

7 Mucoadhäsion

7.1 Definition und Erläuterung zur Mucoadhäsion

Der Begriff Bioadhäsion beschreibt ein Phänomen, bei dem synthetische oder biologische Makromoleküle in der Lage sind an biologischem Gewebe zu haften [Hassan und Gallo, 1990; Peppas und Buri, 1985; Peppas und Sahlin, 1996; Harding et al., 1999].

Allen Bioadhäsionsvorgängen ist gemeinsam, dass sie in wässrigen Systemen stattfinden, bzw. in Gegenwart von Wasser. Bioadhäsive Systeme sind schon viele Jahre bekannt, z. B. in der Zahnmedizin verwendete Haftsysteeme, im Bereich der Stomaversorgung, Wundkleber etc.

Von Mucoadhäsion spricht man dann, wenn es sich beim biologischen Gewebe um Schleimhaut (Mucosa) handelt [Robinson, 1990; Gu et al., 1988; Junginger, 1991].

Während der letzten zwanzig Jahre wurde die Entwicklung von mucoadhäsiven Arzneistoffformulierungen mit großem Interesse verfolgt. Diese Formulierungsarten haben einige Vorteile, die von den Wechselwirkungen zwischen Mucosa und Arzneiform herrühren. Eine verlängerte Kontaktzeit und ein intensiverer Kontakt von Arzneiform und Mucosa könnte die Aufnahme und somit die Bioverfügbarkeit, insbesondere für hydrophile, große und schlecht lösliche Moleküle, die normalerweise nur schlecht resorbierbar sind, verbessern.

Es stellte sich heraus, dass die eingesetzten mucoadhäsiven Polymere, sowohl aus der Polyacrylsäurederivatgruppe als auch Chitosan [Illum, 1998], noch mehr Möglichkeiten offenbarten. Einige vermochten proteolytische Systeme zu hemmen [Lueßen et al., 1993 und 1996; Borchard et al., 1996; Juninger et al., 1999] und/oder die epitheliale Permeabilität zu beeinflussen [de Leeuw et al., 1995].

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Systeme untersucht, die im gesamten Gastrointestinaltrakt (GIT) mucoadhäsive Eigenschaften aufweisen sollten. Deshalb wird im folgenden nur auf die Besonderheiten des Magen-Darm-Traktes eingegangen.

7.1.1 Physiologie des Darmtraktes und Faktoren, die die Aufnahme von Arzneistoffen beeinflussen.

Der Gastrointestinaltrakt (auch Magen-Darmtrakt) ist der Hauptaufnahmeort von Nährstoffen und Arzneistoffen im lebenden Organismus, der schematisch in Abbildung 1-1 dargestellt ist.

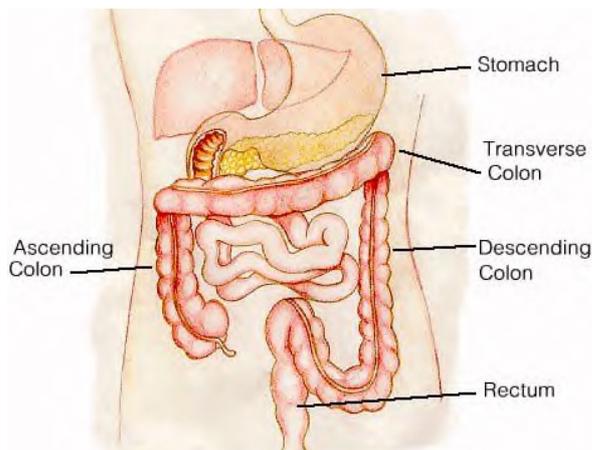


Abbildung 1-1: Magen-Darmtrakt des Menschen, schematisch dargestellt [Fleischer, 2000].

Die große Oberfläche und starke Durchblutung des Magen-Darmtraktes (> 100 m² bei einem gesunden Erwachsenen) sind die ausschlaggebenden Faktoren für die hohe Absorptionskapazität. Die Hauptaufgabe des intestinalen Epitheliums ist die Barrierefunktion. Sie regelt den Transport von (Nähr-) Stoffen. Das intestinale Epithelium fördert effiziente Nahrungsverwertung und Absorption um den Körper mit Nährstoffen zu versorgen.

Der Dünndarm, der mit 4-5 m die längste Sektion des Verdauungstraktes darstellt, ist das Hauptabsorptionsfenster aller Nährstoffe in den Blutkreislauf. Es besteht aus drei Segmenten, die die Passage vom Pylorus zum Dickdarm bestreiten:

a) Duodenum: auch Zwölffingerdarm benannt, kurzer Abschnitt (ca. 25-30 cm); oberster an den Pylorus anschließender Dünndarmabschnitt, in dessen Konkavität sich die Bauchspeicheldrüse einschmiegt. Er besteht aus vier Teilen: oberer, absteigender horizontaler und aufsteigender Teil.

b) Jejunum: Leerdarm, an den Zwölffingerdarm anschließender Teil des Dünndarms.

c) Ileum: an den Jejunum anschließender Teil des Dünndarms, der in das Caecum mündet und dessen Wand typische Lymphfollikel (Peyer-Plaques) enthält. Histologisch bestehen zwischen den drei Abschnitten keine klaren Grenzen. Sie sind alle an der Verdauung und Absorption von Nährstoffen beteiligt.

Die Abbildung 1-2 zeigt den schematischen Aufbau des intestinalen Epitheliums in verschiedenen Vergrößerungen.

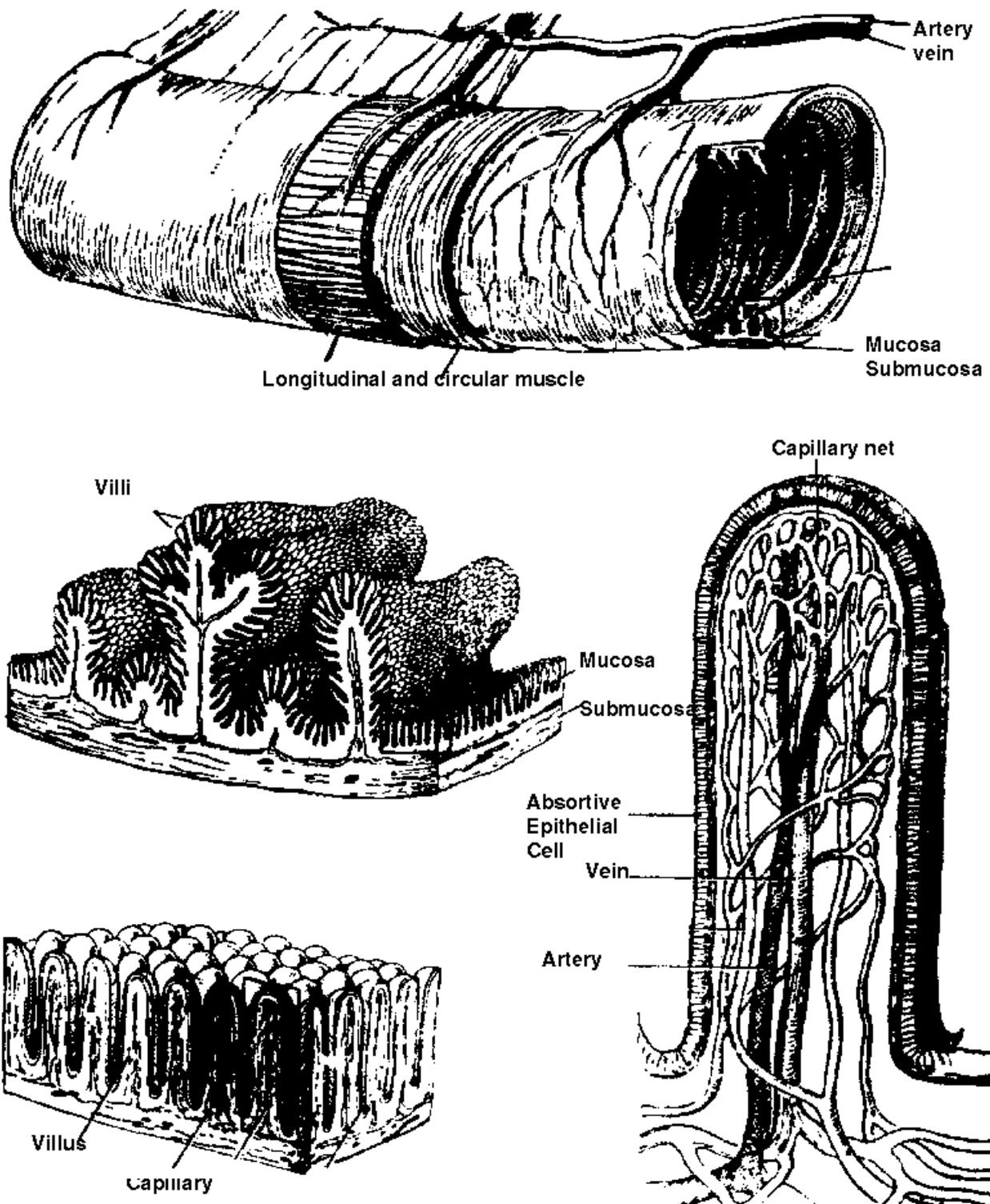


Abbildung 1-2: Schematischer Aufbau des Intestinalen Epitheliums (in unterschiedlichen Vergrößerungen)[modifiziert nach Fleischer, 2000].

Die intestinale Epithelschicht besteht aus einer Monoschicht mit drei Typen von säulenartigen Zellen: Enterocyten, Becherzellen und entero-endokrinen Zellen. Die Enterocyten sind miteinander durch Tight-junctions und Desmosomen verbunden. Die Becherzellen sind die mucinproduzierenden Zellen und variieren in ihrer Anzahl je nach Darmabschnitt. Die Entero-endokrinen Zellen sind zwischen den anderen beiden Zellarten verstreut und regeln durch die Ausschüttung von Hormonen die Darmtätigkeit. Am Ende des Ileum sind wahllos die zu dem Abwehrsystem gehörenden Peyer's patches lokalisiert. Es handelt sich hierbei um Lymphfollikel. Sie enthalten die sogenannten M-Zellen, die auf Endozytose spezialisiert sind und so Antigene, Viren, Bakterien und sogar kolloidale Partikel aufnehmen können [Schumacher und Schumacher, 1999].

Die Hauptfunktion des Darmtraktes ist, wie bereits im oberen Abschnitt beschrieben, die Absorption von Nährstoffen durch den Transport durch die Epithelzellen. Vollbracht wird dieser Transport durch Zerbrechen von Makromolekülen zu kleineren Molekülen, die dann durch die Epithelzellenschicht in die Blutbahn gelangen können.

Ein wichtiger Faktor im Zusammenhang mit der Aufnahme von (Nähr-, Arznei-) Stoffen ist der pH-Gradient entlang des intestinalen Traktes. Man kann den pH-Gradient mit pH empfindlichen radiotransmitting-Kapseln messen. Aus Messungen, die mit gesunden Probanden durchgeführt wurden, wurde beobachtet, dass der pH-Wert von 6,4 im Duodenum auf 7,3 im distalen Trakt des Dünndarm sinkt. Der pH-Wert fiel weiter auf 5,7 im Caecum, stieg dann wieder im Rectum auf 6,6 an [Lindahl et al., 1990; Hörter und Dressman, 2001]. Im Darm liegt der pH-Wert bei gesunden Probanden im zwischen 5,7 und 7,2. Diese Werte werden von der Nahrungsaufnahme stark beeinflusst [Bakatselou et al., 1991].

7.1.2 Aufbau der Mucosa im Gastrointestinaltrakt

Die Mucosa (Schleimhaut) besteht aus dem Epithelzellen und der darunter gelegenen bindegewebigen Lamina propria und wird durch die Sekretion von Mucus geschützt. Die gastrointestinale Mucusschicht ist eine Art Gel, welches den gesamten Gastrointestinaltrakt zum Schutze der Epithelzellen vor Magen- und Darmsäften (Selbstverdauung), Mikroorganismen, Parasiten, Enzymen etc., auskleidet, und feucht hält [Allen et al., 1984]. Zudem stellt diese Schicht eine Diffusionsbarriere für Arzneistoffe dar [Larhed et al., 1998].

