------|------------|
| 20 % P407/7 % P188 | 37,7 | 36,5–38 |
| 20 % P407/7 % P188/1 % HEC | / | 34–36 |
| 20 % P407/7 % P188/1,5 % HEC | / | 32,5–34,5 |



Slika 15: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 20 % P407, 7 % P188 in različne količine HEC, v odvisnosti od temperature

4.1.6. Formulacije s P407, P188 in CMC

Hidrogeli, v katerih je prisotna kombinacija poloksamerov P407 in P188 z dodatkom CMC, so že pri dodatku 0,25 % CMC pri temperaturi 4–5 °C izredno viskozni, zato jim nismo določali temperature geliranja, saj iztis preko injekcijske igle ne bi bil mogoč. Vzorec s sestavo 20 % P407/7 % P188/1,5 % CMC je tako viskozen, da se magnet pri določanju temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala ni vrtel niti pri sobni temperaturi. Ugotovili smo, da CMC ni primerna za modificiranje temperature geliranja hidrogela. Že Gorgieva je s sodelavci dokazala, da ima NaCMC izredno dobro sposobnost nabrekanja, veliko boljše kot HEC (23).

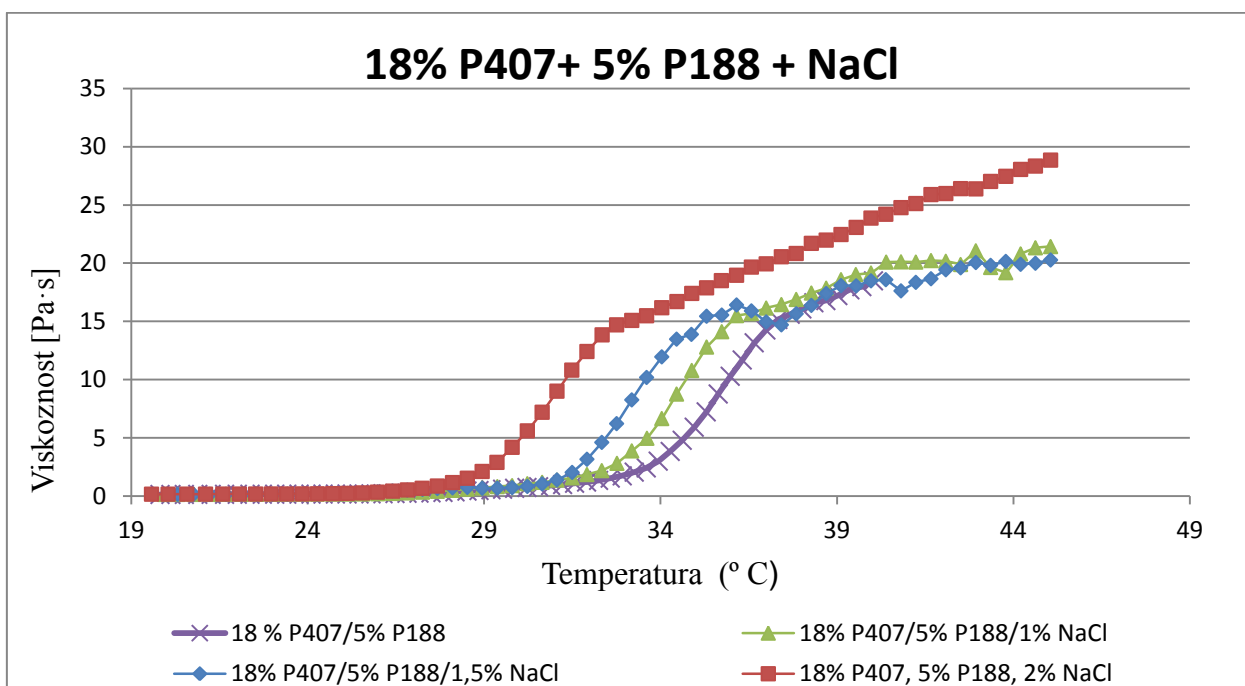
4.1.7. Formulacije s P 407, P 188 in NaCl

Seo je s sodelavci ugotovil, da pri dodajanju do 1 % NaCl temperatura geliranja raztopine, ki vsebuje 16 % P407 in 10 % P188, pade s 44 na 42,5 °C, pri nadaljnjem višanju koncentracije pa ni več opaznih sprememb (14). Kot je razvidno iz preglednice XIII, smo v primerjavi z osnovno formulacijo 18 % P407 in 5 % P188 temperaturo geliranja formulacij s 18 % P407 ter 5 % P188 in 1 % NaCl, znižali za 2,1 °C, v primeru 1,5 % NaCl za dodatne 0,4 °C in v primeru 2 % NaCl za še dodatne 2,7 °C. Prvi del naših rezultatov potrjuje zgornjo predpostavko, saj je znižanje temperature geliranja približno enako pri dodatku 1 % in 1,5 % NaCl, pri dodatku 2 % NaCl pa je znižanje temperature geliranja spet bolj izrazito.

