

Ocena właściwości hydrożeli termowrażliwych z błękitem metylenowym w aspekcie potencjalnego zastosowania w terapii fotodynamicznej

The evaluation of thermoreversible hydrogels with methylene blue in terms of potential application in photodynamic therapy

Tomasz Osmałek, Anna Froelich, Barbara Jadach, Anika Mielewczyk

Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Wstęp. Terapia fotodynamiczna (ang. *Photodynamic Therapy*; PDT) jest jedną z alternatywnych metod leczenia nowotworów. W porównaniu z tradycyjnymi technikami stosowanymi w onkologii, takimi jak chirurgia, chemio- i radioterapia, PDT charakteryzuje się przede wszystkim mniejszą inwazyjnością. PDT jest odmianą fotochemioterapii, w której światło jest wykorzystywane do wzbudzenia substancji fotowrażliwych (fotouczulaczy) skumulowanych w tkance nowotworowej, co prowadzi do jej zniszczenia. Fotouczulacze najczęściej aplikowane są w formie iniekcji dożylnych, co niestety niesie za sobą ryzyko wystąpienia fotowrażliwości ogólnej. Biorąc pod uwagę fakt, że głównym obszarem zastosowań PDT są nowotwory występujące w skórze lub błonach śluzowych, uzasadnione wydają się badania mające na celu opracowanie nośników dla fotouczulaczy, które umożliwią ich aplikację bezpośrednio na tkankę nowotworową. **Cel.** Przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej pracy było opracowanie składu oraz ocena właściwości hydrożeli termowrażliwych zawierających błękit metylenowy (BM). **Materiał i metody.** Do przygotowania hydrożeli wykorzystano polimer syntetyczny – poloksamer 407. Zawartość składnika aktywnego wynosiła 0,01%. Jako substancję konserwującą zastosowano chlorek benzalkoniowy. Ponadto w skład żeli wchodził eter monoetylowy dietylenoglikolu (Transcutol®), pełniący rolę promotora wchłaniania. Otrzymane żele poddano analizie reologicznej, obejmującej testy płynięcia w trybie kontrolowanej prędkości ścinania i kontrolowanego naprężenia ścinającego, testy pełzania i powrotu sprężystego oraz ocenę właściwości lepkosprężystych w oparciu o wyniki analizy oscylacyjnej. Przeprowadzono również analizę temperatury żelowania wybranych formułacji. **Wyniki.** Wyniki przeprowadzonych badań świadczą o tym, że badane żele to układy nienewtonowskie o cechach typowo pseudoplastycznych. Właściwości sprężyste wszystkich preparatów przeważały nad właściwościami lepkimi. Hydrożele nie wykazywały właściwości tiksotropowych. Dodatek chlorku benzalkoniowego wpłynął na usztywnienie struktury żeli, natomiast odwrotny efekt zaobserwowano po dodaniu barwnika. Transcutol® wyraźnie obniżał granicę płynięcia żeli. (*Farm Współ* 2017; 10: 211-222)

Słowa kluczowe: terapia fotodynamiczna, hydrożele, błękit metylenowy, fotouczulacz

Summary

Introduction. Photodynamic therapy (PDT) is one of the alternative methods in cancer treatment. It is less invasive than methods traditionally applied in oncology like chemo- and radiotherapy. PDT is a type of photochemotherapy with light employed in the excitation process of photosensitive substances (photosensitizers) accumulated in cancer tissue, which results in its destruction. Photosensitizers are most commonly applied as intravenous injections which are associated with the risk of systemic photosensitivity. Taking into consideration the fact that PDT is mostly applied in skin and mucosa cancers, the studies aiming at the design of carriers applied directly to the cancer tissue seem to be important. **Aim.** The aim of the study was the design and evaluation of

thermosensitive hydrogels containing methylene blue (BM) in the concentration 0.01%. **Material and methods.** For hydrogel preparation, poloxamer, a synthetic polymer was used. Also, preservative benzalkonium chloride (BC) and absorption enhancer diethylene glycol monoethyl ether (Transcutol®) were used. Prepared gels were subjected to rheological analyses, i.e. flow behavior tests in controlled rate and controlled stress modes, creep and recovery tests and viscoelastic behavior analysis based on the oscillatory tests. Moreover, the analysis of gelation temperature was performed for selected formulations. **Results.** The obtained results indicate that the investigated gels are non-Newtonian systems with shear-thinning properties. In all analyzed samples the elastic properties prevailed over the viscous ones. The hydrogels revealed no thixotropic properties. An addition of BC resulted in the stiffening of gels structure, while after the addition of BM the opposite effect was observed. The addition of Transcutol® significantly decreased yield stress value obtained for the investigated samples. (*Farm Współ* 2017; 10: 211-222)

Keywords: photodynamic therapy, hydrogel, methylene blue, photosensitizer

Wstęp

Według danych przedstawionych przez Stowarzyszenie Europejskich Lig Walki z Rakiem (ang. *Association of European Cancer Leagues*, ECL) każdego roku, u ponad trzech milionów Europejczyków diagnozuje się chorobę nowotworową [1]. Ze względu na postępujący proces starzenia się populacji oraz wzrost ekspozycji na promieniowanie słoneczne jednymi z najczęściej występujących są nowotwory skóry. Zalicza się do nich rak podstawnkomórkowy (*basal cell carcinoma*), kolczystokomórkowy (*squamous cell carcinoma*) oraz czerniak złośliwy (*malignant melanoma*) [2,3]. Współczesna onkologia dysponuje wieloma metodami walki z chorobami nowotworowymi. Do najczęściej wykorzystywanych należą radio- i chemioterapia oraz chirurgia. Należy jednak zauważyć, że leczenie tradycyjne nie zawsze pozwala na całkowite usunięcie zmian nowotworowych. Ponadto jest obciążone ryzykiem znacznego uszkodzenia tkanek zdrowych, co wydłuża okres rekonwalescencji [4]. Od wielu lat głównym wyzwaniem w zakresie terapii onkologicznej jest opracowanie metody gwarantującej selektywne i efektywne niszczenie komórek nowotworowych [5]. Jedną z coraz bardziej popularnych i powszechnie akceptowanych technik jest terapia fotodynamiczna (ang. *Photodynamic Therapy*; PDT) [6,7]. Światło jako forma energii może oddziaływać z materią i zmieniać właściwości substancji chemicznych. Już od tysięcy lat promienie słoneczne wykorzystywano wspomagająco w leczeniu różnego rodzaju schorzeń [8,9]. Przykładem może być, sposób, w jaki starożytni Egipcjanie maskowali objawy bielactwa. W tym celu wykorzystywali sok z owoców aminka egipskiego (*Ammi visnagae*), którego składnikami są między innymi związki fotouczulające z grupy psoralenów. Po nałożeniu na skórę i ekspozycji

na światło słoneczne powodują one zmianę barwy na ciemniejszą. Warto nadmienić, że terapia z wykorzystaniem psoralenów (ang. *Psoralen and Ultraviolet A*, PUVA) jest po dzień dzisiejszy stosowana nie tylko w maskowaniu bielactwa, ale również pomocniczo w terapii takich schorzeń, jak łuszczyca oraz atopowe zapalenie skóry [8,10].