Mucus wird in den sogenannten Becherzellen synthetisiert und sekretiert. Diese Mucus sezernierenden Zellen sitzen zwischen den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes und kommen, je nach Lage im Gastrointestinaltrakt, in verschiedener Anzahl und Morphologie vor. Die Zusammensetzung und Dicke der Mucinschicht variiert stark in Abhängigkeit von der Lage der sezernierenden Becherzellen. Sie ist durchschnittlich 180 µm dick, wobei sie zwischen 30 µm bis 450 µm variieren kann [Jordan et al., 1998; Copeman et al., 1994]. Insbesondere die Zusammensetzung der Glykoproteine unterscheidet sich. Glykoproteine bestehen aus Proteinketten an die kovalent Kohlenhydrate als Seitenkette gebunden sind. Zum einen unterscheiden sie sich in den Anteilen von Aminosäuren, zum anderen aber auch in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Kohlenhydratseitenketten [Neutra und Forstner, 1987]. Das Vermögen der Mucinschicht die Epithelzellen zu schützen hängt von der Zusammensetzung und der Kettenlänge bzw. dem Molekulargewicht und damit auch dem Gelbildungsvermögen der Mucinmakromoleküle ab [Peppas und Sahlin, 1996]. Die grobe Zusammensetzung der Mucinschicht ist in Tabelle 1-1 gelistet [Neutra und Forstner, 1987].

Tabelle 1-1: Grobe Zusammensetzung der gastrointestinalen Mucusschicht, Variationen aller Komponenten möglich (Tabelle ergibt keine 100 %).

Glykoproteine (Mucin)	0,5-5 %
Lipide	0,5-1 %
Anorganische Salze	1 %
Proteine	0,5-1 %
Wasser	95 %

Mucin besteht aus einem linearen Protein, das partiell mit Oligosacchariden über glykosidische Bindungen verknüpft ist. Die Proteinkette enthält an jeder dritten Stelle entweder L-Serin oder L-Threonin, die über ein Sauerstoffatom verfügen, über das die glykosidische Verknüpfung erfolgen kann. Das „Mucin Glykoprotein“ besteht zu ca. 80 % aus Zuckern/Kohlenhydraten, die beim Menschen aus den Monosacchariden L-Fucose, N-Acetylglucosamin, D-Galactose, N-Acetylgalactosamin und Sialinsäure bestehen. Die Sialinsäure-Reste befinden sich meistens in der Endposition der Kohlenhydratkette, während die Sulfatester sich eher in mittleriger Position befinden. Beide sind maßgeblich daran beteiligt, dem Molekül eine negative Ladung zu geben.

Das Molekulargewicht dieser Glykoproteine variiert von 0,5 bis 16×10^6 Da [Harding et al., 1999].

Reguliert wird die Sekretion vermutlich über das cholinerge System [MacAdam, 1993; Rubinstein und Tirosh, 1994]. Trotz zahlreich existierender Techniken konnte der genaue Mechanismus der Mucussekretion noch nicht geklärt werden. Die turn-over Rate, also der Rhythmus mit der neues Mucus produziert wird und das zuvor produzierte Mucus von der Mucosa abreißt, beträgt ca. 0,8-4,5 Stunden [Lehr et al., 1991, Lehr et al., 1990].

7.1.3 Mechanismen der Mucoadhäsion

Der Adhäsionsprozess ist sehr komplex. Es wurden mehrere Theorien aufgestellt um das Phänomen der Mucoadhäsion zu beschreiben.

In der Literatur werden hauptsächlich 4 verschiedene Mechanismen für Mucoadhäsion intensiv diskutiert. Allgemein angenommen wird, dass der erste Schritt des Bioadhäsions-schrittes den intensiven Kontakt von Polymer und Mucosoberfläche beinhaltet, hervorgerufen durch eine gute Benetzbarkeit der Arzneiform, die ein entsprechend mucoadhäsives Polymer enthält, durch die Mucusschicht.

Als nächster Schritt werden die mucoadhäsiven Makromoleküle in das Mucusnetzwerk eindringen, so dass sich Kettendurchdringung/Verschlingungen und chemische Bindungen ausbilden können.

Wahrscheinlich ist es ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren, die im folgenden genannt werden.

7.1.3.1 Kettendurchdringung

Eine Erklärung, warum die Verweilzeiten von mucoadhäsiven Polymeren gegenüber nicht mucoadhäsiven Stoffen, erhöht sind, ist die Kettendurchdringung von mucoadhäsiven Polymer und den Glykoproteinketten der Mucinschicht [Peppas und Buri, 1985]. Bei den Untersuchungen wurde deutlich, dass je länger die Kettenlänge des Polymer, desto besser ist die Adhäsion des Polymer auf der Mucusschicht (bis zu einem bestimmten Molekulargewicht) [Lejoyeux et al., 1989; Smart et al., 1984]. Der Vorgang ist schematisch in Abbildung 1-3 dargestellt.

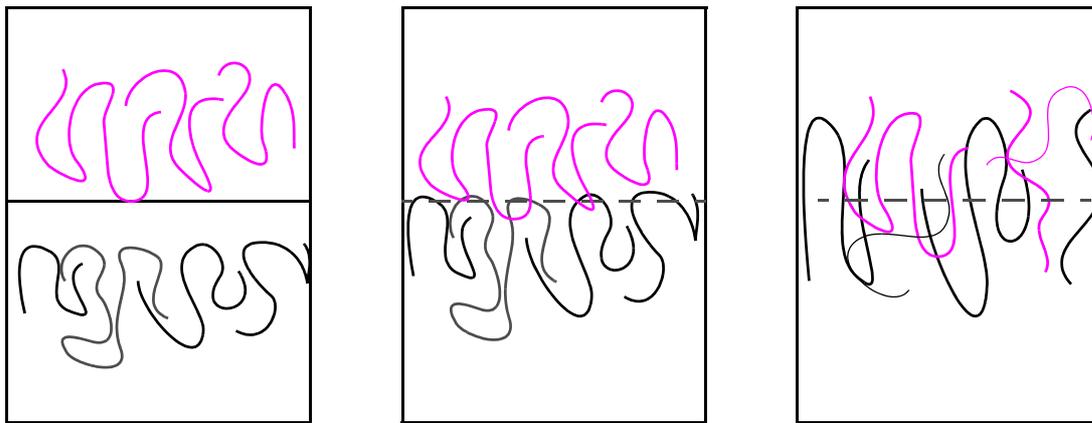


Abbildung 1-3: Kettendurchdringung von einer mucoadhäsiven Polymermatrix (oben) und der Mucinschicht (unten).

7.1.3.2 Wasserstoffbrückenbindung

Einen weiteren Einfluss auf das Verhalten von Mucus und Polymer haben Wasserstoffbrückenbindungen, die durch jeweilige funktionelle Gruppen auftreten. Arbeiten von Mortazavi [Mortazavi, 1995; Mortazavi et al., 1992; Mortazavi et al., 1993] haben gezeigt, dass zumindest ein Teil der Bioadhäsion durch Wasserstoffbrückenbindung begründet ist. Insbesondere kommen hier Hydroxyl-, Carboxyl-, Amin- und Amidgruppen in Betracht.

7.1.3.2.1 Anionische und neutrale Polymere

Polymere mit Hydroxyl- oder Carboxylgruppen scheinen besonders prädestiniert für Mucoadhäsion zu sein. Der Grund dafür ist, dass eine „Kettenverwicklung“ der Polymerketten mit dem Mucus und eine Wasserstoffbrückenbindung mit den deprotonierten Carboxylgruppen der Polyacrylsäure (vgl. Materialien), insbesondere bei niedrigen pH-Werten im Intestinaltrakt, zur Adhäsion von Polymer an die Mucusschicht beitragen. Über einem pH-Wert von 6,5 liegen die meisten Carboxylgruppen in protonierten Zustand vor, haben demzufolge keine Möglichkeit mehr, Wasserstoffbrückenbindungen mit den Glykoproteinen der Mucusschicht einzugehen. Jedoch auch in diesem Zustand ist Adhäsion noch möglich, denn die Mucusschicht enthält mehrwertige Salze, die an die Polysaccharide der Mucinschicht gebunden sind, und somit weiterhin Bindungsstellen bieten können. Polyacrylsäuren haben

z. B. eine starke Affinität zu Calciumionen [Lueßen et al., 1996]. Andere anionische Polymere wie Alginate, Pectin, Carrageen, Xanthan, Carboxy-Methyl-Cellulose weisen eine weitaus geringere Mucoadhäsion auf [Lehr et al., 1992; Anderson et al., 1998], was bislang nur darauf zurückgeführt werden kann, dass es sich sowohl bei Mucin als auch bei den oben genannten Polymeren um anionische Substanzen handelt. Bei Carbomer handelt es sich um einen quervernetzten Typ der Polyacrylsäure (vgl. Materialien), der bei neutralen pH-Werten ungeladen ist und erstaunlicherweise eine gute Mucoadhäsion zeigt. Das Phänomen konnte noch nicht geklärt werden. Polyacrylsäure und Ihre Derivate haben darüber hinaus noch die Besonderheit, eine Schutzfunktion für Proteine und Peptide darzustellen, und damit auch Arzneistoffe gegenüber proteolytischen Systemen zu schützen. Die entsprechenden Enzyme werden durch die Anwesenheit von Polyacrylsäurederivaten im Magen gehemmt [Junginger et al., 1999].

Auch wurden Tenside mit bioadhäsiven bzw. mucoadhäsiven Eigenschaften beschrieben. Hierzu gehören beispielsweise verschiedene Poloxamere und Tween[®]80. Es konnte gezeigt werden, dass Bariumsulfatnanopartikel, die mit einem, oder kombinierten Polymeren stabilisiert wurden, im Magen, Duodenum und Colon eine verlängerte Retentionszeit aufwiesen gegenüber unbeladenen Partikeln [Ruddy et al., 1996].

7.1.3.2.2 Kationische Polymere

Kationische Polymere wie z. B. Chitosan gehen mit dem anionischen Mucin aufgrund ihrer gegensätzlichen Ladung eine starke Bindung ein. Dieses Phänomen kann jedoch nicht generalisiert werden und auf alle positiv geladenen Polymere übertragen werden [Anderson et al. 1989; Lehr et al., 1992].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Zetapotenzial des frischen Mucus vom Schweinedarm mit $-35,5 \text{ mV} \pm 2,5$ ermittelt. Es wurde mit Hilfe eines Ultra Turraxer homogenisiert und mit Wasser, dessen Leitfähigkeit mit NaCl auf $50 \text{ } \mu\text{S/cm}$ eingestellt wurde, verdünnt und vermessen. Um das Zetapotenzial von Chitosan (und Chitosanchlorid) zu ermitteln, wurden Polystyrolpartikel in Chitosan inkubiert (Polymere in Lösung haben kein Zetapotenzial, es kann deshalb nicht ermittelt werden, also mussten Partikel geschaffen werden. Eine Möglichkeit war die Verwendung von Polystyrolpartikeln, und die Beladung dieser mit den entsprechenden Polymeren). Chitosan wurde in verdünnter Essigsäure gelöst, die anschließende Verdünnung der Partikel mit dem Messmedium war groß genug, so dass der pH-Einfluss bzw. Ioneneinfluss auf die Zetapotenzialmessung vernachlässigt werden konnte. Die Polystyrolpartikel wiesen nach Inkubation in Chitosan und Chitosanchlorid-Lösung 0,25 %, eine Oberflächenladung von $+44,8 \text{ mV} \pm 0,6$ bzw. $+41,3 \pm 0,5 \text{ mV}$ auf. Die Polystyrolpartikel hatten unbeladen ein Zetapotenzial von $+5,1 \text{ mV} \pm 0,2$ auf. Das zeigt, dass die starke positive Ladung auf Beladung der Partikel mit Chitosan (und Chitosanchlorid) zurückzuführen ist. Das Vorliegen unterschiedlicher Ladungen bietet eine Erklärung der guten Mucoadhäsion von Chitosan bzw. Chitosanchlorid an die Mucusschicht.