Preglednica XIII: Določitev temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala (Tgel1), rotacijske (Tgel2) in oscilacijske (Tgel3) reologije formulacijam, v katerih je prisotna kombinacija poloksamerov P407 in P188 z dodatkom NaCl

| Gel | Tgel1 (°C) | Tgel2 (°C) |
|--------------------------------------|------------|------------|
| 18 % P407/5 % P188 | 40,4 | 39–41 |
| 18 % P407/5 % P188/1 % NaCl | 38,3 | 36–39 |
| 18 % P407/5 % P188/1,5 % NaCl | 37,9 | 35–37 |
| 18 % P407/5 % P188/2 % NaCl | 35,2 | 33–35 |

S slike 16 je razvidno, da je podobno naraščanje viskoznosti glede na dodano količino NaCl, pri 1 % NaCl se slednja precej poveča, pri 1,5 % NaCl ostaja skoraj enaka, pri dodatku 2 % NaCl pa pride ponovno do izrazitega povečanja viskoznosti vzorca.



Slika 16: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 18 % P407, 5 % P188 in različne količine NaCl, v odvisnosti od temperature

4.1.8. Formulacije s P407, P188 in PEG

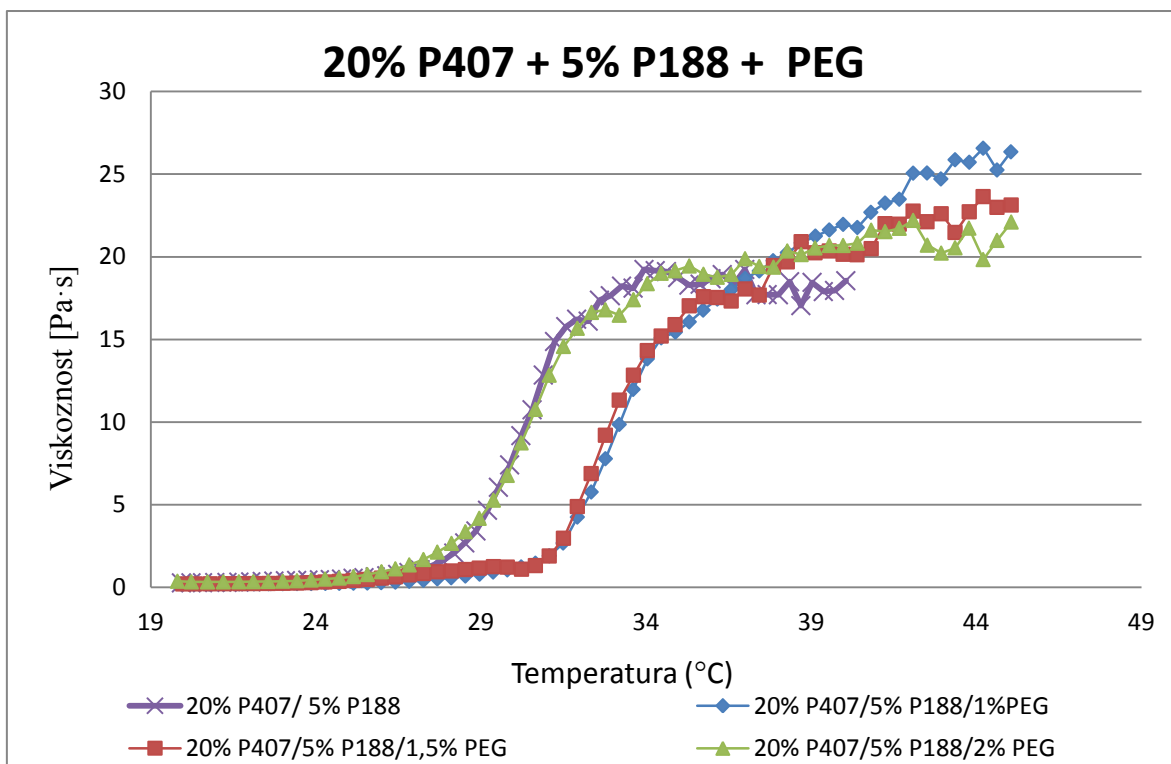
Dodatek 1 % oziroma 1,5 % PEG vzorcu, izdelanemu iz 20 % P407 in 5 % P188, izrazito zviša temperaturo geliranja, 2 % dodanega PEG pa na temperaturo geliranja nima opaznega vpliva (preglednica XIV). Tudi Ko s sodelavci je trdil, da dodatek PEG vodni raztopini poloksamera poviša temperaturo prehoda iz sol v gel stanje (1).

