

Marcin ODZIOMEK, Tomasz R. SOSNOWSKI, Leon GRADON

e-mail: m.odziomek@ichip.pw.edu.pl

Katedra Inżynierii Procesów Zintegrowanych, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Funkcjonalny nośnik dla leków inhalacyjnych – wytwarzanie, właściwości, skuteczność

Wstęp

Skuteczność leczenia inhalacyjnego jest ograniczona przez śluzowo-rzęskowy mechanizm oczyszczania płuc. Zabezpiecza on drogi oddechowe, a tym samym także cały organizm przed szkodliwym działaniem obecnych w powietrzu zanieczyszczeń i patogenów. Integralną częścią tego mechanizmu jest pokrywająca nabłonek dróg oddechowych warstwa śluzu oraz tzw. komórki migawkowe, których zadaniem jest usuwanie w kierunku gardła śluzu wraz ze zdeponowanymi na jego powierzchni ciałami obcymi. Opisany mechanizm bardzo skutecznie spełnia swoją funkcję, lecz niestety przyczynia się także do ograniczenia efektywności leczenia wziewnego. Dotyczy to głównie stanów chorobowych, w których grubość oraz stopień sieciowania śluzu oskrzelowego znacznie wzrasta. Powoduje to, że skuteczny transport leków do komórek nabłonka jest utrudniony, a tym samym efekt terapeutyczny związany z inhalacją leku aerozolowego często nie jest osiągany [Cone, 2009].

Stosując metody inżynierii chemicznej, podjęto działania zmierzające do wytworzenia i scharakteryzowania cząstek umożliwiających efektywne dostarczenie leków inhalacyjnych w głąb drzewa oskrzelowego oraz modyfikujących strukturę śluzu dla zwiększenia szybkości transportu leków do receptorów komórek nabłonka dróg oddechowych [Odziomek i in., 2012]. Do ich wytworzenia niezbędne było wykorzystanie substancji, które zapewniałyby pożądaną efekt leczniczy, a jednocześnie nie powodowałyby efektów ubocznych. Dlatego też, cząstki nośników zostały wytworzone metodą suszenia rozpyłowego z wodnych roztworów zawierających substancje o cechach mukolitycznych, które są obecnie dopuszczone do stosowania w farmaceutykach (N-acetylocysteina) lub oczekują na takie dopuszczenie (niskocząsteczkowy dekstran). N-acetylocysteina (NAC) została użyta jako składnik redukujący mostki disiarczkowe łączące pojedyncze molekuly głównego składnika śluzu – mucyn w długie, gęsto splecione łańcuchy. Do stabilizacji wytworzonych cząstek wykorzystano natomiast niskocząsteczkowy dekstran (4 kDa), który po depozycji w drogach oddechowych wpływa jednocześnie na zwiększenie uwodnienia śluzu [King i Rubin, 2002]. Zgodnie z przyjętą koncepcją połączone działanie obu substancji ma usprawnić działanie mechanizmu śluzowo-rzęskowego i spowodować zmniejszenie grubości warstwy śluzu. Jednocześnie ograniczenie ilości oddziaływań pomiędzy składnikami śluzu ma przynieść poprawę transportu leków do komórek nabłonka oskrzeli.

Według zaproponowanego rozwiązania nośnik zawierający NAC i dekstran dostarczany ma być razem z lekiem w głąb dróg oddechowych. Jako że skuteczność wziewnego dostarczania leków jest ściśle związana ze średnicą aerodynamiczną cząstek aerozolu, do wytworzenia tego typu proszków wykorzystano metodę umożliwiającą kontrolowanie tego parametru – suszenie rozpyłowe. Warunki procesowe dobrano w sposób zapewniający wytworzenie produktu charakteryzującego się jak największym udziałem cząstek o średnicy poniżej 5 μm tworzących tzw. frakcję cząstek drobnych FPF (*Fine Particle Fraction*). Według danych literaturowych cząstki tej wielkości deponują się w drzewie oskrzelowym z najwyższą skutecznością [Heyder, 2004]. Wskaźniki terapeutyczne (FPF oraz MMAD – mediana rozkładu masowego) uzyskane po rozproszeniu wytworzonych proszków w komercyjnym inhalatorze kapsułkowym potwierdziły ich odpowiednie z medycznego punktu widzenia parametry (FPF 46÷51%, MMAD 2,28÷2,43 μm). Stabilność tych parametrów jest w dużej mierze uzależniona od tendencji proszków do rekryształizacji pod wpływem temperatury i wilgoci. Jak jednak pokazuje wysoka wartość temperatury zeszklenia T_g (51±61°C), otrzymane proszki powinny charakteryzować się wystarczającą stabilnością

podczas przechowywania w warunkach standardowych. Wyniki badań dotyczące właściwości aerozolowych otrzymanych proszków zostały szczegółowo opisane w pracy [Odziomek i in., 2012].