Skuteczność PDT zależy od obecności trzech elementów, takich jak: barwnik światłoczuły (fotouczulacz, fotosensibilizator), światło widzialne oraz tlen cząsteczkowy. Pierwszym etapem jest aplikacja fotouczulacza, który selektywnie kumuluje się w tkance zmienionej chorobowo. Absorpcja promieniowania z zakresu 600-800 nm prowadzi do jego wzbudzenia, czego efektem jest generowanie wysoce toksycznego tlenu singletowego. W rezultacie dochodzi do zniszczenia komórek rakowych [11]. W chwili obecnej przeważająca ilość preparatów zawierających fotouczulacze jest przeznaczona do podania pacjentowi w formie iniekcji dożylnych. Taki sposób aplikacji wiąże się z możliwością wystąpienia efektów ubocznych, które wynikają z niedostatecznie selektywnej kumulacji w tkance nowotworowej. Najczęstszym i najbardziej uciążliwym dla pacjenta efektem niepożądanym jest ogólna fotowrażliwość skóry, trwająca niekiedy nawet kilka miesięcy [12]. Należy jednocześnie zauważyć, że większość nowotworów leczonych z wykorzystaniem PDT jest zlokalizowana właśnie na powierzchni skóry lub błon śluzowych. Dlatego też istnieje uzasadniona potrzeba poszukiwania alternatywnych dla ogólnoustrojowego sposobów podania fotosensibilizatorów. W ciągu ostatnich kilku lat nastąpił znaczny wzrost intensywności badań w zakresie możliwości miejscowego podania aktywnych fotosensibilizatorów bezpośrednio na powierzchnię nowotworu [13,14].

Rozwiązaniem opisanego problemu wydaje się być aplikacja barwników w formie maści, kremów lub żeli. Na światowym rynku farmaceutycznym dostępna jest bardzo niewielka liczba tego rodzaju preparatów. Do najbardziej popularnych należą kremy zawierające kwas δ -aminolewulinowy lub jego estry. Zasadniczym problemem jest jednak fakt, że jako pro-leki substancje te potrzebują określonego czasu na uwrażliwienie tkanki na działanie światła. Okres ten w zależności od rodzaju nowotworu może trwać kilka godzin [10,15]. W związku z tym wskazane i pożądane jest opracowanie preparatów zawierających fotouczulacze, które bezpośrednio po wprowadzeniu do tkanki nowotworowej mogą w wyniku absorpcji światła generować tlen singletowy. Obecnie w leczeniu stosowany jest jeden tego typu preparat o nazwie handlowej Photolon®, zawierający fotouczulacz z grupy chloryn. Nośnikiem dla leku jest podłoże maściowe o charakterze lipofilowym. Jak wiadomo, biodostępność z takiego preparatu może być ograniczona, między innymi ze względu na wolniejszą dyfuzję leku z podłoża lipofilowego, a tym samym dłuższy czas uwalniania.

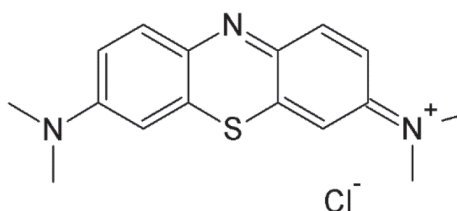
Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że w takim przypadku bardziej wydajny transport barwników przez naskórek lub błony śluzowe mogłyby zapewnić podłoża hydrożelowe. Wzbogacone w promotory wchłaniania hydrożele mogą przyczynić się do bardziej wydajnej absorpcji fotosensybilizatorów [15-21].

Celem badań przedstawionych w pracy było opracowanie składu, technologii otrzymywania oraz ocena właściwości hydrożeli termowrażliwych o potencjalnym zastosowaniu jako podłoża dla fotouczulaczy stosowanych w terapii fotodynamicznej.

Jako substancję modelową zastosowano błękit metylenowy (BM, chlorek 3,7-bis(dimetyloamino)fenotioazynowy). Jest to znany i w pełni scharakteryzowany barwnik tiazynowy (rycina 1). Wykorzystywany jest między innymi jako wskaźnik pH lub barwnik w biologii. Wykazuje również aktywność bakterio-bójczą. Według danych literaturowych BM posiada także cechy fotouczulacza. W wyniku absorpcji promieniowania z zakresu 600-900 nm jest zdolny do generowania tlenu singletowego [17,18].

Orth i wsp. [22] prowadzili badania w zakresie wykorzystania wodnych roztworów BM w leczeniu nowotworów przewodu pokarmowego. Nastrzykując guzy występujące u myszy w rejonie okrężnicy uzyskiwali efekt w postaci zahamowania lub opóźnienia wzrostu zmiany nowotworowej. Zauważyli jednocześnie,

że tkanki wymagały naświetlania po zastosowaniu roztworów BM o stężeniu 0,1%. Natomiast w przypadku stężenia rzędu 1% wzrost guzów ulegał zahamowaniu nawet bez dostępu światła. Stwierdzono również, że błękit metylenowy wykazuje duże powinowactwo do melaniny, z którą tworzy połączenia kompleksowe. Sugeruje się, że taka właściwość może być korzystna w terapii czerniaka. Badania nad tym zagadnieniem



Rycina 1. Wzór strukturalny błękitu metylenowego
Figure 1. The chemical structure of methylene blue

prowadzili między innymi Link i wsp. [23,24] wykazując, że w obecności BM wzrost i rozprzestrzenianie się przerzutów ulegały wyraźnemu osłabieniu. Istnieje również prawdopodobieństwo, że BM można będzie w przyszłości stosować w terapii nieoperacyjnego guza przełyku oraz mięsaka Kaposiego [22,25].