Preglednica XIV: Določitev temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala (Tgel1), rotacijske (Tgel2) in oscilacijske (Tgel3) reologije formulacijam, v katerih je prisotna kombinacija poloksamerov P407 in P188 z dodatkom PEG

| Gel | Tgel1 (°C) | T gel2 (°C) | T gel3 (°C) |
|-------------------------------------|------------|-------------|-------------|
| 20 % P407/5 % P188 | 34,7 | 33-35 | 33,6 |
| 20 % P407/5 % P188/1 % PEG | 37,1 | 37-39 | 36,8 |
| 20 % P407/5 % P188/1,5 % PEG | 36,1 | 36-38 | 36,5 |
| 20 % P407/5 % P188/2 % PEG | / | 34-36 | / |

Pri določanju temperature geliranja formulacije, ki smo ji dodali 2 % PEG, s pomočjo magnetnega mešala je prišlo do nastanka prevelikih količin pene in posledično določanje temperature geliranja s to metodo ni bilo mogoče. Pri vzorcih, ki sta vsebovala 1 % ter

1,5 % PEG, smo morali določitev temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala večkrat ponoviti, saj je občasno prav tako prišlo do nastanka pene. PEG, dodan vzorcu, sestavljenemu iz 20 % P407 in 5 % P188, rahlo poviša viskoznost pri telesni temperaturi, a učinek ne narašča sorazmerno s koncentracijo PEG (slika 17).



Slika 17: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 20 % P407 ter 5 % P188 in različne količine PEG, v odvisnosti od temperature

4.1.9. Formulacije s P407, P188 in NaCl, MC ali HPMC

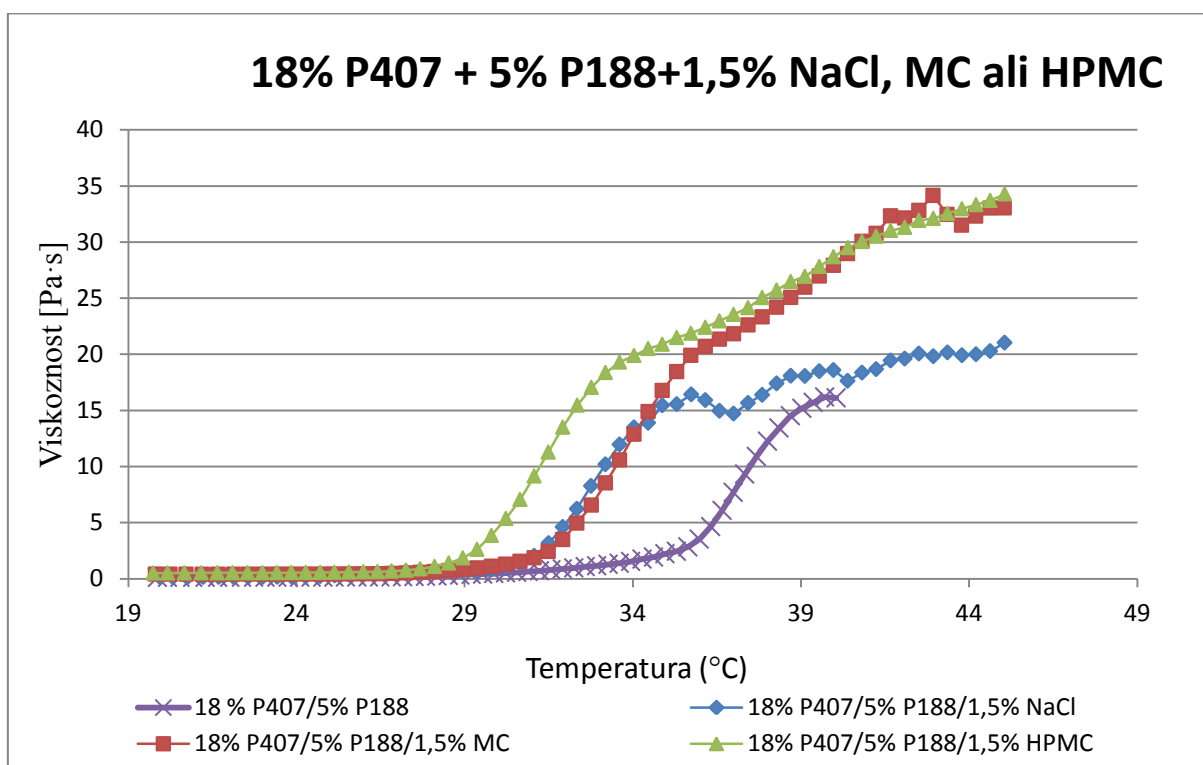
Primerjali smo učinek dodatka enake količine (1,5 %) NaCl, MC oziroma HMPC vzorcu, ki vsebuje 18 % P407 in 5 % P188 (preglednica XV). Temperaturo geliranja najbolj zniža dodatek HMPC, malo manj MC in najmanj NaCl. Povečanje viskoznosti vzorca pri temperaturi 37 °C je pri dodatku HPMC in MC skoraj enako, medtem ko jo dodatek NaCl najmanj poveča, saj slednja dosega le približno 50 % viskoznosti formulacij z dodano MC oziroma HPMC (slika 18).