Dla pełniejszej oceny przydatności funkcjonalnych nośników niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań dotyczących oddziaływania funkcjonalnych nośników ze śluzem oskrzelowym. W niniejszej pracy za pomocą wiskozymetru rotacyjnego określono wpływ nośników oraz ich składników na lepkość sztucznego odpowiednika śluzu. Ponadto, przebadano wpływ modyfikacji śluzu wywołanych przez wprowadzanie cząstki na wartość efektywnego współczynnika dyfuzji substancji modelującej lek inhalacyjny.

Metodyka

Sztuczny śluz oskrzelowy został przygotowany zgodnie z procedurą opisaną w pracy [McGill i Smyth, 2010]. Kluczowym elementem tej procedury było sporządzenie 20% mas. roztworu mucyny (*Sigma Aldrich*; M2378, type II) w buforze fosforanowym o pH 7,4. W celu zabezpieczenia śluzu przed rozwojem mikroorganizmów dodano do przygotowanego roztworu niewielką ilość (0,05% mas.) azjduku sodu.

Wartość pH wpływa zarówno na strukturę śluzu, jak i na aktywność składnika mukolitycznego NAC. Dlatego też, w prowadzonych badaniach pH było ściśle kontrolowane i precyzyjnie ustawiane za pomocą wodnego roztworu NaOH. Po ustawieniu wartości pH próbki były poddane mieszanemu przez co najmniej 24 h, w temperaturze 37°C. Przygotowanie docelowych próbek poddawanych badaniom lepkości lub dyfuzji polegało na dodaniu do przygotowanego śluzu zadanych ilości analizowanych substancji: NAC, dekstran, cząstki nośnika DA-1 (dekstran/NAC – 4:1) oraz DA-2 (dekstran/NAC – 1:1).

Pomiar lepkości

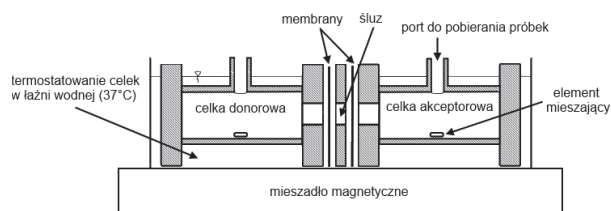
Lepkość śluzu została zmierzona za pomocą wiskozymetru rotacyjnego (*Fungilab – Smart series*, Hiszpania). Aby zapewnić możliwość porównywania uzyskiwanych wyników pomiaru każdej z badanych próbek prowadzone były z identyczną prędkością obrotową wrzeczona pomiarowego (6 rpm), tj. przy jednakowej szybkości ścinania $\dot{\gamma} = 8 \text{ s}^{-1}$. Wybrana wartość $\dot{\gamma}$ mieści się w zakresie szybkości ścinania, jakim poddawany jest śluz w warunkach fizjologicznych ($0,1 \div 20 \text{ s}^{-1}$). [Cone, 2009]. Wszystkie pomiary lepkości prowadzone były w stałej temperaturze 37°C (warunki fizjologiczne).

Badania prowadzone były w czterech seriach pomiarowych z zachowaniem trzykrotnego powtórzenia każdej z nich. W pierwszych dwóch seriach określono wpływ substancji wchodzących w skład funkcjonalnych nośników na lepkość śluzu (NAC, dekstran). W kolejnych dwóch zbadano efekt jaki wywierają na śluz funkcjonalne nośniki DA-1 oraz DA-2. W każdej serii pomiarowej udział badanych substancji w śluzie stopniowo wzrastał (0; 0,5; 1; 2% mas.).

Pomiar transportu masy przez warstwę śluzu

Wartość efektywnego współczynnika dyfuzji D_e rodminy B w sztucznym odpowiedniku śluzu oskrzelowego wyznaczono z wykorzystaniem celek dyfuzyjnych własnej konstrukcji (Rys. 1)

Układ składał się z celki donorowej oraz akceptorowej o objętości 3 cm^3 każda. Pomiędzy celnkami umieszczono dodatkowy element o grubości 2 mm, a po obu jego stronach dwie membrany *Durapore* z polifluorku winylidenu – PVDF (*Millipore*, USA). Próbkę badanego śluzu umieszczano była wewnątrz wycięcia (średnica – 8 mm) wykonanego wewnątrz elementu centralnego.