7.1.3.3 Wasseraufnahmevermögen (Quellverhalten) des Polymers auf Mucosagewebe

Eine weitere Theorie ist der Zusammenhang zwischen Wasseraufnahmevermögen des Polymers auf der Mucosa und seine bioadhäsiven Eigenschaften. Je schneller ein Polymer zu quellen beginnt, desto schneller kann es auch mit der Mucinschicht in Wechselwirkungen treten und wird somit eine gute Bioadhäsion zu entsprechendem Gewebe haben. Dieses betrifft vor allen Dingen Tabletten, die mit bioadhäsiven Polymeren formuliert sind, z. B. für Buccaltabletten.

Die Frage jedoch, welches der Haupteffekt bzw. Mechanismus ist, konnte bis jetzt noch nicht vollständig geklärt werden. Wahrscheinlich ist es ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren.

7.1.4 Nanopartikel und Mucoadhäsion

Es ist generell bekannt, dass kleine Partikel besser an Oberflächen haften als große Partikel, unabhängig von der Beschaffenheit der jeweiligen Oberfläche. So weisen Nanopartikel eine bessere Haftung an mucosale Oberflächen als Mikropartikel oder noch größere Partikel auf. Es wurde bereits das Adsorptionsverhalten von Partikeln verschiedener Größen auf die gastrointestinale Mucosa beschrieben [Ponchel et al., 1997; Lamprecht et al., 2001; Takeuchi et al., 2001]. Dabei konnte festgestellt werden, dass Nanopartikel weiter in die Mucinschicht eindringen konnten als Mikropartikel. Offensichtlich vermögen sie, aufgrund ihres geringen Durchmessers tiefer in das Mucin Netzwerk einzudringen als Mikropartikel. Schematisch ist es in Abbildung 1-4 dargestellt.

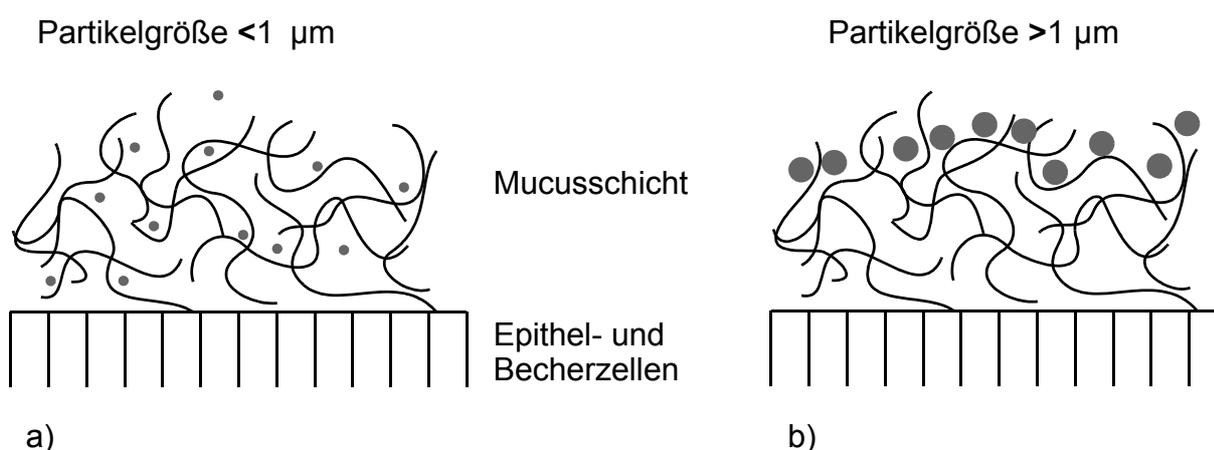


Abbildung 1-4: Model des Adsorptionsverhalten von Partikeln auf die Mucosa mit Partikelgrößen a) $< 1 \mu\text{m}$ und b) $> 1 \mu\text{m}$ [modifiziert nach Ponchel 1997].

7.1.5 Applikation von Buparvaquon

Die lokale Behandlung von Krankheiten kann oftmals unzureichend sein, wenn die Kontaktzeit des Arzneistoffes am Wirkort zu kurz ist und somit eventuell nicht den gewünschten Effekt erreichen kann. Hier könnte mit dem Einsatz von mucoadhäsiven Polymeren eine Verbesserung erreicht werden.

Bei der Aufnahme peroraler Arzneiformen können nur kleine Mengen im Magen absorbiert werden, da dieser eine relativ kleine Oberfläche hat. Kationische Stoffe werden durch die Magensäure protoniert. Der Hauptabsorbtionsort ist der Dünndarm mit seiner großen Oberfläche (ca. 100 m² bei einem gesunden Erwachsenen). Je nach Arzneiform und Löslichkeitsverhalten des Stoffes, kann auch in späteren Darmabschnitten noch Wirkstoff absorbiert werden. Eine zu schnelle Magen-Darm Passage ist nur ein Problem, dass bei der oralen Applikation von Arzneistoffen auftreten. Um die Passagezeit zu verlängern und damit eine Verlängerung der Kontaktzeit in einem z. B. mit Cryptosporidien (vgl. 6.1) befallenen Gastrointestinaltrakt zu erreichen, können mucoadhäsive Arzneiformen eingesetzt werden.

In dieser Arbeit wurden verschiedenen Polyacrylsäurederivate, Chitosan und Chitosanchlorid untersucht. Diese Polymere zeigten bereits in anderen Studien gute mucoadhäsive Wirkung [Caramella et al., 1994; Genta et al., 1997, Mortazavi, 1995; Tamburic und Craig, 1995; Fuongfuchat et al., 1996; Madsen et al., 1998, Henriksen et al., 1996; Lehr et al., 1992; Lehr et al., 1990; Witschi und Mrnsy, 1999]. Keines der Polymere aus diesen beiden Gruppen wird vom Organismus absorbiert.

7.2 Messung von Mucoadhäsion

Die Ermittlung des Ausmaßes von Mucoadhäsion kann auf verschiedene Arten ermittelt werden. Im folgenden werden drei Arten näher vorgestellt.

7.2.1 Anhaftungstest

Dieser Versuchsaufbau ist Modellen, wie sie bereits in abgewandelter Form in der Literatur beschrieben worden [Lehr, 1998], nachempfunden. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 2-5 gezeigt.

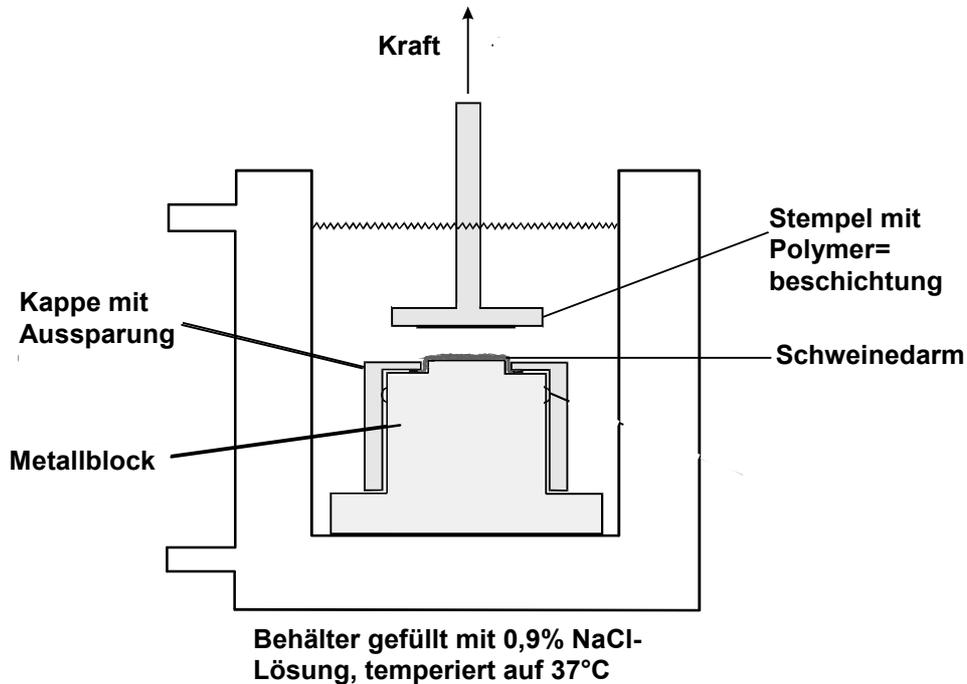


Abbildung 2-5: Versuchsaufbau, schematisch dargestellt [modifiziert nach Lehr, 1998].

Die Versuche wurden zunächst mit Mäusedarm durchgeführt, der jedoch aufgrund seiner geringen Größe kaum Auftrags-/Kontaktfläche zum Messen aufwies. Deshalb wurden die Hauptversuche mit Schweinedarm durchgeführt, der sich wegen seiner Größe und Beschaffenheit besser eignete.

Frischer Schweinedarm wurde auf den Probenhalter aufgebracht und mit Hilfe einer Polystyrol-Kappe mit Aussparung fixiert (siehe Abbildung 2-5). Danach wurde von oben der Stempel mit dem Nanosuspension/Gel System aufgebracht, und auf den Schweinedarm abgesenkt. Nach 3 min. wurde die Kraft gemessen, die benötigt wurde um den oberen Probenhalter von der Schweinemucosa zu lösen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2-1 dargestellt:

Tabelle 2-1: Haftkraft von Hydrogel/Nanosuspension Systemen an Schweinemucosa, ermittelt durch eine Federwaage (1-100mN) (n=3).

Gel	Mittelwert der Haftkraft [mN]	S.D. [mN]
Carbopol 934	14	4
Carbopol 971	12	6
Carbopol 974	14	3
Carbopol 980	38	10
Noveon AA-1	34	7
Chitosanchlorid	10	1
Chitosan	12	2

Es fällt auf, dass die Testergebnisse einer hohen Streuung unterliegen, das heißt der Versuch nicht gut reproduzierbar war. Das könnte daran liegen, dass die Kraft, mit der Probe und Stempel zusammengeführt wurden nicht bei jeder Probe die gleichen waren. Probe und Stempel wurden per Hand zusammengeführt (ohne Kraftmessung), dadurch sind Schwankungen der "Aufbringekraft" unvermeidlich. Von dieser Kraft hängt jedoch der später gemessene Wert stark ab. Weitere mögliche Ungenauigkeiten ergeben sich aus einer eventuellen Überlagerung von Adhäsion und Kohäsionskräften in Hydrogel und/oder der Mucusschicht. Es kann mit diesem Messaufbau also nicht gewährleistet werden, dass nur die Adhäsionskraft zwischen den beiden Systemen ermittelt wird. Dieses wird auch nicht möglich sein, wenn die Messgeräte die Probe mit definierter Kraft auf die Mucusschicht bzw. Mucosa bringen würden. Allerdings könnte man mit solchen Messgeräten eher Tendenzen zur Mucoadhesivität von Polymeren ermitteln.

7.2.2 Abwaschtest

Für diesen Test wurde eine schiefe Ebene (Winkel 30°) errichtet, auf der ein Stück Schweinedarm befestigt wurde. Der Schweinedarm wurde aufgeschnitten und mit der Lumenseite nach oben auf der schiefen Ebene befestigt. Auf den oberen Bereich des Schweinedarms wurde eine definierte Menge Nanosuspension-Hydrogel (siehe Tabelle 2-1) gleichmäßig aufgebracht. Nach 3 Minuten Ruhezeit wurde der Darmabschnitt mitsamt des Gels mit 10 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung (temperiert auf 37°C) von oben gespült, und die NaCl-Lösung sowie alle anderen heruntergespülten Stoffe, wie z. B. das Nanosuspensions-Hydrogelsystems wieder aufgefangen. Schematisch ist der Versuchsaufbau in Abbildung 2-6 dargestellt.