Rezultati se ne ujemajo z domnevo Sarkarja s sodelavci, da vodna raztopina, v kateri je od 1–10 % HPMC, prehaja v gel pri temperaturi med 75 in 90 °C, medtem ko pri enaki količini MC gelira pri temperaturi 40–50 °C, iz česar lahko sklepamo, da enaka količina

dodane MC bolj zniža temperaturo geliranja kot HPMC. Temperaturo geliranja lahko znižamo s kemijskimi in fizikalnimi modifikacijami MC oziroma HPMC (21).

Preglednica XV: Določitev temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala (Tgel1), rotacijske (Tgel2) in oscilacijske (Tgel3) reologije formulacij, v katerih je prisotna kombinacija 18 % P407 in 5 % P188 z dodatkom 1,5 % NaCl, MC ali HPMC

| Gel | Tgel1 (°C) | Tgel2 (°C) |
|--------------------------------------|------------|------------|
| 18 % P407/5 % P188 | 40,4 | 39–41 |
| 18 % P407/5 % P188/1,5 % NaCl | 37,9 | 35–37 |
| 18 % P407/5 % P188/1,5 % MC | 36,3 | 35–37 |
| 18 % P407/5 % P188/1,5 % HPMC | 34,3 | 33–35 |



Slika 18: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 18 % P407, 5 % P188 in 1,5 % NaCl, MC ali HPMC, v odvisnosti od temperature