Jako składnik żelujący badanych hydrożeli zastosowano poloksamer 407 (Lutrol®F-127). Jest to syntetyczny kopolimer blokowy zbudowany z reszt polioksyetylenu oraz polioksypropylenu. Rozpuszcza się w zimnej oraz gorącej wodzie. W odpowiednim stężeniu (> 15%) tworzy układy termowrażliwe, które w temperaturze 4-5°C występują w postaci ciekłej, a podczas ogrzewania przechodzą w formę żelu o konsystencji półstałej. Taką właściwość określa się mianem odwrotnego żelowania termicznego [19,26]. Zjawisko to jest efektem powstawania otoczki solwatacyjnej wokół łańcuchów polimerowych w niższych temperaturach. W wyniku ogrzewania układu ruchliwość cząsteczek wody wzrasta, następuje rozpad otoczek i łańcuchy zaczynają oddziaływać bezpośrednio ze sobą. W takich warunkach lepkość hydrożelu wyraźnie wzrasta [27]. W odniesieniu do preparatów stosowanych na skórę lub błony śluzowe taka właściwość jest bardzo korzystna ze względu na fakt, że podczas aplikacji preparatu schłodzonego, w formie płynnej, można uzyskać lepszą penetrację tkanki, po czym w wyniku zestalenia pod wpływem temperatury ciała preparat nie spływa i pozostaje w miejscu gdzie został nałożony. Ma to

szczególne znaczenie przy wprowadzaniu do miejsc trudno dostępnych np. w obrębie jamy ustnej.

Materiał i metody

Materiały

Błękit metylenowy (**BM**, Nr serii 056K0739), Transcutol® (**TR**, Nr serii MKBN8654V) oraz chlorek benzalkoniowy (**BC**, Nr serii 1453187V) zostały kupione w *Sigma Aldrich* (Saint Louis, MO). Poloxamer 407 (Lutrol® F-127, **PF-127**, Nr serii BCBL7069V) został kupiony w *BASF ChemTrade* (Monheim am Rhein, Germany). Wodę dejonizowaną otrzymywano bezpośrednio przed badaniami z wykorzystaniem zestawu Simplicity® Water Purification System produkcji *Merck Millipore* (Darmstadt, Germany).

Skład i sposób przygotowania hydrożeli

Hydrożele (tabela I) przygotowywano 24 h przed zaplanowanymi badaniami. Odpowiednią naważkę polimeru przenoszono do zlewki, w drugiej zlewce przygotowywano wymaganą ilość wody dejonizowanej, schłodzonej wcześniej do temperatury 4-5°C. Na kliszach celuloidowych przygotowywano osobno naważki błękitu metylenowego oraz chlorku benzalkoniowego. Następnie przenoszono je do zlewki z wodą dejonizowaną i dokładnie mieszano. Do roztworu wprowadzano odpowiednią ilość Transcutolu®, po czym ponownie mieszano. Tak przygotowaną fazę wodną przenoszono do zlewki zawierającej PF-127. Uzyskane mieszaniny termostatowano w cieplarni z funkcją chłodzenia KB 115 (*Binder*, Gleisdorf, Austria) w temp. 4-5°C przez 24 h.

Ocena parametrów reologicznych

Do oceny właściwości reologicznych wykorzystano reometr HAAKE RheoStress1, wyposażony w termostat HAAKE DC30 (*ThermoElectron Corp.*) z oprogramowaniem HAAKE RheoWin Job Manager. Badania prowadzono w układzie geometrycznym typu płytka-płytką o średnicy 35 mm. Badane formułacje przechowywano w temperaturze 4-5°C, w butelkach ze szkła oranżowego. Przed pomiarem pobierano strzykawką 1,5 cm³ i umieszczano w cieplarni KB115 (*Binder*, Gleisdorf, Austria) w temp. 37°C do zastygnięcia. Po 20 minutach próbkę wprowadzano na dolną płytkę układu geometrycznego i opuszczano płytkę górną. Wysokość szczeliny pomiędzy płytkami wynosiła 1,0 mm. Nadmiar próbki zbierano szpatułką. Wszystkie badania reologiczne prowadzono w temperaturze 32,0 ± 0,5°C. Po 2 minutach od nałożenia próbki (stabilizacja) wykonywano ścinanie wstępne przy prędkości ścinania równej 200 s⁻¹ w czasie 5 s. Wszystkie oznaczenia powtarzano trzykrotnie (n = 3).

Analiza rotacyjna

Krzywe płynięcia w trybie kontrolowanej szybkości ścinania

Wykreślenie krzywych płynięcia i lepkości wykonywano w zakresie prędkości ścinania 1,0 → 350,0 s⁻¹. Czas pomiaru wynosił 10 s. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 2 w postaci zależności naprężenia stycznego od szybkości ścinania.

Krzywe płynięcia w trybie kontrolowanego naprężenia ścinającego

Analizę przeprowadzono w zakresie wartości naprężenia stycznego 1,0 → 250,0 Pa. Czas pomiaru

Tabela I. Składy hydrożeli wykorzystanych do badań (PF-127 – poloksamer 407; BM – błękit metylenowy; TR – Transcutol®; BC – chlorek benzalkoniowy)

Table I. The compositions of the hydrogels used in the experiments (PF-127 – poloxamer 407; BM – methylene blue; TR – Transcutol®; BC – benzalkonium chloride)

Formulacja	PF-127/woda (20,0/80,0; w/w) [g]	BM [g]	TR [g]	BC [g]
1	100,0	-	-	-
2	q.s.	0,01	-	-
3	q.s.	0,01	5,0	-
4	q.s.	0,01	10,0	-
5	q.s.	0,01	5,0	0,075
6	q.s.	0,01	10,0	0,075

wynosił 10 s. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinach 3 i 4 w postaci zależności szybkości ścinania oraz lepkości od naprężenia stycznego.

Test pękania i powrotu

W pierwszej kolejności próbkę poddawano działaniu naprężenia stycznego o wartości 20 Pa w czasie 60 s. Następnie usuwano naprężenie styczne i badano zachowanie próbki w czasie 180 s (test powrotu). Wyniki przedstawiono na rycinie 5 jako zależność modułu podatności J [1/Pa] od czasu. Podatność zdefiniowano za pomocą równania 1:

$$J = \gamma / \tau \quad (1)$$

gdzie:

γ – odkształcenie [-]

τ – naprężenie ścinające [Pa]

Analiza oscylacyjna

Przemiatanie naprężeniem

Próbki poddawano działaniu wzrastającego naprężenia stycznego w zakresie 0,1-500,0 Pa, przy stałej wartości częstotliwości oscylacji $f = 1$ Hz. Wyniki przedstawiono na rycinie 6, w postaci zależności modułów sprężystości G' oraz lepkości G'' od zmiennego naprężenia stycznego.

