

Badania *in vitro* właściwości termowrażliwych układów otrzymanych na bazie Pluronicu F-127, jako nośników metotreksatu podawanego w postaci iniekcji do litego guza nowotworowego

JANUSZ PLUTA, BOŻENA KAROLEWICZ

Instytut Farmacji Stosowanej, Zakład Farmacji Aptecznej we Wrocławiu

Streszczenie

Celem pracy było uzyskanie termowrażliwego nośnika metotreksatu, który po wstrzyknięciu do litego guza nowotworowego tworzyłby *in situ* swoisty implant, uwalniający lek w miejscu aplikacji. W badaniach użyto Pluronicu F-127 z dodatkiem wybranych substancji pomocniczych tj. laktozy, glukozy, glikolu propylenowego, glicerolu i difosforanu sodowego. Badano temperaturę przejścia fazowego zol-żel uzyskanych układów przy wzrastającej temperaturze i różnej szybkości ścinania, oraz ich właściwości fizykochemiczne. Wszystkie otrzymane układy charakteryzowały się przejściem fazowym zol-żel w zakresie fizjologicznej temperatury ciała.

Uwalnianie metotreksatu z wybranych formułacji przebiegało w oparciu o kinetykę zbliżoną do zerowego rzędu, a badania wykazały, iż wykorzystanie Pluronicu F-127 w stężeniu 14,8% do konstruowania nośników leku pozwala - w zależności od zastosowanych substancji pomocniczych i ich stężenia - na uzyskanie takiej postaci, z której substancja lecznicza może być uwalniana w różnym czasie. Analiza właściwości fizykochemicznych tj. pH, ciśnienia osmotycznego, gęstości badanych formułacji

pozwała sądzić, iż ich podanie cienką igłą nie powinno stwarzać problemów, a po aplikacji nie będą drażnić tkanek i powodować bólu.

Słowa kluczowe: temperatura przejścia zol-żel, wstrzyknięcie do guza, metotreksat

WSTĘP

Pomimo przestrzegania określonych zasad leczenia, chemioterapia ogólnoustrojowa nowotworów nie przynosi zadowalających efektów terapeutycznych. Badania wskazują, iż jest to metoda mało skuteczna w terapii guzów litych tj. guzy głowy, wątroby, płuc, piersi, jelit i prostaty [1, 2]. Systemowa administracja cytostatyku jest przyczyną obniżenia odporności organizmu, wystąpienia wtórnej onkogenności i mutagenności, a co się z tym wiąże zmian dziedzicznych w genotypie komórki [3, 4]. Możliwa jest również utrata skuteczności działania leków ze względu na powstałą chemiooporność komórek nowotworowych. Zjawisko oporności charakteryzujące większość guzów litych powoduje, iż operacja chirurgiczna uznawana jest za radykalną metodę z wyboru w leczeniu tych nowotworów. Zabieg usunięcia guza stosuje się jednak wyłącznie w przypadkach choroby ograniczonej i tylko u pacjentów w odpowiednio dobrym stanie ogólnym. Nie rozwiązany problemem pozostają zatem zmiany nieoperacyjne, choroby z gruntu uznawane za niesystemowe lub te, które nie poddały się leczeniu pierwszorazowemu [5-7]. Perspektywę radykalnego leczenia guzów litych - oprócz interwencji chirurgicznej - daje także radioterapia. Wykorzystanie tej metody leczenia ogranicza jednak brak wrażliwości wielu nowotworów na promieniowanie i niska tolerancja na radiację tkanek otaczających guz [8].