Darmabschnitte ca. 10 cm lang und ca. 10 g schwer, 1,0 g Gel enthält 6,7 mg Buparvaquon

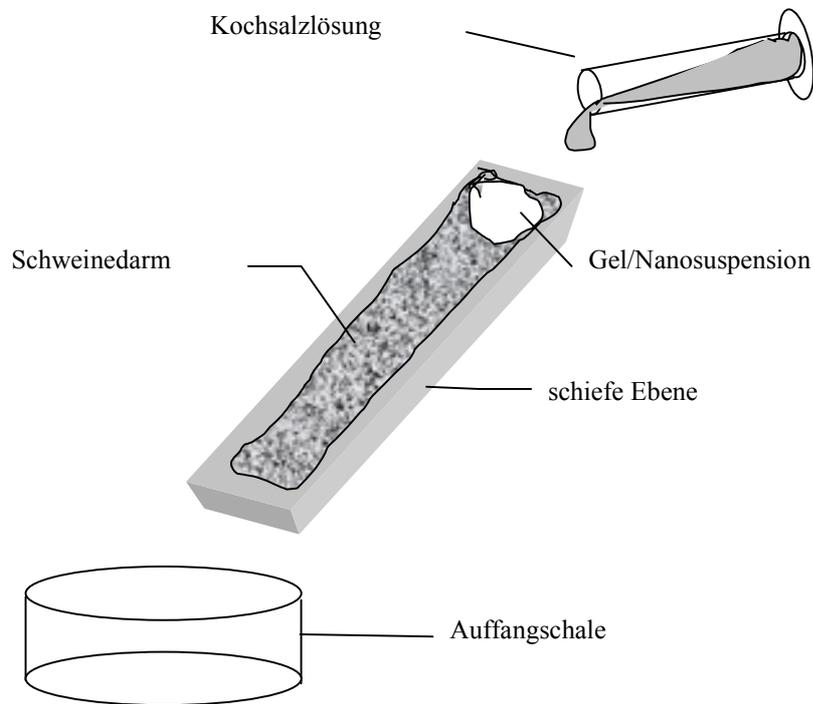


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum Abwaschtest.

Die aufgefangene Flüssigkeit wurde in Isopropanol aufgenommen (Buparvaquon lässt sich in Isopropanol vollständig lösen). Die festen Bestandteile wurden abfiltriert. Die gelöste Menge Buparvaquon wurde anschließend mit Hilfe der UV-Spektroskopie ermittelt. Der Gehalt an Buparvaquon der vor dem Abwaschen aufgetragen wurde, wurde gleich 100 % gesetzt. Buparvaquon dient als innerer Standard. Je weniger Buparvaquon am Ende wiedergefunden wird, desto besser haftet das Gel an der Mucosa. Als Referenz wurde Nanosuspension/Wasser eingesetzt. Die Konzentration von Buparvaquon ist genauso hoch wie im Nanosuspension-Hydrogelsystem. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-1 dargestellt.

Tabelle 2-1: Ergebnisse des Abwaschtests.

Hydrogel	aufgetragene Menge [g]	entspricht Buparvaquon [mg]	Wiederfindungsrate [%]
Carbopol 934	0,96	6,4	24
Carbopol 971	0,94	6,3	77
Carbopol 974	0,97	6,5	53
Carbopol 980	1,01	6,8	81
Noveon AA-1	1,21	8,1	44
Chitosanchlorid	1,16	7,8	k. D.*
Chitosan	1,17	7,8	k. D.*
Nanosuspension-Wasser	0,97	6,5	62

* Keine Daten vorhanden, da sich das UV Maximum durch den sauren pH und nach Verdünnen in Isopropanol verschoben hat (erkennbar dadurch, dass die Substanz ihre Farbe veränderte hatte).

Diesen Daten zufolge weist Carbopol 934 die größte Mucoadhäsion auf und Carbopol 980 die geringste. Diese Ergebnisse stimmen nicht ganz mit der Literatur überein und mit den vorangegangenen Versuchen (2.1 Anhaftungstest) ebenfalls nicht. Auffällig ist bei diesem, wie auch bei dem vorangegangenen Test, dass die ermittelten Werte für Carbopol 934 und 974 nicht ähnlich sind, obwohl es sich um das gleiche Polymer handelt, das nur auf verschiedene Arten hergestellt wurde. Ursache hierfür ist vermutlich der unterschiedliche Zustand der Mucosa. Je nach Darmabschnitt ist dieser glatter, oder weniger glatt. Ebenfalls eine große Rolle spielt die Menge Mucus, die sich gerade auf der Mucosa befindet. Teilweise befindet sich sehr viel Mucus auf der Mucosa, vermutlich kurz vor dem turn-over. In diesem Falle reißt die Mucusschicht mitsamt des Nanosuspension-Hydrogelsystems sehr schnell ab, woraus eine hohe Wiederfindungsrate resultiert obwohl eventuell das Gel an der Mucusschicht sehr gut haftet. Es ist jedoch sehr schwierig gleichartig beschaffene Darmabschnitte einzusetzen. Deshalb ist es problematisch, mit diesem Versuchsaufbau gut reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Damit ist der Versuchsaufbau für die Ermittlung von Mucoadhäsion nur eingeschränkt brauchbar.

7.2.3 Rheologische Untersuchungen

Um das Verhalten von Hydrogel-Nanosuspension-Mucus bzw. Mucin zu untersuchen wurden in dieser Arbeit einfache Fließkurven und Frequenzsweeps durchgeführt.

Es können relativ einfache Methoden eingesetzt werden um Mucin-Polymer-Interaktionen quantitativ zu beschreiben. Den Methoden wird zu Grunde gelegt, dass die Viskosität einer kolloidalen Mucin-Dispersion davon abhängig ist, wie groß der Widerstand des Mucin-Netzwerkes gegen das Fließen ist. Beeinflusst wird diese in Gegenwart von Polymeren durch

gegenseitige Kettendurchdringung (individuell verschieden, je nach Polymer/Molekulargewicht bzw. Kettenlänge) und nicht kovalente Verbindungen wie z. B. elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindung oder hydrophobe Wechselwirkung.

Alle diese Kräfte sind, wie schon im vorherigen Abschnitt beschrieben, an der Mucin-Polymer Adhäsion beteiligt. Sie verändern die Gestalt oder Anordnung der Macromoleküle, sowohl des Mucingerüsts als auch der Polymerketten, und sind die Grundlage für Viskositätsänderungen.

Daher sollten diese Kräfte über die Bestimmung der Viskosität zu untersuchen sein. Unterschiede der Viskosität, ausgelöst durch die gegenseitige Beeinflussung von Mucin und kurz- oder langkettigen Polymeren wurden bereits in der Literatur beschrieben [Hassan und Gallo, 1990].

In dieser Arbeit wurde das Verhalten von Polymer - Mucus/Mucin und das Verhalten Polymer - Nanosuspension und Polymer-Nanosuspension - Mucus untersucht. Es sollte herausgefunden werden, ob die Anwesenheit von Nanopartikeln einen Einfluss auf das rheologische Verhalten des Polymers ausübt und ob damit Veränderungen in Bezug auf die Mucoadhäsion dieser Systeme auftreten.

7.2.3.1 Untersuchungen anhand von Fließkurven zur Charakterisierung von Polymer/Nanosuspension und zum mucoadhäsivem Verhalten der Systeme

Zunächst wurden die Fließeigenschaften der Hydrogele bei zwei verschiedenen Konzentrationen ermittelt und untersucht, ob Nanosuspensionen Einfluss auf diese haben würden.

Dazu wurden die Hydrogele zuerst ohne Nanosuspension mit dem Platte-Kegel Rheometer vermessen und anschließend mit einer 10%igen Nanosuspension 1:1 vermischt, wobei jeweils der Polymeranteil identisch war. In der Tier-Studie (vgl. 2.4) mit Buparvaquon war der Gehalt an Nanosuspension mit 6,7 mg/ml Hydrogel (Feststoffanteil [mg]/ Hydrogelanteil [ml]) sehr viel geringer und somit nicht direkt vergleichbar. Für die rheologischen Untersuchungen wurde ein höherer Gehalt gewählt, weil bei dem geringem Feststoffanteil von 6,7 mg/ml keine Auswirkungen auf die Fließfähigkeit zu erkennen waren. Die Fließkurven von Hydrogel mit 6,7 mg/ml (Buparvaquon) und ohne Nanosuspension (bzw. Buparvaquon) waren identisch.

Das rheologische Verhalten der Polymere der Carbopol-Reihe und von Noveon AA-1 ist sehr ähnlich, sie zeigen alle plastisches Fließverhalten und sind leicht thixotrop. Exemplarisch für alle ist in Abbildung 2-7 die Fließkurve von Carbopol 934 0,5 % (w/w) auf der linken Seite dargestellt. Im Vergleich dazu ist auf der rechten Seite das Rheogramm eines Hydrogel-Nanosuspensionssystem dargestellt. Es besteht aus Carbopol 934 1,0 % (w/w) und einer 10,0 %igen Nanosuspension, die im Verhältnis 1:1 gemischt wurden, so dass ein Polymeranteil von 0,5 % resultiert (gleicher Polymeranteil wie für die Studie 2.4) und der Feststoffanteil bei 5,0 % liegt.

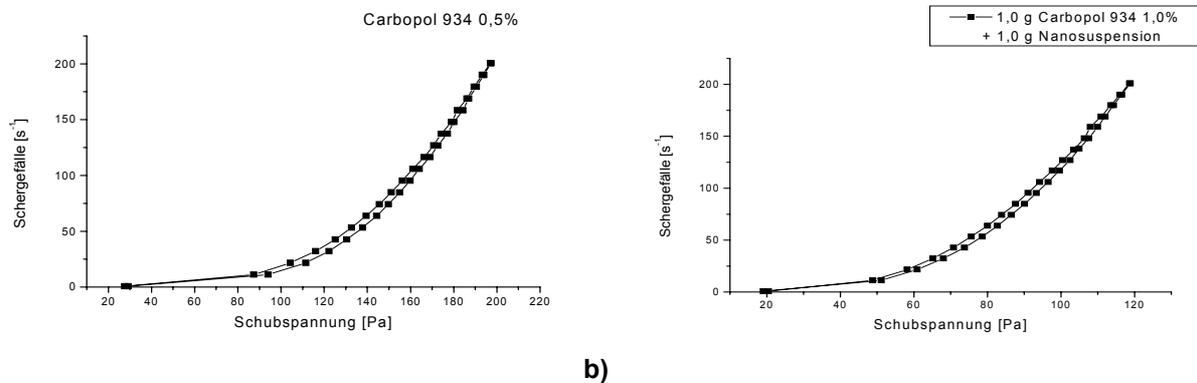


Abbildung 2-7: Rheogramm a) von Carbopol 934 0,5 %, im Vergleich dazu b) Carbopol 934 mit 5 % Nanosuspension.

Die Fließkurven der anderen untersuchten Hydrogele ähneln der des Carbopols 934 sehr, sie unterscheiden sich maßgeblich in der Viskosität bei niedriger Scherrate (vgl. Tabelle 2-1), und im Ausmaß der Thixotropie, erkennbar an der geringeren Hysterese. Bei höherer Schergeschwindigkeit ($150 - 200\text{s}^{-1}$) sinkt der Viskositätskoeffizient aller untersuchten Hydrogele des Carbopol- und Noveontypes auf Werte zwischen $0,5$ und $1\text{ Pa}\cdot\text{s}$ ab (zum Vergleich: Viskosität von Wasser bei 25°C $0,890\text{ mPa}\cdot\text{s}$). Chitosan und Chitosanchlorid zeigen bei niedrigeren Konzentrationen nahezu Newtonsches Fließverhalten Abbildung dazu. Das gleiche Ergebnis zeigte eine Nanosuspension mit einem 10%igen (oder geringem) Feststoffanteil.

Allen Hydrogel-Nanosuspensionssystemen mit einem Polymeranteil von 0,5 % ist gemeinsam, dass in Anwesenheit von Nanosuspension der Viskositätskoeffizient η , gemessen bei einer Scherrate von 20 s^{-1} , geringer ist als als der jeweilige Vergleichswert aus den Versuchen ohne Nanosuspension. Es ist anzunehmen, dass die Nanopartikel den Gerüstaufbau der Polyacrylsäure behindern, es können weniger Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, da Nanopartikel zwischen den Polymerketten liegen und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen stören. Die Charakteristik des Fließverhaltens ändert sich durch die Zugabe von Nanosuspension nicht. Hier ist exemplarisch für alle Hydrogel/Nanosuspensionssysteme mit plastischem Fließverhalten, die Fließkurve von Carbopol 934 und Nanosuspension auf der rechten Seite gezeigt. In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob das Fließverhalten durch die Konzentration des zugegebenen Polymers beeinflusst wird. Dazu wurden Versuche mit einem Polymeranteil von 1,0 % durchgeführt. Die Daten sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt.