Przemiatanie częstotliwością

Próbki poddawano działaniu wzrastającej częstotliwości oscylacyjnej f w zakresie 0,02-14,68 Hz przy stałej wartości naprężenia stycznego również 10,0 Pa. Wartość naprężenia stycznego została wybrana na podstawie linowego zakresu lepkości sprężystości określonego w badaniu prowadzonym ze zmienną amplitudą oscylacji. Wyniki przedstawiono na rycinie 7, w postaci zależności modułów sprężystości G' oraz lepkości G'' od zmiennej częstotliwości.

Ocena temperatury żelowania

W odniesieniu do formulacji 1, 5 oraz 6 przeprowadzono test przemiatania temperaturowego w warunkach oscylacji. Wartość naprężenia stycznego była równa 10,0 Pa, przy częstotliwości oscylacji 1,0 Hz. Podczas eksperymentu zastosowano przyrost temperatury w zakresie 15-25°C. Wyniki przedstawiono na rycinie 8, jako zależność modułu sprężystości G' od temperatury.

Ocena szybkości utraty składników lotnych z badanych hydrożeli

Ocenę szybkości utraty składników lotnych przeprowadzono dla próbek o pojemności 10 ml. Po schłodzeniu do temp. 4-5°C, każdą z próbek przeniesiono osobno na zważoną szalkę Petriego o średnicy 10 cm, ponownie zważono szalki i umieszczono je w cieplarni. Następnie szalki ważono po upływie 1h, 2h, 4h oraz 5h. Wyniki badania przedstawiono jako zależność % pozostałości masy hydrożelu od czasu.

Ocena trwałości BM w hydrożelach podczas przechowywania

Ocenę trwałości BM przeprowadzono dla formulacji 5 i 6. W pierwszej kolejności wykreślono widma elektronowe każdej z próbek korzystając z kuwety kwarcowej o długości drogi optycznej $l = 0,1$ cm. Jako odnośnik zastosowano podłoże nie zawierające fotouczulaczy. Następnie próbki umieszczono w zlewkach szklanych i zabezpieczono szczelnie filmem parafinowym. Jedną z próbek przygotowanych dla każdej z formulacji przeniesiono do lodówki (temp. 4-5°C), drugą natomiast umieszczono w cieplarni w temperaturze 25°C. W odpowiednich odstępach czasu wynoszących 1h, 2h, 3h, 4h, 5h i 24 h próbki wyjmowano i mierzono wartość absorbancji przy długości 668 nm. Wyniki przedstawiono na rycinie 9, jako zależność zmiany wartości absorbancji przy długości fali 668 nm od czasu.

Wyniki i dyskusja

Jednym z warunków powodzenia terapii fotodynamicznej w zakresie leczenia nowotworów skórnych jest dobór właściwego nośnika dla fotouczulaczy, wykazującego m. in. odpowiednie właściwości reologiczne, biogodność, brak interakcji ze składnikami aktywnymi oraz substancjami pomocniczymi [9,10]. Z danych literaturowych wynika, że wymienione powyżej kryteria spełniają polimery z grupy poloksamerów, będące kopolimerami polioksyetyleny z polioksypropylenem. Wybrany do badań poloksamer 407 jest uważany za jeden z najmniej toksycznych polimerów syntetycznych, dlatego też znalazł liczne zastosowania w technologii farmaceutycznej oraz przemyśle kosmetycznym. Jest również badany pod kątem możliwości wykorzystania w medycynie regeneracyjnej [16,28,29].

Materiał do badań stanowiły hydrożele na bazie poloksamerów zawierające modelowy barwnik fotouczulający, błękit metylenowy oraz promotor wchła-

niania, Transcutol®. Na podstawie oceny wizualnej przygotowanych układów można stwierdzić, że dodatek Transcutolu® nie wpływał na jednorodność hydrożeli. Zarówno bezpośrednio po przygotowaniu, jak również w trakcie przechowywania czy wykonywania badań żełe z jego dodatkiem były jednorodne, transparentne, nie ulegały wyraźnym zmianom wizualnym.

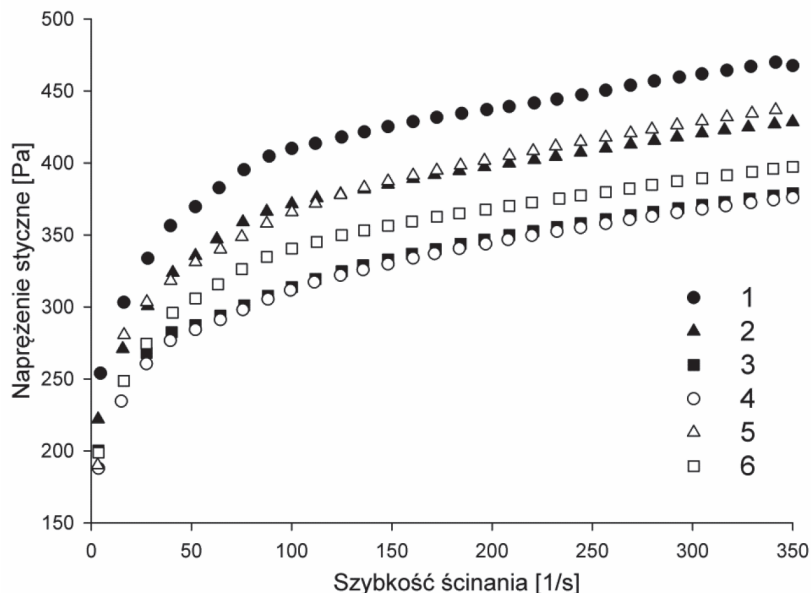
Ocena parametrów reologicznych

Przed przystąpieniem do właściwych pomiarów reologicznych, próbki poddawano tak zwanemu ścinaniu wstępnemu (ang. *pre-shearing*). Uzasadnieniem dla takiego postępowania jest uzyskiwanie bardzo zróżnicowanych wyników, gdy próbki były badane bezpośrednio po nałożeniu na płytkę. Opisany efekt był szczególnie zauważalny przy niewielkich prędkościach ścinania ($1-10 \text{ s}^{-1}$). Zjawisko to można przypisać procesom, jakim podlegają łańcuchy polimerowe w trakcie ścinania. W stanie spoczynkowym są one ułożone w sposób chaotyczny, natomiast w próbce poddawanej naprężeniu ścinającemu o niewielkiej wartości następuje ich rozplątanie, aż do ułożenia zgodnego z kierunkiem przepływu laminarnego. Ponadto ścinanie wstępne można uznać za moment wyciskania preparatu z pojemnika, natomiast ścinanie właściwe odzwierciedla aplikację (np. rozsmarowywanie na skórze). W przypadku półsta-