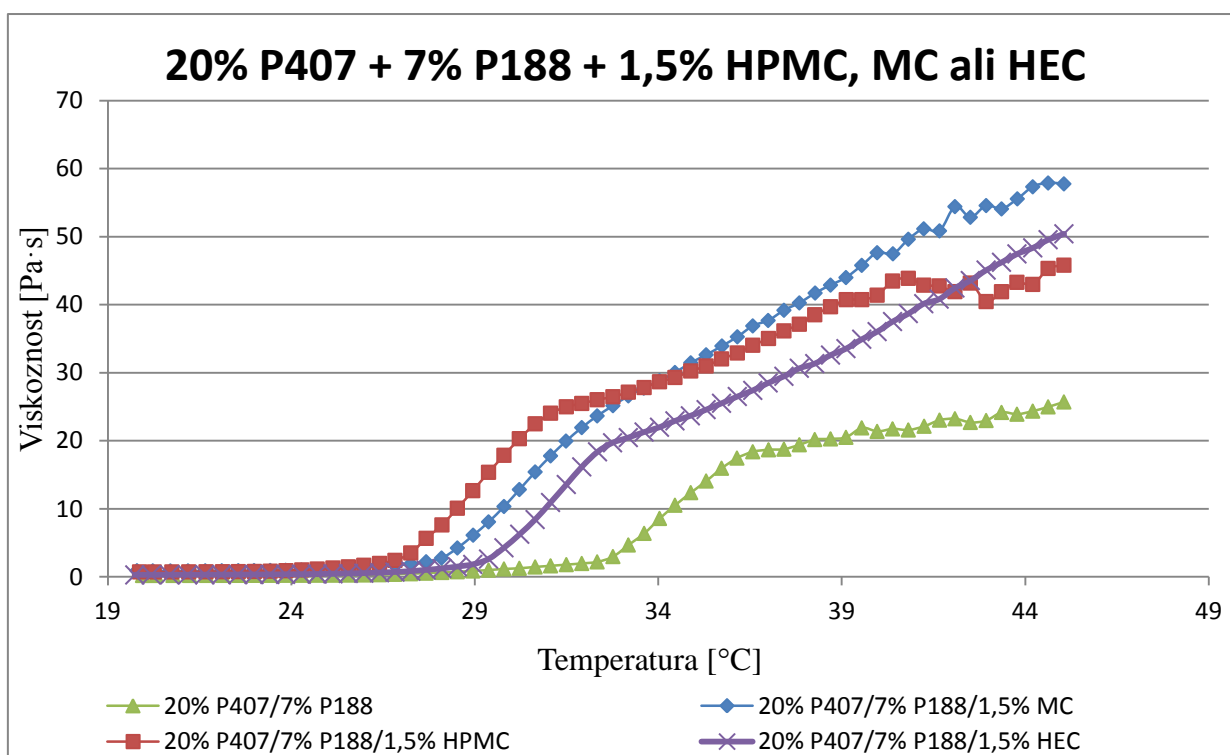
4.1.10. Formulacije s P407, P188 in HPMC, MC ali HEC

Primerjali smo še lastnosti formulacij s sestavo 20 % P407 in 7 % P188 ter 1,5 % HPMC, MC ali HEC, kar je razvidno s slike 19 in preglednice XVI. Potrdili smo, da dodatek MC poveča viskoznost približno enako kot HPMC, medtem ko slednja bolj zniža temperaturo

geliranja formulacije. HEC ima manjši vpliv tako na povečanje viskoznosti kot tudi na znižanje temperature geliranja formulacije.

Preglednica XVI: Določitev temperature geliranja s pomočjo magnetnega mešala (Tgel1), rotacijske (Tgel2) in oscilacijske (Tgel3) reologije formulacijam, ki vsebujejo 20 % P407 in 7 % P188 z dodatkom 1,5 % NaCl, MC ali HPMC

| Gel | Tgel1 (°C) | Tgel2 (°C) |
|--------------------------------------|------------|------------|
| 20 % P407/7 % P188 | 37,7 | 36,5–38 |
| 20 % P407/7 % P188/1,5 % HPMC | 31,7 | 31–33 |
| 20 % P407/7 % P188/1,5 % MC | 32,7 | 32–34 |
| 20 % P407/7 % P188/1,5 % HEC | / | 32,5–34,5 |



Slika 19: Spreminjanje viskoznosti termoreverzibilnih formulacij, ki vsebujejo 20 % P407 ter 7 % P188 in 1,5 % NaCl, MC ali HPMC, v odvisnosti od temperature

4.3. Raztapljanje termoreverzibilnih hidrogelov

S preskusom raztapljanja smo želeli ugotoviti, kateri gel ima ustrezno dolg čas raztapljanja za subkutano aplikacijo, za slednjo naj bi raztapljanje potekalo vsaj 5 dni, sami pa smo se odločili, da bomo za nadaljnje testiranje uporabili le hidrogel, ki se raztaplja vsaj 7 dni.

Preglednica XVII: Masa neraztopljenega hidrogela v gramih po določenem dnevu preizkusa raztapljanja

| Število dni poteka raztapljanja | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Gel | (g) | (g) | (g) | (g) | (g) | (g) | (g) | (g) |
| 20 % P407/7 % P188/1 % MC | 0,92 | 0,73 | 0,46 | 0,25 | 0,18 | 0,16 | 0,14 | 0,10 |
| 18 % P407/5 % P188/1,5 % MC | 0,91 | 0,82 | 0,83 | 0,7 | 0,56 | 0,52 | 0,49 | 0,4 |
| 19 % P407/7 % P188/1 % MC | 0,83 | 0,62 | 0,31 | 0,17 | 0,08 | 0,08 | 0,07 | 0,04 |
| 18 % P407/5 % P188/2 % NaCl | 0,73 | 0,17 | 0,12 | 0,09 | 0,12 | 0,16 | 0,11 | 0,07 |
| 18 % P407/5 % P188/1,25 % HPMC | 0,85 | 0,67 | 0,42 | 0,4 | 0,36 | 0,33 | 0,31 | 0,27 |
| 20 % P407/7 % P188/0,25 % HPMC | 0,74 | 0,44 | 0,17 | 0,17 | 0,15 | 0,14 | 0,12 | 0,06 |
| 20 % P407/7 % P188/0,5 % HPMC | 0,83 | 0,72 | 0,60 | 0,57 | 0,41 | 0,34 | 0,23 | 0,19 |