Najważniejszą przyczyną niskiej efektywności chemioterapii systemowej nowotworów jest skomplikowana biologia guza. Brak naczyń limfatycznych, niski i zmienny przepływ krwi w obrębie zmienionej patologicznie tkanki oraz panujące wewnątrz podniesione ciśnienie, ogranicza w znacznym stopniu „dowóz” leku do guza [1, 3, 9]. Podanie cytostatyku bezpośrednio do miejsca jego działania, pozwala na uzyskanie lepszej dystrybucji leku w obrębie chorej tkanki i redukcję działań niepożądanych. Ograniczenie lub zanik efektów ubocznych po lokalnej administracji chemioterapeutyku ma duże znaczenie, zwłaszcza dla substancji takich jak metotreksat, wymagających po podaniu ogólnym monitorowania stężenia we krwi [10]. Dodatkową korzyścią kliniczną terapii miejscowej jest zmniejszenie interakcji z innymi, podawanymi pacjentowi w chorobach towarzyszących lekami. Modyfikacje postaci leku bez ingerencji w strukturę chemiczną substancji leczniczej, dają w opisanych przypadkach możliwość otrzymania zamierzonego efektu farmakologicznego i pozwalają sprostać wymaganiom skutecznej terapii.

Celem pracy była ocena właściwości fizykochemicznych formuacji sporządzonych na bazie termowrażliwego polimeru, z zamiarem ich zastosowania w postaci iniekcji do litego guza nowotworowego. Taka forma leku może być podawana jako implant, z którego substancja lecznicza uwalniałaby się powoli w miejscu aplikacji. Proponowany sposób postępowania terapeutycznego ma duże szanse na wykorzystanie w leczeniu guzów niechirurgicznych ze względu na umiejscowienie tj. guzy wątroby, trzustki, jajników, skóry, piersi, mózgu, płuc, guzy położone w okolicy tchawicy oraz w przypadku, gdy możliwości operacji ogranicza naciekanie nowotworowe kilku sąsiednich narządów. Podanie leku w układach o właściwościach termowrażliwych, umożliwia uzyskanie nośnika substancji leczniczej aplikowanego w formie roztworu, który w temperaturze fizjologicznej, *in situ* będzie formował żel. Taka właściwość układu nie

utrudniałaby jego aplikacji cienką igłą, stosowaną do iniekcji głębokich i nie powodowałaby bolesności przy podaniu.

Wykorzystany do otrzymania badanych formułacji Pluronic F-127 jest biokompatybilnym, ulegającym bioerozji w organizmie polimerem. W technologii postaci leku był stosowany jako parenteralny nośnik białek, antybiotyków i leków znieczulających, jako polimer tworzący żele podawane donosowo i aplikowane na gałkę oczną oraz jako stabilizator zawiesin, substancja zagęszczająca, emulgator i środek wiążący wilgoć w żelach, emulsjach i podłożach maściowych [11-15]. Kabanov i współpracownicy opisali nowe zastosowania tego blokowego kopolimeru w leczeniu opornych na wielolekową terapię guzów (multidrug-resistant cancer MDR). Polimer oddziałuje z komórkami tych nowotworów, powodując ich uwrażliwienie na różne chemioterapeutyki poprzez wpływ na kilka odrębnych mechanizmów oporności. Przede wszystkim przez hamowanie dowozu i wychwytu chemioterapeutyku w kwaśnym podłożu, oraz poprzez hamowanie systemu detoksykacji glutation S-transferazy, która bierze udział w degradacji i usuwaniu leku. Wszystkie opisane mechanizmy oporności leku są energozależne, a za potencjalną przyczynę uwrażliwienia komórek nowotworu na chemioterapię uważa się wyczerpanie ATP, indukowane przez blokowy kopolimer w komórkach MDR [16].

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań

Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich Company Ltd, USA); D(+)-Glukoza (Fluka); D(+)-Laktoza (Fluka); 1,2-glikol propylenowy (POCh, Gliwice, Polska); Glicerol 85% (Fluka);

Chlorek benzalkoniowy (Fluka); difosforan sodowy (Riedel-de Haean); Metotreksat 10mg/ml (EBWE). Roztwór kalibracyjny o ciśnieniu osmotycznym 0 mOsm/l i 400 mOsm/l (MCF); Benzoesan estradiolu (Jelfa, Jelenia Góra, Poland). Woda podwójnie destylowana spełniająca wymagania Farmakopei Polskiej VI [17].