łych preparatów hydrofilowych stosowanych na skórę, optymalne wartości naprężenia stycznego osiągnęte przy prędkościach ścinania rzędu $125-275 \text{ s}^{-1}$ powinny mieścić się w zakresie 87-250 Pa. Jest to szczególnie istotne w procesie technologicznym podczas napełniania pojemników, jak również w trakcie późniejszego stosowania przez pacjenta.

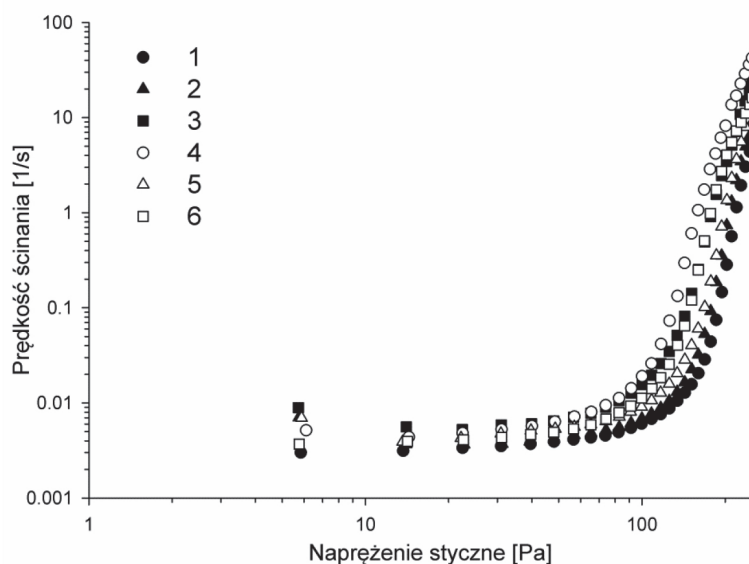
Krzywe płynięcia w trybie kontrolowanej szybkości ścinania oraz kontrolowanego naprężenia

Z analizy przebiegu krzywych płynięcia w trybie kontrolowanej szybkości ścinania (rycina 2) wynika, że badane hydrożele wykazują właściwości typowe dla nienewtonowskich układów pseudoplastycznych. Jak widać największą gęstością odznaczał się hydrożel na bazie czystego PF-127. Natomiast po dodaniu BM następowało wyraźne upłynnienie struktury. Podobny efekt odnotowano w odniesieniu do próbek zawierających Transcutol®, przy czym był on zależny od procentowej zawartości TR. Odwrotne zjawisko miało natomiast miejsce po dodaniu chlorku benzalkoniowego. Powyższe obserwacje zostały również potwierdzone z wykorzystaniem trybu kontrolowanego naprężenia (rycina 3). Ponadto, z zależności lepkości od naprężenia (rycina 4) można wywnioskować, że w badanych układach lepkość początkowo



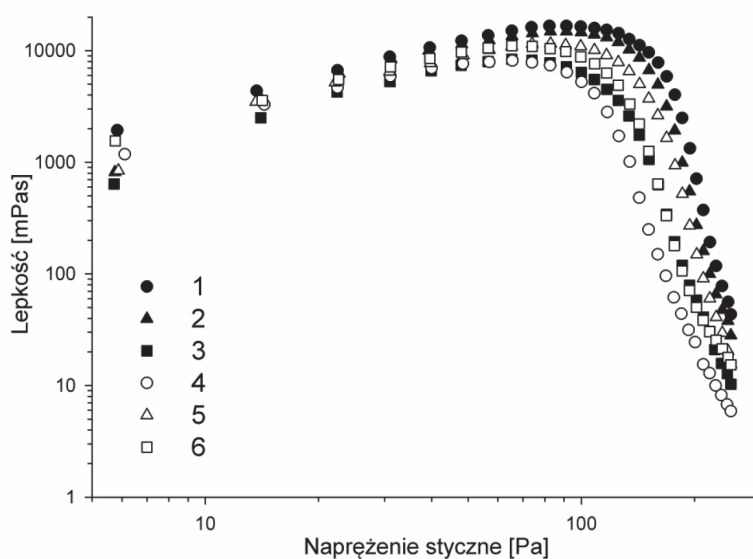
Rycina 2. Krzywe płynięcia hydrożeli

Figure 2. The flow curves plotted for the hydrogels



Rycina 3. Zależność prędkości ścinania od napężenia stycznego

Figure 3. The dependence of the shear rate on the shear stress



Rycina 4. Zależność lepkości od napężenia stycznego

Figure 4. The dependence of the viscosity on the shear stress

wzrastała, co odpowiadało oporowi, jaki działającej sile stawiała przestrzenna sieć polimerowa, natomiast po przekroczeniu pewnej wartości granicznej (granica płynięcia) lepkość gwałtownie spadała, co świadczyło o upłynnieniu żeli w wyniku ścinania (rozrzedzanie).