Rezultate, kjer je bila masa še neraztopljenega hidrogela manjša od 0,08 g, smo opredelili kot dokončno raztopljene hidrogelne, saj lahko komaj opazno odstopanje mase od mase prazne epruvete povzroči tudi prisotna voda. Najhitreje (po 4 dneh) se je raztopil gel s sestavo 18 % P407/5 % P188/2 % NaCl. Vzrok je najbrž visok delež NaCl, saj je že Yong s sodelavci predpostavil, da se zaradi zelo dobre topnosti NaCl v vodi formulacije z visokim deležem NaCl hitreje raztopijo (15). Skoraj enako hitro je potekalo raztapljanje hidrogela s sestavo 19 % P407/7 % P188/1 % MC. Glede na to, da slednji vsebuje visok delež MC, je razlog za hitro raztapljanje najbrž nižji delež P407 (višji kot je delež P407, počasnejše naj bi bilo raztapljanje) ter višji delež P188, ki naj bi raztapljanje pospešil.

Najbolj počasi je potekalo raztapljanje gela s 18 % P407/5 % P188/1,5 % MC, saj je 10. dan poskusa ostalo še 0,4 g neraztopljenega hidrogela. Vsi hidrogeli, ki poleg poloksamerov vsebujejo še HPMC, se raztapljajo daljši čas. Na podlagi primerjave hidrogelov s sestavo 20 % P407/7 % P188/0,25 % in 20 % P407/7 % P188/0,5 % HPMC smo ugotovili, da večji delež HPMC bolj podaljša čas raztapljanja hidrogela, saj je masa neraztopljenega hidrogela padala počasneje pri tistem z višjo vsebnostjo HPMC.

S pomočjo poteka raztapljanja gelov 20 % P407/7 % P188/1 % MC in 19 % P407/7 % P188/1 % MC, smo dokazali, da poloksamer P407 podaljša čas raztapljanja hidrogela, saj se je vzorec z 20 % P407 raztapljal več kot 10 dni, medtem ko je bil tisti z 19 % P407 popolnoma raztopljen že osmi dan preskusa.

Glede na rezultate raztapljanja so za dlje časa trajajočo dostavo učinkovin primerni hidrogeli:

- 20 % P407/7 % P188/1 % MC,
- 18 % P407/5 % P188/1,5 % MC,
- 18 % P407/5 % P188/1,25 % HPMC,
- 20 % P407/7 % P188/0,25 % HPMC,
- 20 % P407/7 % P188/0,5 % HPMC.

4.4. Sposobnost injiciranja termoreverzibilnih formulacij

Zaradi rožene plasti, ki omejuje transport učinkovin v krvni obtok, smo namesto transdermalne izbrali podkožno aplikacijo, kjer se izognemo prehodu učinkovine preko te plasti. Formulacija mora biti za ta način aplikacije primerna za iztis preko injekcijske igle, zato smo preverili tudi to lastnost pri tistih vzorcih, ki so izkazali ustrezno temperaturo geliranja ter dovolj dolg čas raztapljanja. Vzorce smo podobno kot Ur-Rehman s sodelavci razdelili v štiri razrede, in sicer smo jih opredelili kot neiztisljive, slabo iztisljive, iztisljive ter dobro iztisljive. Neiztisljivi ne prehajajo preko igle, pri veliki sili stiskanja pride prej do ločitve igle od brizge kot do iztisa formulacije, kar se lahko zgodi tudi pri preveliki sili iztiskanja slabo iztisljivih formulacij, ki pri dovolj močnem iztiskanju prehajajo iglo v obliki posameznih kapljic. Iztisljive formulacije izhajajo iz igle v obliki posameznih kapljic viskozne tekočine, ki ob večji sili stiskanja lahko prehajajo v prekinjen curek. Dobro iztisljive formulacije iztisnemo v obliki neprekinjenega curka tekočine.