METODY

Technologia przygotowywania układów termowrażliwych

Płynne formułacje zawierające Pluronic F-127, sporządzano na zimno techniką opisaną przez Schmolka w komorze z nawiewem laminarnym Lamil (Karstulan Metalli OY, Finlandia) [18]. Wszystkie substancje pomocnicze, tj. glukoza, laktoza, glicerol, glikol propylenowy, difosforan sodowy oraz chlorek benzalkoniowy - jako środek konserwujący i metotreksat dodawano stopniowo do dejonizowanej, wyjałowionej uprzednio w autoklawie wody o temp. ok. 15°C. Po rozpuszczeniu substancji pomocniczych, do roztworu wprowadzano stopniowo polimer i mieszano. Po wymieszaniu układ sączone przez sączki membranowe apirogenne Arcodisc[®] Syringe Filter (Pall Gelman Laboratory) do jałowych fiolek. Gotowe formułacje były przechowywane w lodówce i badane po upływie 72h. Skład otrzymanych układów podano w tabeli 1. Do badań wstępnych wpływu czasu ścinania i różnej szybkości ścinania na zmiany lepkości formułacji, wykorzystano układy otrzymane na bazie 14,8% i 15,0% Pluronicu F-127 bez dodatku substancji pomocniczych.

Wyznaczanie pH

Pomiar wartości odczynu pH wykonano przy użyciu wielofunkcyjnego przyrządu komputerowego Elmetron CX-742 do pomiaru pH, z elektrodą zespoloną typu OSH 10-

10 (EuroSensor, Gliwice), w temperaturze $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Dla każdej formulacji wykonano sześć pomiarów i obliczono średnią wartość pH.

Pomiar gęstości otrzymanych układów

Pomiar gęstości sporządzonych formulacji wykonano dla danej formulacji wg metody podanej w FPVI, w piknometrze o pojemności 10ml z termometrem i płaszczem powietrznym, w temp. 20°C [17]. Gęstość obliczono ze wzoru:

$$d_{20} = m/w \times 0,997 + 0,0012 \text{ [g/ml]}$$

gdzie:

d_{20} - gęstość w temperaturze 20°C w g/ml; m - masa badanej formulacji oznaczona w temperaturze 20°C w g; w - masa tej samej objętości wody oznaczona w powietrzu w temp. 20°C w g; 0,997 - gęstość wody w temp. 20°C ; 0,0012 - poprawka na ważenie w powietrzu

Każdą formulację ważono sześciokrotnie na wadze analitycznej Sartorius z dokładnością do 0,001 g i obliczono średnią wartość gęstości.

Pomiar osmolarności

Badania wstępne osmolarności formulacji, wykonano przy wykorzystaniu osmometru INTECH, 020-AT dla układów nie zawierających metotreksatu. Poszczególne formulacje umieszczano w aparacie i doprowadzano do stanu przechłodzenia. Obniżenie temperatury powodowało krzepnięcie wody, a uwalniane ciepło topnienia podnosiło temperaturę roztworu do temperatury zamarzania. Przed rozpoczęciem pomiarów aparat skalowano przy użyciu wzorcowych roztworów o określonym, znanym ciśnieniu osmotycznym. Do badań pobierano 100 μl układu. Zmierzoną wartość ciśnienia odczytywano ze skali

aparatu w mOsm/l. Pomiar ciśnienia osmotycznego powtarzano sześciokrotnie dla każdej formuacji i obliczono średnią wartość ciśnienia dla wszystkich układów.

Pomiar transmitancji

Transmitancja (T) wyrażana w procentach, określa stosunek natężenia promieniowania monochromatycznego o określonej długości fali (I), przechodzącego przez próbkę do natężenia promieniowania padającego (I_0). Badanie przeprowadzono w kuwetach kwarcowych w spektrofotometrze UV/VIS Cecil Instruments-Chemist-Handel (M. B. H., Austria) przy długości fali 520 nm wobec wody [17], dla której transmitancja wynosiła 100%.