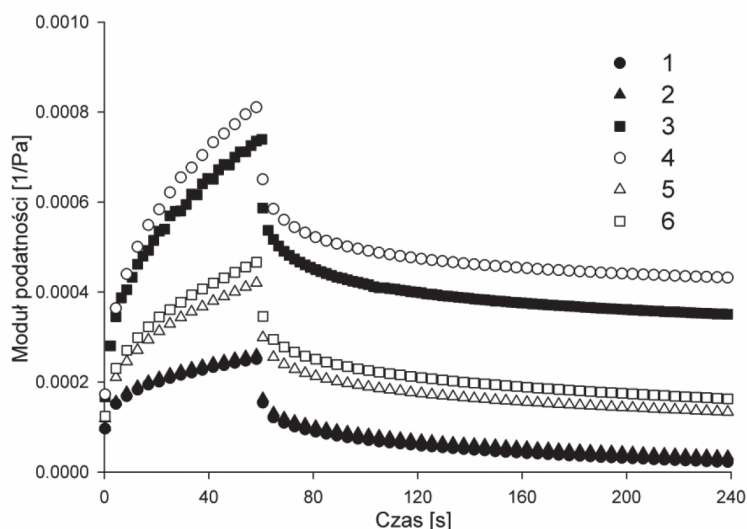
Test pełzania i powrotu sprężystego

Jedną z metod oceny właściwości lepkosprężystych materiałów jest test pełzania i powrotu sprężystego. W pierwszej kolejności analizie poddano początkowe wartości modułu podatności (J_0) zmierzone dla $t = 0$ s. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że elastyczność układu jest odwrotnie proporcjonalna do J_0 [30].

Najwyższe wartości J_0 obserwowano w przypadku próbek zawierających TR w stężeniu 10%. Z przebiegu wykresów pełzania i powrotu (rycina 5) wynika również, że hydrożele zawierające chlorek benzalkoniowy reagują w sposób bardziej sprężysty niż próbki zawierające błękit metylenowy.

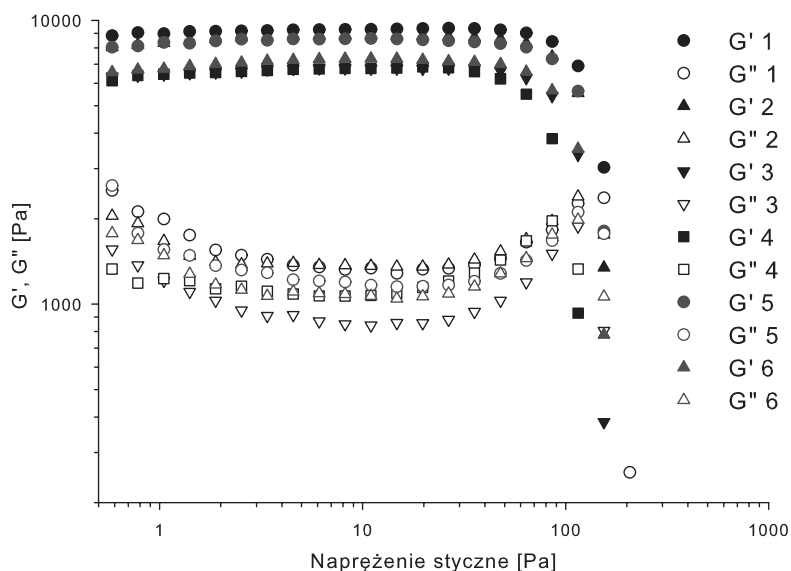
Analiza oscylacyjna

Pierwszym etapem badań była ocena zmian wartości modułów G' oraz G'' przy zmiennym naprężeniu stycznym oraz stałej częstotliwości. Jak przedstawiono na rycinie 6, przy niskich wartościach τ obserwowano nieznaczny wzrost G' oraz spadek G'' . Prawdopodobnie takie zachowanie próbek może być efektem ścinania wstępnego i niecałkowitego powrotu do stanu pierwot-



Rycina 5. Wyniki testów pełzania i powrotu sprężystego

Figure 5. The creep and recovery results



Rycina 6. Wyniki uzyskane przy przemieszczaniu naprężeniem

Figure 6. The stress sweeping results

nego [29]. Następnie wartości obu modułów nie ulegały wyraźnym zmianom aż do ok. 90,0 Pa, po czym następował wyraźny spadek G' oraz wzrost G'' . Przy określonej wartości τ , charakterystycznej dla danej formacji, zachodziło przecięcie obu krzywych, rozumiane jako całkowite zniszczenie struktury. Wartości modułów G' i G'' również świadczą o wyraźnym wpływie TR na spadek sprężystości hydrożeli, przy czym efekt ten jest mniejszy po dodaniu chlorku benzalkoniowego.

Następnie próbki poddawano działaniu zmiennej częstotliwości w zakresie 0,02-14,68 Hz. Jak wynika z ryciny 7, w przypadku każdej z badanych próbek obserwowano wyraźnie przeważające wartości modułu G' nad G'' . Świadczy to o właściwościach sprężystych badanych układów. Jednocześnie podczas przemiatania próbek, w przypadku modułu G'' odnotowano nieznaczny spadek, któremu z kolei towarzyszył przyrost wartości G' . Może to wynikać z oddziaływań pomiędzy łańcuchami polimerowymi, które nasilają się (klinowanie) przy wzroście częstotliwości oscylacji.

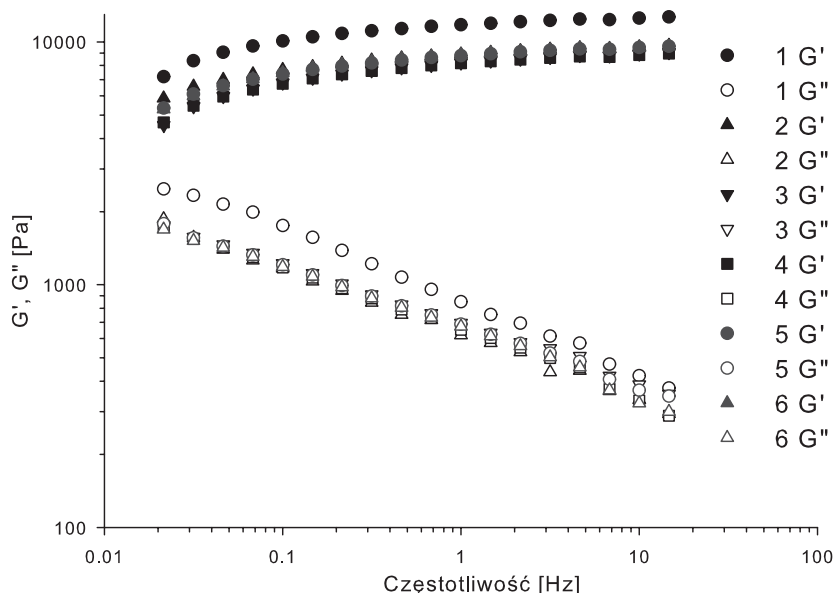
Ocena temperatury żelowania

Jak wspomniano wcześniej, jedną z unikalnych cech poloksamerów jest zdolność do odwrotnego żelowania termicznego, czyli wzrost lepkości przy wzroście temperatury. Test wykonano dla czystego podłoża oraz