Preglednica XVIII: Iztisljivost formulacij skozi igli 25G in 21G

| Gel | Igla | Iztisljivost |
|--------------------------------|------|------------------|
| 20 % P407/7 % P188/1 % MC | 25 G | Neiztisljiva |
| | 21 G | Iztisljiva |
| 18 % P407/5 % P188/1,5 % MC | 25 G | Slabo iztisljiva |
| | 21 G | Iztisljiva |
| 18 % P407/5 % P188/1,25 % HPMC | 25 G | Slabo iztisljiva |
| | 21 G | Dobro iztisljiva |
| 20 % P407/7 % P188/0,5 % HPMC | 25 G | Iztisljiva |
| | 21 G | Dobro iztisljiva |

Glede na to, da vzorci vsebujejo HPMC oziroma MC, smo zaradi višje viskoznosti raztopin pričakovali slabšo iztisljivost. Formulacija, ki vsebuje 20 % P407, bi imela že zaradi visokega deleža P407 previsoko viskoznost, če ne bi vsebovala tudi večjega deleža P188, ki viskoznost zmanjša. Skozi iglo 25G je bila neiztisljiva formulacija s sestavo 20 % P407/7 % P188/1 % MC, saj se je igla prej ločila od brizge, kot je prišlo do iztisa vzorca. Enako se lahko zgodi pri iztisu slabo iztisljivih formulacij, med katere spadajo 18 % P407/5 % P188/1,5 % MC in 18 % P407/5 % P188/1,25 % HPMC. Zgoraj naštetih vzorcev so bili lažje iztisljivi skozi iglo 21G. Iz preglednice XVIII je razvidno, da višji deleži MC oziroma HPMC povečajo viskoznost ter s tem otežijo iztisljivost. Najboljše je prehajala formulacija s sestavo 20 % P407/7 % P188/0,5 % HPMC, ki je šla zlahka skozi obe igli.

5. Sklep

S kombinacijo poloksamerov P407 in P188 ter določenih pomožnih snovi nam je uspelo izdelati termoreverzibilne formulacije, primerne za podkožno injiciranje z naslednjimi lastnostmi:

- temperaturo geliranja med 34 in 36 °C,
- viskoznostjo, ki je pri sobni temperaturi primerna za iztis skozi iglo 25G oziroma vsaj skozi iglo 21G,
- ustrezno viskoznostjo pri temperaturi podkožja (37 °C),
- s časom raztapljanja vsaj pet dni.

Določili smo tudi vpliv poloksamerov P407 in P188 ter pomožnih snovi na viskoznost in temperaturo geliranja formulacije. Komponente formulacij, ki znižajo temperaturo geliranja in povečajo viskoznost so:

- Poloksamer P407,
- HPMC,
- MC (manj kot HPMC),
- HEC (manj kot MC),
- NaCl (manj kot MC).

Poloksamer P188 zmanjša viskoznost in zviša temperaturo geliranja, PEG pa poveča tako temperaturo geliranja kot tudi viskoznost (izredno malo). Dodatek CMC preveč poveča viskoznost zmesi in s tem onemogoči podkožno aplikacijo.

Pri raztapljanju smo ugotovili, da proces upočasnimo s povečanjem koncentracije P407 in HPMC, test iztisljivosti pa je potrdil domnevo, da višji deleži MC oziroma HPMC povečajo viskoznost in posledično otežijo iztisljivost formulacije skozi iglo.

Kot ustrezne smo označili formulacije s sestavo

- 20 % P407/7 % P188/1 % MC
- 18 % P407/5 % P188/1,5 % MC
- 18 % P407/5 % P188/1,25 % HPMC
- 20 % P407/7 % P188/0,25 % HPMC
- in 20 % P407/7 % P188/0,5 % HPMC.

Najprimernejše so bile lastnosti formulacije s sestavo 20 % P407/7 % P188/0,5 % HPMC. Le-ta gelira pri temperaturi 34,5 °C, se raztaplja več kot 10 dni ter je dobro iztisljiva skozi iglo 21G in iztisljiva skozi iglo 25G.