Badania reologiczne formuacji

Badanie wpływu czasu ścinania, szybkości ścinania i stężenia metotreksatu, na zmiany lepkości i temperatury przejścia fazowego formuacji sporządzonych na bazie Pluronicu F-127

Pomiar lepkości strukturalnej sporządzonych układów wykonano przy użyciu reometru Brookfield typu DV-III połączonego z ultratermostatem, z wykorzystaniem stożka o symbolu CP-51, o zakresie lepkości 20,48 do 512 000 mPs.s. Przy szybkości ścinania 10 i 100 s⁻¹, badano w stałej temp. 20 i 30°C wpływ czasu ścinania na zmiany lepkości formuacji zawierającej 15% Pluronic F-127. Badano również wpływ zmian stężenia metotreksatu i różnej szybkości ścinania na temperaturę przejścia fazowego, układów zawierających 14,8% Pluronic F-127.

Oznaczanie temperatury przejścia fazowego zol-żel uzyskanych układów na podstawie pomiaru zmian lepkości

Badania temperatury przejścia fazowego zol-żel wykonano przy wykorzystaniu reometru Brookfield typu DV-III. Pomiary powtarzano trzykrotnie dla każdej formułacji przy wzrastającej o $0,2^{\circ}\text{C}/5\text{ s}$ temperaturze w granicach od 20°C do 40°C , przy stałej szybkości ścinania wynoszącej 1, 10 i 100 s^{-1} . W takich samych warunkach, przy 100 s^{-1} , wykonywano pomiary zmian lepkości przy wzrastającej temperaturze dla preparatu o zwiększonej lepkości do wstrzyknięć domięśniowych, którym był olejowy roztwór benzoesanu estradiolu.

Uwalnianie metotreksatu z wybranych formułacji do wody w komorach przepływowych

Do badania kinetyki uwalniania jako substancję modelową wybrano metotreksat, stosowany obecnie w terapii wielu chorób nowotworowych. Błone półprzepuszczalną do uwalniania Membra-Cel[®] Dialysis Tubing o wielkości por 3500 Da, przed przystąpieniem do badań zanurzono na 30 minut w wodzie podwójnie destylowanej. Odważone z dokładnością do około 0,001 g formułacje zawierające 0,01% metotreksatu, wprowadzono za pomocą strzykawki do komory do uwalniania substancji czynnej, konstrukcji Z. Olszewskiego i A. Kubisa, podzielonej błoną półprzepuszczalną, zanurzonej w łaźni wodnej o temp. 37°C . Płyn dializacyjny pobierano w ilości 1ml po 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 i 240 minutach. Próbkę pobraną uzupełniono do 3ml wodą podwójnie destylowaną. Ilość uwolnionej substancji leczniczej oznaczono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem UV/VIS spektrofometru Cecil Instruments-Chemist-Handel (M. B. H. Austria), w kuwetach kwarcowych o grubości warstwy 1cm, wobec odnośnika, którym była woda podwójnie destylowana.

Pomiary wykonano sześciokrotnie i obliczono średni wynik. Dane opracowano w programie komputerowym STATISTICA Version 5,97', metodą najmniejszych kwadratów przy poziomie ufności $p = 0,05$. Korzystając z równań farmakokinetycznych obliczono stałą szybkości uwalniania (K) oraz okres połowicznego uwalniania ($t_{0,5}$). Istotność relacji między ilością uwolnionego metotrekastu z poszczególnych formułacji poddawano ocenie statystycznej, przy wykorzystaniu analizy jednoczynnikowej ANOVA/MANOVA testem post hoc NIR.

WYNIKI

Ocenie poddano jedenaście formułacji, sporządzonych na bazie Pluronicu F-127 z dodatkiem wybranych substancji pomocniczych. Uzyskano przezroczyste, bezbarwne układy o konsystencji płynnej w temperaturze pokojowej. Doprowadzenie pozajelitowo podawanego leku do izohydrii jest konieczne ze względu na możliwość wystąpienia podczas iniekcji objawów niepożądanych, tj. bolesność czy zapalenie tkanek. Postacie leków przeznaczone do podania parenteralnego wg FP VI, powinny posiadać odczyn pH zbliżony do fizjologicznej wartości odczynu płynów ustrojowych w zakresie 7,2–7,6 [17].