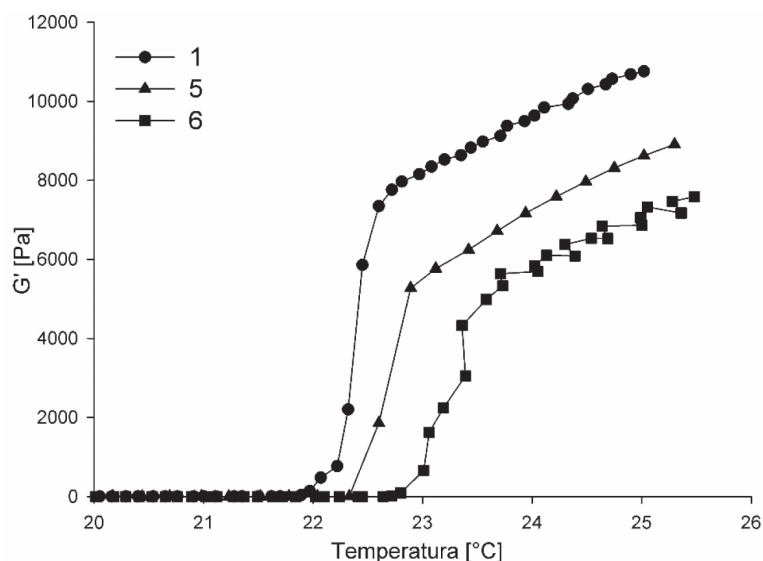
dwóch kompletnych formacji różniących się zawartością Transcutolu[®]. Jak widać na rycinie 8, różnice w temperaturach żelowania mieściły się w zakresie 1°C, przy czym najszybciej zastygał czysty poloksamer, a najpóźniej żel zawierający 10% TR. W przypadku czystego PF-127 powstały żel charakteryzował się również najwyższą sprężystością.

Szybkość utraty składników lotnych

W przypadku preparatów aplikowanych na skórę zjawisko utraty składników lotnych ma istotne znaczenie w odniesieniu do przewidywanej dostępności farmaceutycznej składnika aktywnego, a co za tym idzie, skuteczności leczenia. Głównym efektem jest wyraźny wzrost lepkości podłoża, wpływający na zmniejszenie szybkości dyfuzji substancji aktywnej do kompartmentu zewnętrznego. Badane hydrożele przechowywano w cieplarni w temperaturze charakterystycznej dla skóry ludzkiej 32°C. W odpowiednich odstępach czasu ważono próbki i obliczano procentowy spadek masy. Jak wynika z ryciny 9, po 5 h obserwowano ubytek masy w zakresie 60-70% od wartości początkowej. Nie odnotowano jednak wyraźnych zależności wynikających z różnic w składzie badanych formacji. Należy jednocześnie zauważyć, że czas wymagany do absorpcji fotouczulaczy podczas PDT

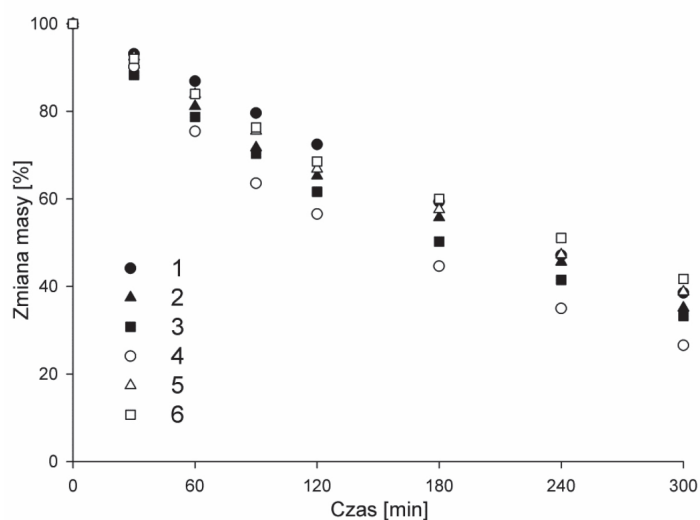


Rycina 7. Wyniki uzyskane przy przemiataniu częstotliwością
Figure 7. The frequency sweeping results



Rycina 8. Przemiatanie temperaturowe żeli w warunkach stałej oscylacji

Figure 8. Temperature sweeping of the gels under constant oscillation



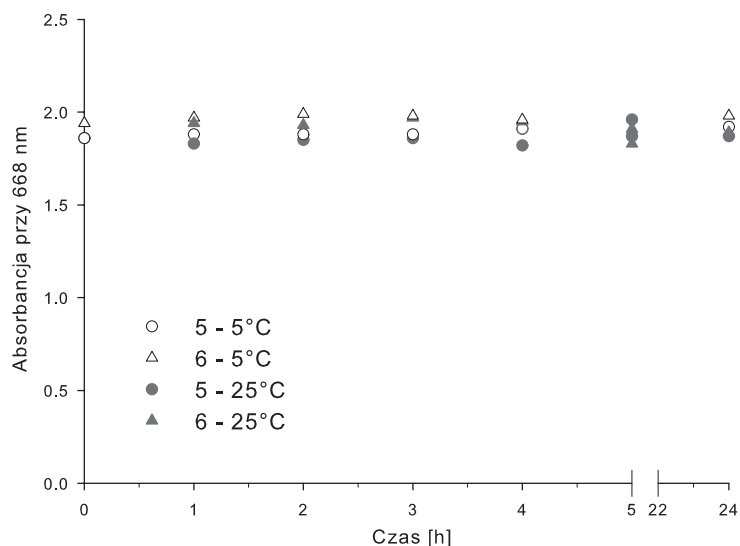
Rycina 9. Procentowa zmiana masy żeli w wyniku ubytku składników lotnych

Figure 9. The percent mass change of the gels as a result of the loss of volatile ingredients

może sięgać kilku godzin. Dlatego też w przypadku podłoży hydrożelowych należałoby rozważyć zastosowanie polimerowych opatrunków okluzyjnych ograniczających utratę składników lotnych podczas terapii. Warto również zwrócić uwagę na dobór substancji pomocniczych i uwzględnić możliwość odparowania składników lotnych oraz zmiany właściwości preparatu w czasie aplikacji.