Tabelle 2-1: Viskositätskoeffizienten η einer Scherrate von 20 s^{-1}

Polymer	Konzentration (w/w)	η_{Polymer} [Pa*s]	$\eta_{\text{Polymer-Nanos}}$ [Pa*s]
Carbopol 934	0,5 %	5,16	3,80
	1,0 %	200,34	208,52
Noveon AA-1	0,5 %	7,47	4,95
	1,0 %	230,09	252,59
Chitosanchlorid	0,5 %	0,04	0,04
	1,0 %	0,95	0,85
Chitosan	0,5 %	0,05	0,05
	1,0 %	2,00	3,49

Die Ergebnisse zeigen, dass bei der Konzentration an Polymer von 1,0 % die Anwesenheit der Nanosuspension die Viskosität nicht bei allen Polymeren verringert, sondern so gar leicht erhöht. Das könnte darauf zurückgeführt werden, dass jetzt wesentlich mehr Bindungsstellen, nämlich Polymer-Buparvaquonnanopartikel, vorhanden sind, die das Gelgerüst stabilisieren. Damit bewirkt die Nanosuspension, dass der Viskositätskoeffizient erhöht wird. Bei geringerer Konzentration des Polymers könnten die Nanopartikel als allerdings „Störstellen“ bewirken, die die gegenseitige Abstoßung, der mit 0,5% geringen Konzentration an Hydrogel, herabsetzt und somit eine Viskositätsabnahme verursachen.

Der Einfluss von Nanosuspension auf die Chitosan und Chitosanchloridlösung ist äußerst gering. Das kann damit zusammenhängen, dass Chitosanchlorid und Chitosan bei niedrigen Konzentrationen ($< 10 \%$ [Chitosanbrochüre, 1998, Pronova, Norwegen]) kein festes Gelgerüst ausbilden. Die Erhöhung des Viskositätskoeffizienten bei der 1 %igen Chitosanlösung kann folgendermaßen erklärt werden: Die Feststoffpartikel der Nanosuspension sind negativ geladen während Chitosan bei pH 4 ein positiv geladenes Polymer ist. Polymer und Partikel ziehen sich an. Dabei kann es passieren, dass sich zwei oder mehr Polymerketten an ein Partikel heftet, wie bei Phänomen des „bridgings“, und somit zwei oder mehr Ketten verknüpft sind. Diese Verknüpfung kann zu einer leichten Erhöhung der Viskosität führen.

Aus den obigen Daten ist zu schlussfolgern, dass für die Entwicklung von Systemen aus Nanosuspensionen und Hydrogelen eine beiderseitige konzentrationsabhängige Beeinflussung dieser Komponenten zu berücksichtigen ist.

Zur Ermittlung der Mucoadhäsion der hier untersuchten Systeme wurden zunächst die verschiedenen Hydrogele mit und ohne frischem Mucus vom Schwein mit dem Platte Kegel Viskosimeter vermessen. Anschließend wurden die Nanosuspension-Hydrogelsysteme ebenso vermessen.

Dieses Verfahren zur Bestimmung der mucoadhäsiven Eigenschaften von Polymeren wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [Hassan und Gallo, 1990; Rossi et al. 2000 und 2001; Ferrari et al., 1997].

Wie bereits im obere Abschnitt beschrieben, setzt sich die Viskosität (oder der Fließwiderstand) einer kolloidalen Mucin Dispersion aus dem Verhalten der individuellen Kettensegmenten zusammen. Das wird bestimmt durch physikalische Verknäulung. Nichtkovalente intermolekulare Wechselwirkungen, z. B. elektrostatische, hydrophobe und Wasserstoffbrückenbindungen [Gu et al., 1988; Bohdanecky und Kvar, 1982]. Das sind die gleichen Kräfte, die auch an der Adhäsion Mucin - Polymer beteiligt sind. Folglich sind die Kräfte eines Mucin - Bioadhäsiven Systems durch Messungen der Viskosität erfassbar. Viskositätsänderungen, hervorgerufen durch Mucin-Wechselwirkungen mit kleinen und großen Molekülen sind in der Literatur beschrieben [Forstner et al., 1977; List et al., 1978]. Chemische und physikalische Bindungsenergien können in mechanische Arbeit oder Energie umgewandelt werden. Diese Arbeit bewirkt Veränderungen in Form oder Anordnung von Makromolekülen und ist die Grundlage für Viskositätsänderungen [Bohdanecky und Kvar, 1982]. Aus diesem Grunde kann der Viskositätskoeffizient einer Dispersion, die Mucus oder Mucin und ein bioadhäsives Polymer enthält, in die einzelnen Komponenten zerlegt werden, die dann die im folgenden dargelegte empirische Formel ergibt. Hierbei ermittelt man den sogenannten rheologischen Synergismus Parameter ($\Delta\eta$), der sich wie folgt ergibt [Hassan und Gallo, 1990; Rossi et al. 2001]:

$$\Delta\eta = \eta_{\text{mix}} - (\eta_{\text{pol}} + \eta_{\text{muc}})$$

η_{pol} scheinbare Viskosität des Polymers

η_{muc} scheinbare Viskosität des Mucin bzw. Mucus

η_{mix} scheinbare Viskosität der Mischung aus Polymer und Mucin, bzw. Mucus

Die Parameter wurden bei einer Scherrate von 20 s^{-1} ermittelt. Es wurde die niedrige Scherrate für die Berechnung des rheologischen Synergismus Parameters gewählt, da sich dieser bei höheren Scherraten stark vermindert und damit Unterschiede zwischen den verschiedenen Polymeren nicht mehr so gut detektierbar wären, wie schon in anderen Studien gezeigt wurde [Ferrari et al., 1997].

Es wurden die Viskositätskoeffizienten von Hydrogel bzw. Hydrogel/Nanosuspension und frischem Schweinemucus ermittelt. Da es sich hierbei um ein Naturprodukt handelt, werden sich die Viskositätskoeffizienten nur des Mucus von Versuch zu Versuch unterscheiden und Streuungen sind zu erwarten. Um diesen Effekt auszuschließen, wurde eine zweite Messreihe durchgeführt. Bei der zweiten Messreihe wurde statt frischem Mucus aufgereinigtes Mucin verwendet. Das Mucin wurde zu 10 % in Wasser dispergiert.

Die Viskositätskoeffizienten sind in Tabelle 2-2 dargelegt.

Tabelle 2-2: Viskositätskoeffizienten η einer Scherrate von 20 s^{-1}

Polymer	Konzentration (w/w)	η_{mix} [Pa*s]	$\Delta\eta$ [Pa*s]	η_{mixNanos} [Pa*s]	$\Delta\eta_{\text{nanos}}$ [Pa*s]
Carbopol 934 Mucus Mucin	0,5 %	6,50	0,09	6,01	0,96
	10,0 %	4,57	-0,48	3,87	-0,05
Noveon AA-1 Mucus Mucin	0,5 %	8,86	0,14	8,50	2,30
	10,0 %	7,11	-0,43	4,57	-0,45
Chitosanchlorid Mucus Mucin	0,5 %	1,77	0,48	1,74	0,45
	10,0 %	0,03	-0,08	0,02	-0,09
Chitosan Mucus Mucin	0,5 %	1,85	0,55	1,82	0,52
	10,0 %	0,06	-0,05	0,06	-0,05

Bei allen Proben mit Mucus ist ein positiver Viskositätskoeffizient $\Delta\eta$ zu erkennen. Bei negativem $\Delta\eta$ wie er sich für die Proben mit aufgereinigtem Mucin ergibt, ist kein rheologischer Synergismus vorhanden, das heißt Polymer und Mucin gehen keine Wechselwirkungen mit einem die Gelstruktur stärkenden Effekt ein. Das ist für die Proben mit Mucin zutreffend. Man kann also durchaus darauf schließen, dass Mucus und Mucin zur Untersuchung nicht gleichwertig zu betrachten sind. Die hier untersuchten Hydrogele gehen Wechselwirkungen mit dem frisch gewonnenen Mucus ein, zeigen aber mit dem aufgereinigtem Mucin keine Interaktionen.

Da die Viskositäten der untersuchten Gele sehr unterschiedlich sind, ist es schwer, eine absolute Aussage über das Gel, welches den größten Synergismus hervorruft zu machen. Es ist allen Gelen gemeinsam, dass in Anwesenheit der Nanosuspension das Phänomen des rheologischen Zusammenspiels nicht mehr so stark ausgeprägt ist, wie ohne Nanosuspension.

7.2.3.2 Untersuchungen der viskoelastischen Eigenschaften der Nanosuspension-Hydrogelsysteme

Bei den Verfahren zur Messung von viskoelastischen Eigenschaften unterscheidet man zwischen statischen und dynamischen Messverfahren.

Der Kriechtest ist eine statische Messung. Eine konstante Schubspannung wirkt auf die Probe, die zeitabhängige Deformation wird gemessen. Teilt man die Deformation durch die Schubspannung so erhält man die Komplianz (oder Nachgiebigkeit, engl. compliance). Auf dieses Messverfahren soll nicht weiter eingegangen werden, da es nicht eingesetzt wird. Als dynamische Verfahren werden die Oszillationsmessungen bezeichnet. Hierbei wird die Schubspannung bzw. Deformation oszillierend auf das zu untersuchende System gegeben.

Bei dem in den folgenden Untersuchungen eingesetztem CR-Modus (Controlled Rate), wird ein definiertes Schergeschwindigkeitsgefälle vorgegeben und die resultierende Schubspannung bestimmt. Um das messtechnisch zu erreichen wird die Drehzahl des Drehkörpers vorgegeben und die Probe im Spalt zum fließen gebracht. Der Widerstand der Probe ist proportional dem Drehmoment (viskositätsabhängig), das auf den Drehkörper wirkt. Er wird mit Hilfe einer Messfeder aufgenommen, über deren Verdrillungswinkel die Schupspannung errechnet werden kann. Die Strukturen innerhalb der Proben werden hierbei nicht zerstört.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass mucoadhäsive Polymere einen großen Anstieg der Resistenz von Mucusgel gegen Deformation bewirken, wenn sie darin inkorporiert sind. Deshalb wurde dieses Phänomen rheologischer Synergismus genannt, und als Maß für das adhäsive Zusammenspiel von Mucus und Polymeren betrachtet [Hassan und Gallo, 1990].

In dieser Arbeit wurde der rheologische Synergismus für verschiedene mucoadhäsive Polymere mit und ohne Nanosuspension, sowohl an frischem Schweinemucus als auch an gereinigtem Mucin, das auf 10 % mit Wasser verdünnt wurde, untersucht.

Das rheologische Verhalten wurde mit den dynamischen Modulen G' und G'' als Funktion der Frequenz charakterisiert. Hierbei ist G' das Speichermodul (elastisch) und G'' das Verlustmodul (viskos). Das Speichermodul ist ein Maß für die gespeicherte und wieder freigegebene Energie pro Deformationszyklus und spiegelt die festkörperartige Komponente wieder, während das Verlust Modul ein Maß für den Energieverlust pro Zyklus ist, und die flüssige Komponente eines Systems widerspiegelt [Madsen et al., 1998; Ferry, 1980].

Die Veränderungen im Speichermodul (G') und im Verlustmodul (G'') wurden ermittelt und der rheologische Synergismus daraus berechnet .