Przyjmuje się za dopuszczalne odstępstwo od przyjętej wartości odczynu w granicach pH 6,5–7,8 przy krótkotrwałym podawaniu leku. Wyniki pomiarów pH dla uzyskanych formułacji przedstawiono w tabeli 2. Przygotowane formułacje charakteryzowały się odczynem pH zbliżonym do wartości fizjologicznej. Odczyn pH układów zawierających 1% dodatek glukozy (A, A1), laktozy (B, B1), glicerolu (C, C1) i glikolu propylenowego (D, D1), mieścił się w granicach fizjologicznej wartości odczynu płynów ustrojowych. Największe odstępstwa od wymaganych wartości odczynu pH, w przedziale 8,255–8,891, posiadały układy otrzymane na bazie 14,8% Pluronicu F-127 z dodatkiem 0,2%

difosforanu sodowego (E, E1). Układy te podane pozajelitowo mogą powodować podrażnienie tkanek po aplikacji.

Pomiary gęstości wykonywano dla każdej formułacji sześciokrotnie w piknometrze w temp. 20°C. Średnie wartości gęstości układów w g/ml podano w tabeli 2. Przygotowane formułacje w zależności od składu cechowały się różną gęstością. Największą gęstość posiadały układy otrzymane z wykorzystaniem 0,2% roztworu difosforanu sodu oraz 1% laktozy. Układy sporządzone na bazie 14,8% Pluronicu F-127 z dodatkiem 1% roztworu glikolu propylenowego, charakteryzowały się najmniejszą gęstością, w granicach 1,0179 g/ml dla układów bez metotreksatu (D) i 1,0174 g/ml dla formułacji z metotreksatem (D1). Gęstość badanych formułacji była większa w stosunku do olejowego roztworu benzoesu estradiolu do wstrzyknięć domięśniowych, dla którego wartość oznaczona w temp. 20°C wynosiła 0,9625 g/ml.

Według FP VI postaci leku przeznaczone do wstrzyknięć, aby nie powodowały podrażnienia tkanek po podaniu, powinny posiadać ciśnienie osmotyczne w granicach 280-320 mOsm/l. Wyniki pomiarów ciśnienia dla układów oznaczonych jako 0, A, B, C, D, E, nie zawierających metotreksatu przedstawiono na rycinie 1. Ciśnienie osmotyczne uzyskanych formułacji mieściło się w zakresie wymaganych dla pozajelitowej aplikacji minimalnych wartości. Wprowadzone do układu sporządzonego na bazie 14,8% Pluronicu z dodatkiem 0,01% chlorku benzalkoniowego substancje pomocnicze, umożliwiły otrzymanie izotonicznych lub słabo hipertonicznych formułacji, które po aplikacji nie powinny drażnić tkanek.

Pomiar transmitancji określa klarowność, a pośrednio również stopień rozproszenia uzyskanych układów. Wyniki oznaczenia transmitancji dla otrzymanych formułacji podano w tabeli 2. Wyznaczone wartości transmitancji w granicach 95-100%,

świadczą o dużej klarowności formulacji i pośrednio o dużym stopniu rozproszenia substancji pomocniczych w otrzymanym układzie.