Trwałość fotouczulaczy w warunkach przechowywania

Ocena trwałości substancji aktywnych (API, *ang. Active Pharmaceutical Ingredient*) obecnych w preparatach farmaceutycznych to ważny aspekt w zakresie oceny ich przydatności w terapii. Brak tendencji API do rozkładu warunkuje skuteczność oraz bezpieczeństwo podczas stosowania danego leku. Wstępna ocena sta-



Rycina 10. Zmiany absorbancji przy $\lambda=668$ nm wyznaczone dla żeli 5 oraz 6 podczas przechowywania w temp. $5,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ oraz $25,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$

Figure 10. The changes of the absorbance at $\lambda=668$ nm determined for the gels 5 and 6 during storage at $5,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$ and $25,0\pm0,5^{\circ}\text{C}$

bilności umożliwia podjęcie stosownych kroków już na początku procedury badawczej odnośnie zmiany składu lub ewentualnego wyeliminowania danej formacji. W pracy przeprowadzono ocenę trwałości błękitu metylenowego obecnego w hydrożelach. Próbkę przechowywano bez dostępu światła, w temperaturze $4-5^{\circ}\text{C}$ oraz 25°C . W pierwszym przypadku formacja posiadała konsystencję płynną, natomiast w drugim półstałą. Jak widać na rycinie 10 podczas 24 h trwania eksperymentu nie odnotowano tendencji do zmian absorbancji.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że badane hydrożele na bazie poloksameru 407 to układy nienewtonowskie, przejawiające właściwości pseudoplastyczne. Obecność chlorku benzalkoniowego wpływa na usztywnienie struktury hydrożeli, natomiast dodatek fotouczulacza wpływa na upłynnienie podłoża, a obecność Transcutolu® obniża granicę płynięcia badanych hydrożeli. Barwniki fotouczulające obecne w badanych hydrożelach nie wykazują tendencji do degradacji podczas przechowywania w temp. 4°C oraz 25°C .

Finansowanie

Badania były częściowo finansowane ze środków Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (UMP) na utrzymanie potencjału naukowego nr 502-01-03314429-03439 oraz z grantu UMP dla młodych pracowników nauki nr 502-14-03314429-09983.

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji:

✉ Tomasz Osmałek

Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Grunwaldzka 6; 60-780 Poznań

☎ (+48 61) 854 66 61

💻 tosmalek@ump.edu.pl

Piśmiennictwo

1. Equality for Patients with Cancer and Other Chronic Diseases in Europe, 13 November 2012 – Association of European Cancer Leagues (ECL). <http://www.europeancancerleagues.org/mac/mac-events/306-equality-meeting-summary.html>. (Accessed September 7, 2017).
2. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2012;166(5):1069-80.
3. de Vries E, Willem Coebergh J. Cutaneous malignant melanoma in Europe. *Eur J Cancer*. 2004;40(16):2355-66.
4. Sharquie KE, Noaimi AA. Basal cell carcinoma: Topical therapy versus surgical treatment. *J Saudi Soc Dermatology Dermatologic Surg*. 2012;16(2):41-51.
5. Joo WD, Visintin I, Mor G. Targeted cancer therapy – Are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas*. 2013;76(4):308-14.
6. Yano S, Hirohara S, Obata M, et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev*. 2011;12(1):46-67.
7. Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*. 2008;53(9):R61-R109.
8. Roelandts R. The history of phototherapy: Something new under the sun? *J Am Acad Dermatol*. 2002;46(6):926-30.
9. Ackroyd R, Keltly C, Brown N, et al. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol*. 2001;74(5):656-69.
10. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, et al. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn Photodyn*. 2004;1(1):27-42.
11. DeRosa M. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev*. 2002;233-234:351-71.
12. Donnelly RF, McCarron PA, Morrow DI, et al. Photosensitizer delivery for photodynamic therapy. Part 1: Topical carrier platforms. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008;5(7):757-66.
13. van Hemelrijck C, Müller-Goymann CC. Rheological characterization and permeation behavior of poloxamer 407-based systems containing 5-aminolevulinic acid for potential application in photodynamic therapy. *Int J Pharm*. 2012;437(1-2):120-9.
14. Dragicevic-Curic N, Winter S, Stupar M, et al. Temoporfin-loaded liposomal gels: Viscoelastic properties and in vitro skin penetration. *Int J Pharm*. 2009;373(1-2):77-84.
15. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagn Photodyn*. 2010;7(2):61-75.
16. Sieroń A, Kwiatek S. Twenty years of experience with PDD and PDT in Poland – Review. *Photodiagn Photodyn*. 2009;6(2):73-8.
17. Trukhachova T, Shliakhtsin S, Cerkovsky D. A novel finished formulation of the photosensitizer Photolon® for topical application. Evaluation of the efficacy in patients with basal-cell carcinoma of the skin. *Photodiagn Photodyn*. 2011;8(2):200-1.
18. Pluta J. KB. Hydrogels: properties and application in the technology of drug form. II. Possibilities of use of hydrogels as active substance carriers. *Polim Med*. 2004;34(3):2-41.
19. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, et al. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci*. 2006;9(3):339-58.
20. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, et al. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharm Res*. 2006;23(12):2709-28.
21. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagn Photodyn*. 2005;2(3):175-191.
22. Orth K, Beck G, Genze F, et al. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2000;57(2-3):186-92.
23. Link EM, Blower PJ, Costa DC, et al. Early detection of melanoma metastases with radioiodinated methylene blue. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 1998;25(9):1322-9.
24. Link EM, Michalowski AS, Rösch F. 211At-methylene blue for targeted radiotherapy of disseminated melanoma: microscopic analysis of tumour versus normal tissue damage. *Eur J Cancer*. 1996;32(11):1986-94.
25. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagn Photodyn*. 2005;2(3):175-91.
26. Moore T, Croy S, Mallapragada S, et al. Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic® F127 gel dissolution: drug release in stirred systems. *J Control Release*. 2000;67(2-3):191-202.
27. Osmałek T, Froelich A, Kapela M. Przegląd wybranych zastosowań poloksameru 407 w technologii farmaceutycznej i medycynie. *Farm Pol*. 2014;70(7):400-10.
28. Kick G, Messer G, Plewig G. Historische Entwicklung der Photodynamischen Therapie. *Der Hautarzt*. 1996;47(8):644-9.
29. Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42(3):389-413.
30. Yan C, Pochan DJ. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. *Chem Soc Rev*. 2010;39(9):3528-40.