Der rheologische Synergismusparameter ist die Differenz zwischen der tatsächlich ermittelten und den theoretischen Werten zwischen Mucin - Polymer Mischung und wurde wie folgt berechnet [Hassan und Gallo, 1990; Caramella et al., 1994; Rossi et al., 1995]:

$$\Delta G' = G'_{mix} - (G'_{Polymer} + G'_{Muc})$$

$$\Delta G'' = G''_{mix} - (G''_{Polymer} + G''_{Muc})$$

$\Delta G'$: Synergismusparameter (elastisch)

$\Delta G''$: Synergismusparameter (viskos)

$G'_{Polymer}$: Speicher Modul des Polymers

G'_{Muc} : Speicher Modul von Mucus bzw. Mucin

G'_{mix} : Speicher Modul von der Mischung aus Polymer und Mucus bzw. Mucin

$G''_{Polymer}$: Verlust Modul des Polymers

G''_{Muc} : Verlust Modul von Mucus bzw. Mucin

G''_{mix} : Verlust Modul von der Mischung aus Polymer und Mucus bzw. Mucin

Für jede Probe wurde ein Frequenzsweep durchgeführt. Dieser Frequenzsweep reflektiert die strukturellen Eigenschaften des Materials in Bezug auf Festigkeit und Elastizität.

In dieser Studie wurden für den Vergleich der unterschiedlichen Systeme die grundlegenden Unterschiede des Speicher- und Verlustmoduls von jedem Spektrum extrahiert. Ähnliche Methoden wendeten Mortazavi et al. (1992, 1993) Madsen et al. (1998) und Riley et al. (2001) an. Zusätzlich wurde $\tan\delta$ (δ = Phasenverschiebung), berechnet. Es ist ein zusätzlicher Parameter um die viskoelastischen Eigenschaften eines halbfesten Systems zu beschreiben [Ferry, 1980]. Mit diesem Wert kann abgeschätzt werden, ob es sich um ein eher elastisches oder plastisches System handelt. Mit kleineren Werten ($\delta < 45^\circ$) steigt der elastische Anteil, während mit steigendem $\tan\delta$ ($\delta > 45^\circ$) die viskose Charakteristik überwiegt.

Probenaufbereitung:

Die Nanosuspension wurde, wie im Methodenteil beschrieben, mit einem Feststoffgehalt von 10 % hergestellt. Stabilisiert wurde sie mit 0,5 % Lutrol F 68.

Die Herstellung der Hydrogele ist ebenfalls in dem Methodenteil beschrieben. Vor dem Einsatz wurden sie mindestens 24 h im Kühlschrank aufbewahrt, um völlige Hydratation zu gewährleisten.

Mucus wurde vom frischen Schweinedarm vorsichtig abgeschabt und sofort eingesetzt, bzw. nach Einfrieren und Wiederauftauen. Das abgeschabte Mucus wurde nicht weiter behandelt. Mucin (aufgereinigt) wurde zu 10 % in Aqua dem. dispergiert. Diese Konzentration ist wesentlich höher, als es im natürlichen Mucus vorkommt. Da die Viskosität von Mucin jedoch wesentlich geringer ist als von Mucus, wurde 10 % gewählt um im Versuch höhere Viskositäten zu erhalten, und damit eine bessere Vergleichbarkeit zu erlangen, wobei auch mit diesem Mucin-Anteil nur eine Annäherung erreicht werden konnte.

Die Komponenten wurden direkt in einem Eppendorfgefäß (2 ml) zusammengemischt und mindestens 2 h vor der Untersuchung im Kühlschrank ruhen gelassen. Mucus bzw. Mucin und Hydrogel (Polymeranteil 0,5 %) wurden im Verhältnis 1:1 zusammengemischt. Nanosuspension und Hydrogel wurden so zusammengegeben, dass die Polymerkonzentration 0,5 % und der Feststoffanteil der Nanosuspension 5 % betrug. Diese Mischung wurde dann mit Mucus/Mucin wie oben angegeben vermischt. Vor den Messungen wurden die Eppendorfgefäße für 30 min. in ein temperiertes Wasserbad gelegt, um die Proben auf eine Temperatur von 25°C zu bringen.

Untersuchungen:

Die Proben wurden auf den Probenteller aufgebracht und für 5 min. vor der Messung ruhen gelassen, damit sich die Gerüststrukturen wieder aufbauen konnten.

Die Untersuchungen wurden mit einer Frequenz von 0,001-10 Hz durchgeführt.

In Abbildung 2-8 sind die Graphiken von Carbopol 934, Noveon AA-1 und Chitosan dargestellt.

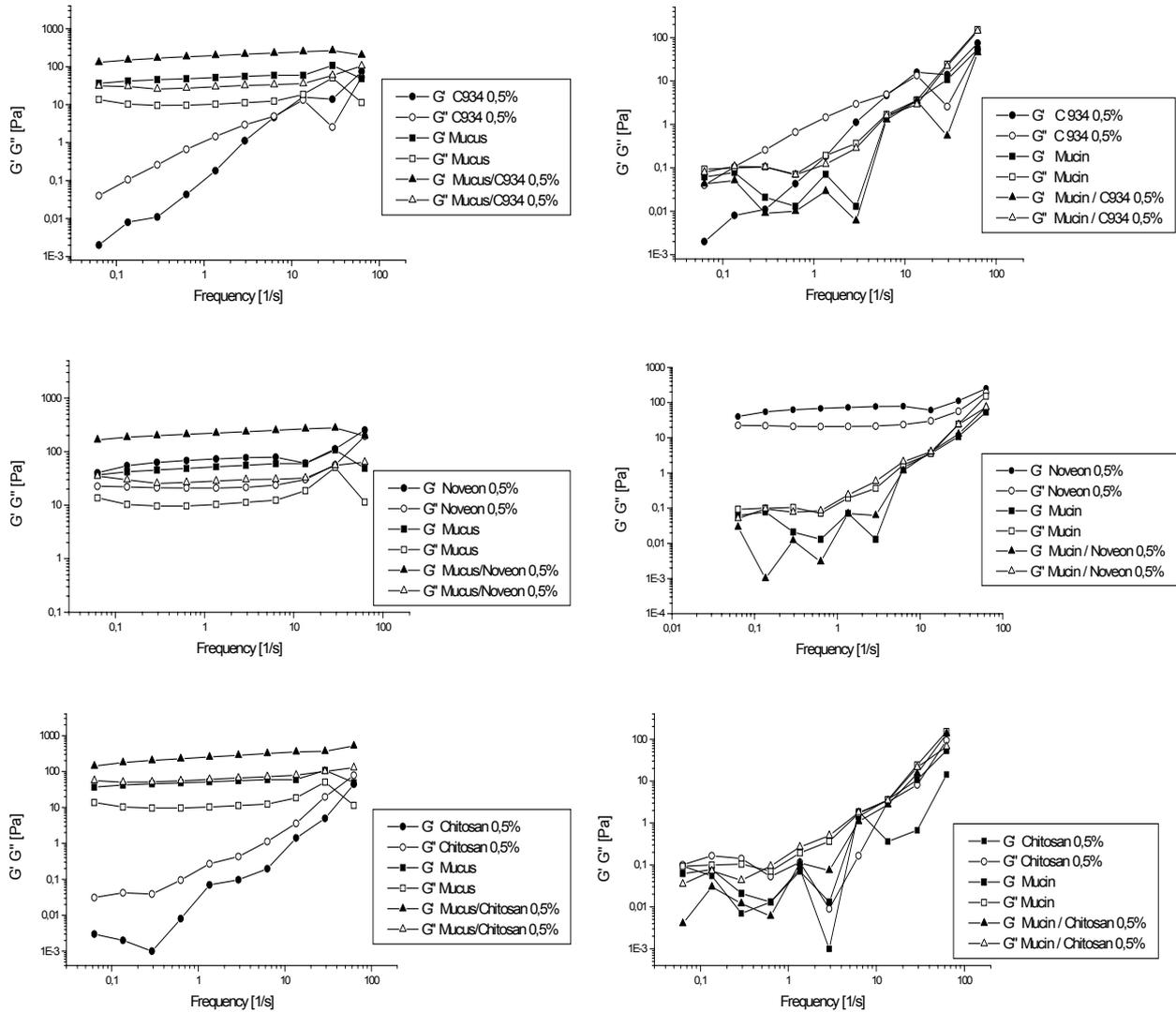


Abbildung 2-8: Frequenzsweep der Hydrogele, Polymeranteil 0,5 %, Mucus (linke Graphiken) bzw. Mucin (rechte Graphiken) und den Hydrogel/Mucus bzw. Mucin Gemischen.

Die linken Graphiken zeigen die untersuchten Hydrogele mit frischem Mucus. Die größte Festigkeit, dargestellt durch G' zeigt in jedem der drei linken Diagramme die Mischung aus Mucus und Hydrogel. Das aufgenommene Rheogramm aus Mucus und Hydrogel zeigt nicht nur die höchsten Werte für G' sondern auch ein Plateau, welches zeigt, dass durch den Frequenz Sweep die Struktur nicht wesentlich verändert wurde, und somit eine gefestigte Gelstruktur vorliegt [Petri et al., 2000]. Das kann auch schon für Mucus alleine festgestellt werden, jedoch ist in der Mischung mit Polymeren eine Steigerung erwirkt worden. Carbopol und Chitosan alleine haben keine sehr feste Gelstruktur bei einem Polymeranteil von 0,5 %, wie

an den ansteigenden Kurven zu erkennen ist. Nur das quervernetzte Noveon AA-1 kann auch ohne Mucus bei 0,5 % ein festes Gelgerüst ausbilden (mittlere Abbildung links). Auch hier ist aber noch ein Anstieg dieser Werte bei dem Gemisch Noveon AA-1-Mucus gegenüber den Einzelkomponenten erkennbar.

Diese Beobachtungen können mit dem aufgereinigten und wieder in Wasser dispergiertem Mucin nicht gemacht werden. Wie anhand des Frequenzsweeps von Mucin und auch schon anhand des Viskositätskoeffizienten erkennbar war, ist die Festigkeit der Gelgerüststruktur nur sehr gering ausgeprägt. Das zeigt, dass die Struktur, die Mucus im frischen Zustand besitzt, durch den Aufreinigungprozess irreversibel zerstört wird. Der Nachteil mit frischem Mucus zu arbeiten liegt jedoch darin, dass je nach Entnahmeort, Fütterstatus etc. die Zusammensetzung variiert und somit in-vitro Daten eventuell nicht immer gut bzw. direkt miteinander vergleichbar wären. Das kann mit hochaufgereinigtem Mucin umgangen werden. Jedoch gehen damit auch charakteristische Eigenschaften des Mucus verloren, und die Übertragung dieser in-vitro Daten auf in-vivo Verhältnisse ist nur bedingt möglich.

Berechnung der Parameter:

G' und G'' wurden, wie in obiger Gleichung dargelegt, berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-2 dargestellt.

Zusätzlich wurde $\tan \delta$ bestimmt. Es ist das Verhältnis von G'' zu G'. Ist $\tan \delta < 1$ handelt es sich um ein eher elastisches System und umgekehrt, wenn $\tan \delta > 1$ ist, handelt es sich eher um ein System mit flüssiger Charakteristik. Tabelle 2-1 zeigt die dynamischen Viskoelastizitätsparameter für Hydrogel, Hydrogel-Mucus bzw. Mucin, und Hydrogel-Nanosuspension/Mucus bzw. Mucin.

Tabelle 2-1: Die rheologischen Parameter G' und G'' wurden bei einer Frequenz von 1,351 Hz ermittelt.