Badając zależność zmian lepkości od temperatury dla sporządzonych formulacji wykazano, iż wszystkie układy cechują się przemianą fazową zol-żel, zachodzącą przy wzroście temperatury. Udowodniono, iż przemiana ta przy wybranych szybkościach ścinania 10 i 100 s⁻¹, dla układu uzyskanego na bazie 14,8% Pluronicu F-127, miała miejsce przy tych samych wartościach temperatury. Wyniki pomiaru zmian lepkości przy szybkości ścinania 10 i 100 s⁻¹ i przy wzrastającej o 0,2°C/5 s temperaturze, dla formulacji zawierającej 14,8% stężenia Pluronicu F-127 zaprezentowano na rycinie 2. W celu wykluczenia udziału czasu ścinania w przemianach fazowych, w stałej temp. 20 i 30°C i przy stałej szybkości ścinania 10 i 100 s⁻¹, rejestrowano zmiany lepkości w czasie dla układu otrzymanego na bazie 15% Pluronicu F-127. Badania przedstawione na rycinie 3 pokazują, iż w tej samej temperaturze czas wykonywanych pomiarów nie miał wpływu na zmiany lepkości formulacji.

W dalszej części pracy analizowano również wpływ na temperaturę przejścia fazowego różnych stężeń metotreksatu. Nie zaobserwowano różnic w lepkości przy wzroście temperatury pomiędzy formulacjami zawierającymi 14,8% Pluronic F-127 i metotreksatu w stężeniu 0,01 i 0,1%. W porównaniu do wymienionych układów, formulacja zawierająca 0,5% stężenie metotreksatu badana w tych samych warunkach, charakteryzowała się temperaturą przejścia fazowego wyższą o 1-2°C, przy jednocześnie niższej lepkości układu. Wyniki pomiarów przedstawiono na rycinie 4.

Formulacje otrzymane bez substancji leczniczej charakteryzowały się przemianą fazową w podobnym zakresie temperatur, ok. 33-35°C. Wprowadzenie do tych układów metotreksatu powodowało spadek ich lepkości, przy jednoczesnym przesunięciu temperatury przejścia fazowego o ok. 2-3°C w stronę temperatury fizjologicznej ciała.

Wyniki pomiaru zmian lepkości przy wzrastającej temperaturze przedstawiono na rycinach 5-7.

Największą lepkość posiadały formułacje otrzymane na bazie 14,8% Pluronicu F-127 i 0,01% chlorku benzalkoniowego z 1% dodatkiem laktozy i glukozy. Temperatura przejścia fazowego tych układów po wprowadzeniu metotreksatu, mieściła się w granicach fizjologicznej temperatury ciała 36-37°C. Chcąc w pełni oszacować przydatność farmaceutyczną otrzymanych formułacji dokonano pomiaru zmian lepkości dla obecnego na rynku preparatu - olejowego roztworu benzoesanu estradiolu o zwiększonej lepkości - wstrzykiwanego domięśniowo. Preparat ten w temp. 20°C przy szybkości ścinania 100 s^{-1} posiadał lepkość dynamiczną wynoszącą 65 mPa.s, zaś w temp. 25°C - 55 mPa.s. Badane formułacje w zależności od składu, w temp. 20°C posiadały lepkość dynamiczną w granicach 17,9-27,8 mPa.s i odpowiednio w temp. 25°C w zakresie 39,8-67,6 mPa.s.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż lepkość otrzymanych układów nie odbiega od wartości wyznaczonych dla wybranego preparatu o zwiększonej lepkości. Nie powinna zatem sprawiać trudności przy podawaniu w temperaturze pokojowej płynnych formułacji w iniekcji bezpośredniej do guza nowotworowego. Wynik pomiaru zmian lepkości przy wzrastającej temperaturze i przy szybkości ścinania 100 s^{-1} dla preparatu porównawczego przedstawiono na rycinie 3.