Viri in literatura

1. Young Ko D, Pramod Shinde U, Yeon B, Jeong B: Recent progress of in situ formed gels for biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 2013; 38: 672–701.
2. Andriola A, Brun-Graeppi S, Richard C, Bessodes M, Scherma D, Merten O W: Thermoresponsive surfaces for cell culture and enzyme-free cell detachment. *Progress in Polymer Science* 2010; 35: 1311–1324.
3. Jung Chung H, Lee Y, Tae G: Thermo-sensitive and biodegradable hydrogels based on stereocomplexed Pluronic multi-block copolymers for controlled protein delivery. *J Control Release* 2008; 127: 22–30.
4. Niu G, Du F, Song L, Zhang H et al: Synthesis and characterization of reactive poloxamer 407 for biomedical applications. *J Control Release* 2009; 138: 49–56.
5. Klouda L, Mikos A G: Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 68: 34–45.
6. Cirillo G, Spataro T, Curcio M, Spizzirri U G, Nicoletta F, Picci N, Iemma F: Tunable thermo-responsive hydrogels: Synthesis, structural analysis and drug studies. *Materials Science and Engineering* 2015; 48: 499–510.
7. Radivojša Matanović M, Kristl J, Ahlin Grabnar P: Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *Int J Pharm* 2014; 472: 262–275.
8. Erlandsson B, Wittgren B, Brinkmalmb G: Development of a size exclusion chromatography method for the determination of molar mass for poloxamers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003; 31: 845–858.
9. Mao Y, Thompson M, Wang Q, Tsai E W: Quantitation of poloxamers in pharmaceutical formulations using size exclusion chromatography and colorimetric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004; 35: 1127–1142.
10. Lutrol®L and Lutrol F-Grades. Technical Information. BASF 2010.
11. Erlandsson B: Stability-indicating changes in poloxamers: the degradation of ethylene oxide-propylene oxide block copolymers at 25 and 40 °C. *Polymer Degradation and Stability* 2002; 78: 571–575.

12. Ur-Rehman T, Tavelin S, Gröbner G: Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *Int J Pharm* 2011; 409: 19-29.
13. Ruel-Gariépy E, Leroux J: In situ-forming hydrogels – review of temperature sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 409-426.
14. Seo J H, Kim J: Effects of additives on phase transitions of Poloxamer 407/Poloxamer 188 mixture and release property of monoolein cubic phase containing the poloxamers. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2012; 18: 88–91.
15. Yong C S, Choi S , Quan Q et al.: Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium. *Eur J Pharm Sci* 2001; 226: 195-205.
16. Mayol L, Quaglia F, Borzacchiello T et al.: A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 70: 199- 206.
17. Viera G, Filho G R, Assuncao M, Meireles C et al: Synthesis and characterization of methylcellulose from sugar cane bagasse cellulose. *Carbohydrate Polymers* 2007; 67: 182–189.
18. Knar M, Bayer R: The shear dependence of the methylcellulose gelation phenomena in aqueous solution and in ceramic paste. *Carbohydrate Polymers* 2011; 111: 80- 88.
19. Li F, Wang W, Wang X, Yu J: Changes of structure and property of alkali soluble hydroxyethylcelluloses (HECs) and their regenerated films with the molarsubstitution. *Carbohydrate Polymers* 2014; 114: 206–212.
20. Jain A K, Söderlind E, Viridén: The influence of Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) molecular weight, concentration and effect of food on in vivo erosion behavior of HPMC matrix tablets. *J Control Release* 2014; 187: 50-58.
21. Sarkar N: Thermal gelation properties of methyl and hydroxypropyl methylcellulose. *J Appl Polym Sci* 1979; 24: 1073–1087.
22. Haleema N, Arshada M, Shahidb M, Ashraf Tahir M: Synthesis of carboxymethyl cellulose from waste of cotton ginning industry. *Carbohydrate Polymer* 2014; 113: 249–255.

23. Gorgieva S, Kokol V: Synthesis and application of new temperature-responsive hydrogels based on carboxymethyl and hydroxyethyl cellulose derivatives for the functional finishing of cotton knitwear. *Carbohydrate Polymers* 2011; 85: 664–673.
24. Li C, Li W, Holler T H, Gu Z, Li Z: Polyethylene glycols enhance the thermostability of β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. *Food Chemistry* 2014; 164: 17–22.
25. Šmitek J: Parenteralno dajanje zdravil- intramuskularna injekcija. *Obzor Zdr N* 2005; 39: 63-71.
26. Zupančič Valant A: Uvod v reologijo, 1. izdaja, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2007.
27. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247>, dostopanje 21.11. 2014