Probe	G' [Pa]	G'' [Pa]	$\tan \delta$	$\Delta G'$ [Pa]	$\Delta G''$ [Pa]
Carbopol 934 0,5 %	13,12 (1,52)	16,46 (0,93)	1,25	-	-
0,5 % / Nanosus.	18,86 (15,74)	13,24 (0,83)	0,70	-	-
0,5 % / Mucus	21,80 (4,68)	4,47 (1,03)	0,20	3,08	-14,99
0,5 % / Mucin	0,073 (0,01)	0,251 (0,01)	3,44	-13,12	-16,40
0,5 % / Mucus / Nanosus.	23,70 (2,67)	14,87 (0,63)	0,09	-0,76	-1,37
0,5 % / Mucin / Nanosus.	0,029 (0,01)	0,121 (0,01)	4,17	-13,16	-19,58
Noveon AA-1 0,5 % %	73,11 (13,4)	20,94 (11,7)	0,29	-	-
0,5 % / Nanosus.	91,21 (14,74)	29,38 (7,64)	0,10	-	-
0,5 % / Mucus	222,05 (11,51)	28,30 (2,35)	0,13	143,34	4,36
0,5 % / Mucin	0,08 (0,01)	0,24 (0,01)	3,04	-73,15	-20,89
0,5 % / Mucus / Nanosus.	228,24 (15,21)	37,26 (1,78)	0,16	131,43	4,88
0,5 % / Mucin / Nanosus.	0,123 (0,01)	0,192 (0,01)	0,07	-291,16	-29,38
Chitosanchlorid 0,5 %	0,19 (0,07)	0,41 (0,04)	2,21	-	-
0,5 % / Nanosus.	0,109 (0,02)	0,151 (0,02)	1,38	-	-
0,5 % / Mucus	314,74 (2,94)	77,88 (2,76)	0,25	308,9	74,47
0,5 % / Mucin	0,110 (0,01)	0,262 (0,02)	2,38	-0,2	-0,338
0,5 % / Mucus / Nanosus.	305,03 (10,52)	72,58 (12,72)	0,24	299,32	69,43
0,5 % / Mucin / Nanosus.	0,093 (0,01)	0,265 (0,02)	2,85	-0,086	-0,076

Probe	G' [Pa]	G'' [Pa]	tan δ	$\Delta G'$ [Pa]	$\Delta G''$ [Pa]
Chitosan 0,5 %	0,08 (0,03)	0,20 (0,05)	2,50	-	-
0,5 % / Nanosus.	0,066 (0,01)	0,137 (0,01)	2,08	-	-
0,5 % / Mucus	881,86 (14,02)	194,09 (12,97)	0,22	876,2	190,89
0,5 % / Mucin	0,112 (0,02)	0,268 (0,03)	2,39	-0,09	-0,12
0,5 % / Mucus / Nanosus.	796,22 (46,83)	135,87 (23,19)	0,17	790,55	132,73
0,5 % / Mucin / Nanosus.	0,149 (0,02)	0,297 (0,01)	1,99	0,013	-0,03
Mucus	5,6 (0,76)	3,0 (1,03)	0,54	-	-
Mucin/Aqua dem.	0,07 (0,02)	0,19 (0,01)	2,72	-	-

Mittelwerte (\pm Standardabweichung); n=3, - = keine Daten errechenbar

Carbopol 934, Noveon AA-1, Chitosanchlorid und Chitosan zeigten bei den Proben mit Mucus positive Werte bei den Parametern $\Delta G'$ und $\Delta G''$, wobei insbesondere der Wert für G' ansteigt. Das bedeutet, die elastische Komponente ist in der entsprechenden Zusammensetzung erhöht. Das Gelgerüst ist im Gegensatz zu den Einzelkomponenten verfestigt. Das ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass Mucus und Hydrogel interagieren und somit eine Mucoadhäsion gegeben ist. Bei Applikation dieser Hydrogele würde sich die Kontaktzeit im Darm zwischen Hydrogel-Mucus im Gegensatz zu Hydrogelen und Polymeren, die nicht in diesem Maße mit Mucus interagieren, verlängern.

Die 10 %ige Mucin-Dispersion zeigt gar keine Erhöhung des elastischen Parameters $\Delta G'$. Aufgrund dieser Ergebnisse kann keine mucoadhäsive Interaktion zwischen Mucin und Hydrogelen gezeigt werden. Es ist davon auszugehen, dass durch den Aufreinigungsprozess, wie schon im oberen Abschnitt beschrieben, typische Charakteristika verloren gehen und somit Mucin für Untersuchungen zur Mucoadhäsion von Polymeren, zumindest mit dieser Methode, nicht geeignet ist.

Betrachtet man jeweils den $\tan \delta$ Wert, kann zusätzlich abgeschätzt werden, ob ein rheologischer Synergismus stattgefunden hat. Beträgt der Wert weniger als 1, so ist das ein Kennzeichen für eine eher elastische als eine viskose Charakteristik. Es fand also keine Verstärkung des Gelgerüsts statt, sondern das System wurde eher flüssiger.

Ein zweiter Weg, um das Ausmaß des rheologischen Synergismus abzuschätzen, kann erfolgen, indem man den relativen rheologischen Synergismus errechnet. Er beschreibt den relativen Zuwachs der Viskoelastizität in Bezug auf Polymer und Mucin Lösungen bzw. Mucus alleine und kann nach folgender Gleichung berechnet werden [Madsen et al., 1998; Riley et al., 2001]:

$$\Delta G' / G', \text{ wobei } G' = G' \text{ Polymer} + G' \text{ Mucus}$$

Dieses erlaubt den rheologischen Synergismus Effekt im Verhältnis zu den einzelnen Modulen der einzelnen Komponenten (unvermischt) auszudrücken. Abbildung 2-9 zeigt diese Werte für Carbopol 934, Noveon AA-1, Chitosanchlorid und Chitosan.

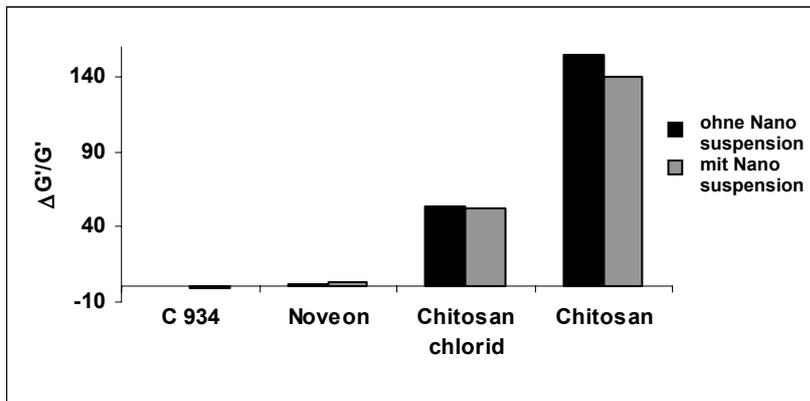


Abbildung 2-9: Der relative rheologische Synergismus, ausgedrückt als $\Delta G' / G'$, mit und ohne Nanosuspension.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die positiv geladenen Polymere Chitosan und Chitosanchlorid einen ausgeprägteren Effekt auf das "Gelstärkungsvermögen" ausüben als Carbopol 934 und Noveon AA-1. Das kann sicherlich auf die gegensätzlichen Ladungen von Chitosan-Mucus zurückgeführt werden. Vorhandene Nanopartikel in Form von Nanosuspensionen haben auf diesen Effekt, wenn auch nur im geringen Maße, einen negativen Einfluss. Das heißt, der mucoadhäsive Effekt wird durch die Anwesenheit von Nanosuspensionen reduziert.

Es wird allgemein angenommen, die Wechselwirkungen zwischen Mucus und mucoadhäsivem Polymer beruhen auf nichtkovalenten Bindungen, hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen und Kettendurchdringung [Harding et al., 1999]. Die Ergebnisse dieser Studie würden diese Theorie unterstützen. Um einen Gelverstärkungseffekt zu erreichen, muss das Gelnetzwerk mehr Bindungsstellen bekommen oder durch Kettendurchdringung eine größere Verwirrung der Ketten erreicht werden. Beide Polymerarten sind geladen, dadurch stoßen sich die Ketten voneinander ab, sind also nicht untereinander "verknäult" (bei Carbopol und Noveon AA-1 im neutralen pH-Bereich). Somit hätten beide Arten von Polymeren ähnliche Chancen sich mit dem Mucin zu "verwirren/verknäulen". Ein entscheidender Unterschied ist, dass Chitosan und Carbopol lineare Moleküle sind während Noveon AA-1 verzweigt ist. Ein weiterer entscheidender Unterschied zwischen Carbopol (-derivaten) und Chitosan sind die Wechselwirkungen der Aminogruppen des positiv geladenen Chitosans (sowie des Chitosanchlorids) und den negativ geladenen Sialinsäurereste des Mucins, die sehr viel stärker ausgeprägt sind als die der negativ geladenen Polyacrylsäurederivate Carbopol 934 und Noveon AA-1 und des negativ geladenen Mucins.

7.2.4 In-vivo Testung Buparvaquons gegen *Cryptosporidium parvum*

Im Gegensatz zu Leishmanien lassen sich Cryptosporidien in der Kultur nicht ohne Feederzellen anzüchten. Dieses hat Konsequenzen für den Aufwand und die Pflege der Kulturen, sowie für die Methodik der Bestimmung der Restvitalität. Diese kann in vitro nicht mit Hilfe des MTT-Assay erfasst werden, da auch die sogenannten human ileocecal adenocarcinoma cells (HCT-8 Zellen) als Feederzellen einen positiven Grundumsatz geben. Auf der anderen Seite muss gewährleistet sein, dass bei Wirkstofftestungen eine ausreichend geringe Zytotoxizität für die HCT-8 Zellen besteht.

Cryptosporidien-Stämme wurden aus infizierten Mäusen gewonnen und mit Hilfe der Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten aufgereinigt, dann sterilisiert und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen. Das Verfahren lehnt sich an die Vorschrift von Nesterenko und Upton an [Upton et al, 1994; Woods et al., 1995; Nesterenko et al., 1997; Nesterenko et al., 1999]. Die Untersuchung der anti-Cryptosporidien-Wirkung erfolgt nach den Vorschriften von Woods 1998, [Woods und Upton 1998; Waters und Harp, 1996].

Die Nanosuspensionen wurden wie folgt getestet:

Oocysten wurden in Loch Mikrotiterplatten gegeben, in denen HCT-8 Zellen eingesät wurden. Die Platten wurden 90 min bei 37°C inkubiert und gewaschen. Neues Nährmedium und Test- wie Referenzsubstanzen wurden in Verdünnungsserien zugegeben und die Parasiten wurden 48 h bei 37°C inkubiert. Detektion erfolgt durch ELISA Messung (enzyme-linked immunoabsorbent assay) mit Ratten-anti-Cryptosporidien-Antiserum. Nach Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin wurde die optische Dichte bei 630 nm im automatischen ELISA-Gerät gemessen.

C. parvum ist ein weltweit verbreiteter und bedeutender Erreger von Durchfällen bei Kälbern und schwersten Durchfallerkrankungen bei immunsupprimierten Menschen. CD4+ T Zelldefekte (TCR-(-defiziente) Mäuse vermögen den Erreger spontan nicht zu eliminieren, so dass sie ein geeignetes Modell sind, die Infektionsbedingungen bei einer HIV-Infektion mit anschließender Immunsuppression nachzuahmen.

Der Infektionsversuch:

Buparvaquon wurde oral verabreicht. Die Arzneiformulierung muss den Bedingungen und der Dauer der Magen-Passage widerstehen, und am Darmepithel ihre Wirksamkeit entfalten. Gewünscht ist keine bzw. nur eine geringe Absorption, um systemische Nebenwirkungen zu vermeiden. Am Ende des Versuches werden überlebende *C. parvum* Sporozoite auf einer definierten Fläche des Dünndarmepithels mikroskopisch gezählt. Angegeben wird die Reduktion der Besiedlung verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren als sogenannter "Infectivity Score" (IS) (Infektionsgrad). Dieser liegt zwischen den Werten 0 und 2, wobei 0 völlige Heilung und 2 keinen signifikanten Unterschied zu unbehandelten Kontrollen bedeutet.

Von der Durchführung werden TCR-defiziente neonatale Mäuse oral mit *C. parvum* Oocysten infiziert, und nach ca. 8 Tagen Inkubation die Test-, Referenzsubstanzen und verschiedene Formulierungen oral verabreicht. Nach vier Behandlungszyklen werden die Tiere nach ca. 16 Tagen getötet; das Dünndarmepithel herauspräpariert und die *C. parvum* Sporozoite werden mikroskopisch gezählt.