Uwalnianie metotreksatu z otrzymanych podłoży charakteryzujących się przemianą fazową żół-żel pod wpływem wzrostu temperatury, prowadzono przez 4 godziny w temp. 37°C. Kolejne frakcje pobierano w 30 minutowych odstępach. Dla każdej formułacji wykonano po sześć pomiarów i obliczono średni procent uwolnionej substancji. Przebieg procesu uwalniania metotreksatu przedstawiono na rycinie 8. Analizując dane pomiarowe porównywano współczynniki korelacji R dla danych

empirycznych w skali liniowej i półlogarytmicznej. Otrzymane wartości tych współczynników przy poziomie istotności $p < 0,05$ dla wybranych układów, świadczą o wysokim dopasowaniu danych doświadczalnych do liniowej funkcji zmian procentu pozostałości (100 - % uwolniony metotreksat) metotreksatu w badanych układach od czasu trwania procesu uwalniania. Dokonując dokładnej analizy zależności funkcyjnej procentu pozostałości uwolnionego metotreksatu w czasie, w układzie liniowym i półlogarytmicznym w oparciu o współczynniki korelacji R^2 stwierdzono, iż proces uwalniania metotreksatu z formułacji D1 i E1 można opisać w oparciu o model kinetyki pierwszego rzędu. Uwalnianie metotreksatu z formułacji A1, B1, C1 zawierających dodatek odpowiednio 1% glukozy, 1% laktozy i 1% glicerolu, przebiega z kinetyką zbliżoną do zerowego rzędu. Korzystając z odpowiednich równań farmakokinetycznych, obliczono stałe szybkości uwalniania i czasy półuwalniania. Wyniki obliczeń umieszczono w tabeli 3.

Interpretując uzyskane dane stwierdzono, iż największą dostępnością farmaceutyczną charakteryzował się układ sporządzony na bazie 14,8% Pluronicu z dodatkiem 0.2% difosforanu sodowego. Istotność relacji między całkowitym procentem uwolnionego metotreksatu z poszczególnych formułacji, oceniana statystycznie przy wykorzystaniu analizy jednoczynnikowej ANOVA/MANOVA testem post hoc NIR, potwierdziła znamienne statystycznie różnice w procencie uwolnionego metotreksatu z poszczególnych formułacji. W tabeli 4 podano poziomy istotności otrzymanych wyników dla testu post hoc NiR. Najdłuższy czas półuwalniania ($t_{0,5}$) 22,04 h odnotowano dla formułacji przygotowanej z dodatkiem 1% laktozy. Badania wykazały, iż wykorzystanie 14,8% stężenia Pluronicu F-127 do konstruowania nośników leku, umożliwia w zależności od zastosowanych substancji pomocniczych uzyskanie takiej postaci, z której substancja może być uwalniana w różnym czasie (tabela 3 i 4, rycina 8)

WNIOSKI

1. Wyniki przeprowadzonych *in vitro* badań pozwalają sądzić, iż sporządzone układy charakteryzujące się przemianą fazową zol-żel, pod wpływem wzrostu temperatury mogą być wykorzystane jako nośniki substancji leczniczej podawanej w iniekcji bezpośredniej do guza nowotworowego. Przejście fazowe otrzymanych formułacji w zakresie fizjologicznej temperatury ciała umożliwi ich wstrzyknięcie w formie płynnej i przejście *in situ* w postać żelu, zapewniając przedłużone uwalnianie substancji leczniczej w miejscu aplikacji. Lepkość otrzymanych formułacji nie odbiegała od wartości wyznaczonej dla wybranego, obecnego na rynku preparatu podawanego domięśniowo o zwiększonej lepkości i nie powinna stanowić trudności podczas aplikacji.

2. Przeprowadzone badania wykazały, iż wykorzystanie 14,8% stężenia Pluronicu F-127 z dodatkiem wybranych substancji pomocniczych jako termowrażliwego nośnika leku, pozwala na uzyskanie układów o różnym czasie półuwalniania substancji.

3. Z analizy uzyskanych danych pomiarowych wynika, iż najlepsze właściwości fizyko-chemiczne posiadała formułacja sporządzona na bazie Pluronicu F-127 i chlorku benzalkoniowego z dodatkiem 1% laktozy. Uwalnianie metotreksatu z tego układu przebiegało z kinetyką zbliżoną do zerowego rzędu, a wyznaczony czas półuwalniania substancji leczniczej ($t_{0,5}$) z tej formułacji przemawia za jego wykorzystaniem do konstruowania postaci leku o przedłużonym działaniu.