Aufgrund der Ergebnisse aus den technologischen Vorversuchen wurde Buparvaquon mit Chitosan als Hydrogelbildner zu mucoadhäsiven Nanosuspensionen formuliert und in in vivo Infektionsmodellen getestet. Die Viskosität der mucoadhäsiven Nanosuspension lag bei 1820 mPa*s, die eine Gabe per Schlundsonde erlaubte. Wie in Tabelle 2-1 dargestellt, führt die Einbettung in eine Chitosan-Hydrogelmatrix bei gleichzeitig reduzierter Dosierung zu einer fast vollständigen Heilung der infizierten Tiere. Mechanistisch kann der positive Effekt des Chitosan so erklärt werden, dass sich ein Film über den gesamten Gastrointestinaltrakt legt. Zwar wird dieser durch die physiologische Nachbildung des Mucus nach circa 45 bis 60 Minuten abgetragen, aber so reicht die Kontaktzeit aus, um eine deutliche Reduktion der Cryptosporidien zu erzielen. Ein weiterer Vorteil des Einsatzes mucoadhäsiver Systeme ist die bereits starke Reduktion der Parasitenlast in den oberen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes, was von einfachen Nanosuspensionen und dem in DMSO gelösten Wirkstoff nicht geleistet werden kann. Kritisch anzumerken bleibt, dass durch den Einsatz von Chitosan ein Effekt auf die Öffnung der Tight-Junctions zu erwarten ist [Borchard et al., 1996; Junginger et al., 1999]. Dadurch kann der Wirkstoff verstärkt adsorbiert werden und systemisch zu unerwünschten Begleitwirkungen führen. Versuche zur Bestimmung der Aufnahme mit Hilfe der HPLC-Technik konnten nicht durchgeführt werden, da bei den neonatalen Mäusen mit einem Geburtsgewicht von 5 bis 8 g und erfolgter Entnahme des Gastrointestinaltraktes keine verlässliche Gewinnung von Plasma durchgeführt werden konnte.

Tabelle 2-1: Bestimmung der in vivo Aktivität Buparvaquons in DMSO gelöst (0,67µg/kg KG) und als Nanosuspension mit einer Dosis von 0,33 µg/kg KG* im neonatalen immunsupprimierten Mausmodell.

Stoff / Formulierung	Infektions- grad Jejunum	Infektions- grad Cäcum
Kontrolle	2,0	2,0
Ribavarin	0,75	0,69
Paromycin	1,46	0,90
Buparvaquon		
- in DMSO gelöst	1,56	1,46
- als Nanosuspension	1,25	0,52
- mucoadhäsive Nanosus- pension mit Chitosan	0,63	0,42

Der Effekt der mucoadhäsiven Nanosuspensionen konnte auch histologisch gezeigt werden. Darmsegmente behandelter Tiere wurden nach der Autopsie und Bestimmung des Infektionsgrades fotografiert. Die Abbildung 2-10 zeigt einen unbehandelten, infizierten Gastrointestinaltrakt einer Maus

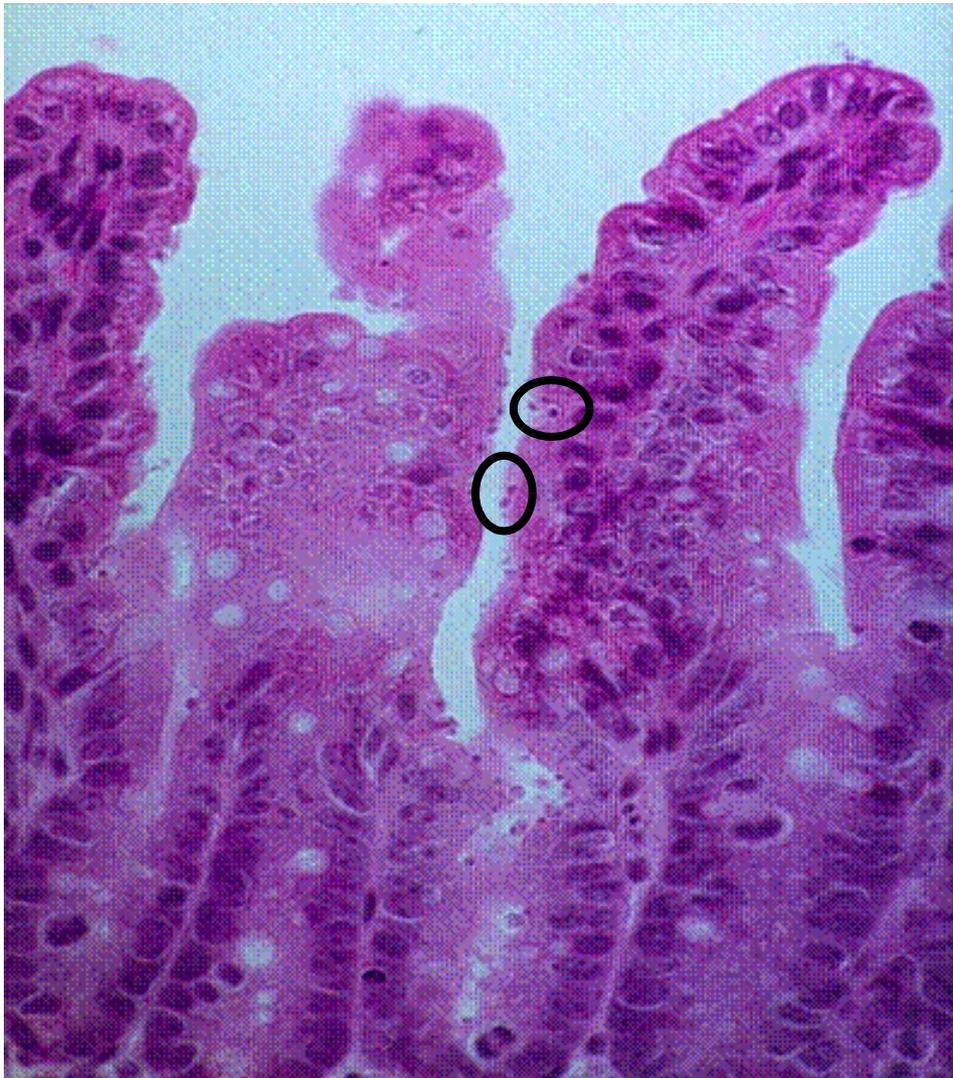


Abbildung 2-10: Histologische Untersuchungen des infizierten Darms der infizierten neonatalen SCID-Mäusen (Giemsa-Färbung), beispielhaft sind einige Cryptosporidien eingekreist.

Die Cryptosporidien sind als dunkle Punkte auf und dicht unterhalb des Epithelium der Darmzotten zu sehen.

Nach Behandlung mit mucoadhäsiven Nanosuspension (Abb. 2-11) zeigt sich eine deutliche Verbesserung des Infektionsstatus.

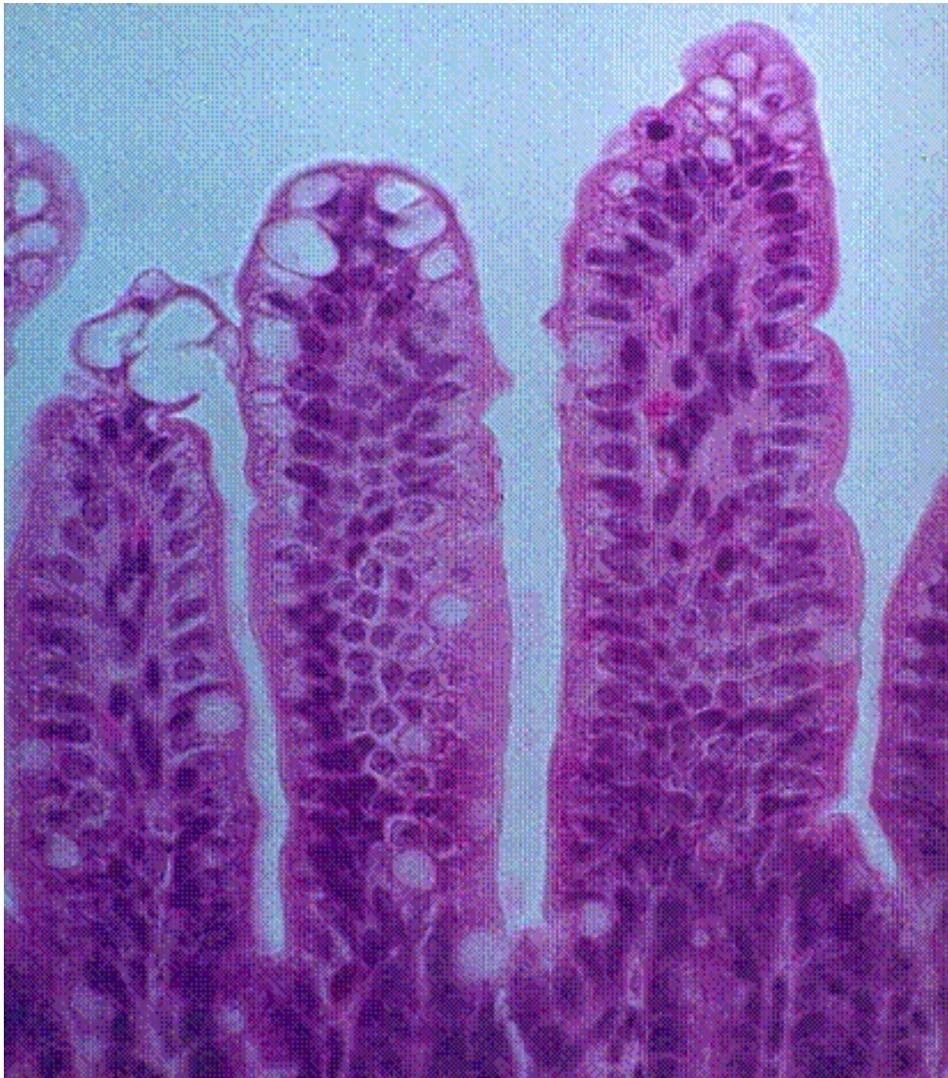


Abbildung 2-11: Histologische Untersuchungen der mit Buparvaquon behandelten infizierten neonatalen SCID-Mäusen (Giemsa-Färbung).

Lokale Infektionsherde sind nicht mehr ersichtlich sind. Die sichtbaren Aufhellungen sind auf Rupturen zurückzuführen, die auf die Schneidetechnik zurückzuführen sind.

7.3 Zusammenfassung

Es wurden verschiedene Methoden zur Erfassung bzw. Messung von Mucoadhäsion getestet. Dabei wurde festgestellt, dass sich nicht alle Testsysteme gleich gut eignen. Die geringste Aussagekraft hatten die Methoden, mit denen die direkte Anhaftung gemessen wurde. Das mag zum einen an der Ungenauigkeit der Messmethode gelegen haben, zum anderen daran, dass mit diesen Methoden kein genauer Aufschluss über die Adhäsivität von Polymer - Mucus zu erlangen war, da dieser Effekt möglicherweise von der Kohäsion im Polymer und/oder Mucus überlagert wurde. Mit diesen beiden Methoden konnten daher keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden, die besagen welches der Polymere die größte Mucoadhäsion besitzt. Als geeigneter zeigten sich die rheologischen Untersuchungen, um das Zusammenspiel von Mucus bzw. Mucin und Polymer zu ermitteln. Es konnte festgestellt werden, dass der Ersatz von aufgereinigtem Mucin an Stelle von frischem Mucus nicht sinnvoll erscheint. Soll eine in-vitro in-vivo Korrelation gefunden werden, ist frisches Mucus vorzuziehen. Mit Mucin konnten keine Wechselwirkungen Polymer - Mucin gefunden werden. Außerdem konnte eine Rangfolge innerhalb der untersuchtenen Polymere bezüglich ihres mucoadhäsiven Potenzials aufgestellt werden.

Nanosuspensionen haben auf die Adhäsivität der Systeme einen nur geringen negativen Einfluss, obwohl sie einzeln vermessen mucoadhäsive Eigenschaften besitzen. Diese sind aufgrund ihres geringen Durchmessers gegeben. Das bewirkt jedoch keine Verstärkung der Mucoadhäsion der Nanosuspension-Hydrogelsysteme, wie anhand der rheologischen Messungen gezeigt werden konnte. Trotz dieser Befunde konnte in-vivo durch die Inkorporation von Nanosuspension in mucoadhäsive Hydrogele bzw. Polymere ein verstärkter Effekt erzielt werden, wie durch die Versuche an Mäusen gezeigt werden konnte.