Rys. 1. Schemat układu do badania transportu rodamininy B w warstwie śluzu

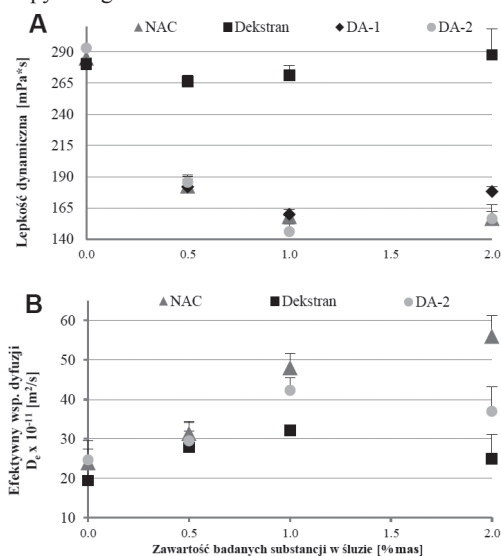
Celki donorowe były wypełnione roztworem barwnika fluorescencyjnego rodamininy B o stężeniu 0,05 mg/ml, natomiast celki akceptorowe – buforem fosforanowym (pH 7,4). Zawartość obu celek była stale mieszana w celu zredukowania lokalnych oporów wnikania masy występujących przy membranach. Próbkę cieczy z celki akceptorowej były pobierane do analizy w półgodzinnych odstępach czasowych w trakcie 6-godzinnej eksperymentu. Na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji określano zawartość barwnika w analizowanych próbkach. Pomiar prowadzono z użyciem spektrofotometru Lumina (Thermo Scientific, USA) pracującego przy długości fali wzbudzenia – 555 nm i emisji – 580 nm. W badaniach posłużono się krzywą wzorcową, sporządzoną dla dwunastu wodnych roztworów rodamininy B o znanym stężeniu.

Efektywny współczynnik dyfuzji D_e został wyznaczony wg metodyki zaproponowanej w literaturze [Desai, 1991], stosując pierwsze prawo Ficka. Założenie o przebiegu procesu w stanie ustalonym było podjęte przyjęciem stałości gradientu stężenia rodamininy podczas eksperymentu, co jest uzasadnione przez bardzo dużą różnicę stężeń trasaera w celce donorowej i akceptorowej w trakcie całego eksperymentu.

Badania prowadzone były w trzech seriach pomiarowych z trzykrotnym powtórzeniem każdej z nich. W pierwszych dwóch seriach określono wpływ czystej NAC oraz dekstranu, natomiast w trzeciej – wpływ nośników DA-2. W każdej serii pomiarowej udział badanych substancji w śluzie był coraz wyższy (0; 0,5; 1 i 2% mas.).

Wyniki i dyskusja

Lepkość śluzu po dodaniu czystej NAC jak i cząstek funkcjonalnego nośnika DA-1 oraz DA-2 jest znacząco zredukowana (Rys. 2A). Jest to prawdopodobnie związane z redukcją mostków disiarczkowych łączących pojedyncze cząsteczki mucyn. Świadczy to o zachowaniu aktywności składnika mukolitycznego – N-acetylocysteiny podczas procesu suszenia rozpyłowego.



Rys. 2. Wpływ modyfikacji śluzu wywołanych przez badane substancje na: (A) lepkość oraz (B) wartość efektywnego współczynnika dyfuzji D_e rodamininy B. Na wykresach pokazano wartość średnią \pm SD (trzy powtórzenia)

Lepkość śluzu obniża się wraz ze wzrastającą zawartością NAC w badanych próbkach. Jest to widoczne zarówno w przypadku próbek z dodatkiem czystej NAC, jak i funkcjonalnych nośników o różnych proporcjach NAC i dekstranu. Redukcja lepkości związana z cząstkami

DA-2 jest na poziomie średnio $10 \pm 15\%$ wyższym niż w przypadku cząstek DA-1, na co może jednak mieć również wpływ mniejsza zawartość dekstranu w tych cząstkach. Jak wykazały przeprowadzone badania, dodatek czystego dekstranu powoduje nieznaczny (o $10 \pm 20\%$) wzrost lepkości śluzu. Wyniki te wskazują, że obserwowana w warunkach *in vivo* aktywność mukolityczna dekstranu jest związana głównie z mechanizmem osmotycznym.

Wyznaczone wartości efektywnego współczynnika dyfuzji D_e rodamininy B w śluzie zostały przedstawione na rys. 2B. Uzyskane wyniki wskazują na istnienie wyraźnych zależności pomiędzy lepkością śluzu, a intensywnością transportu masy. Współczynnik D_e wyznaczony dla rodamininy B (masa molowa, $M_r = 479$ g/mol) w przypadku transportu przez niezmodyfikowany śluz jest na poziomie $20 \pm 25 \cdot 10^{-11}$ m²/s, co jest wartością około 5-krotnie mniejszą niż współczynnik dyfuzji rodamininy B w czystym buforze ($119 \cdot 10^{-11}$ m²/s). Uzyskane wyniki są zgodne z dostępnymi danymi literaturowymi dla substancji o podobnej wielkości cząsteczek (np. fenoloftaleina $M_r = 318$ g/mol; $D_e = 18 \cdot 10^{-11}$ m²/s; difosforan fenoloftaleiny $M_r = 566$ g/mol; $D_e = 33 \cdot 10^{-11}$ m²/s) [Desai, 1991]. Pomiar przeprowadzony dla czystego dekstranu wykazuje nieznaczny wzrost współczynnika D_e do wartości $32 \cdot 10^{-11}$ m²/s w przypadku, gdy jego stężenie w śluzie nie przekracza 1% mas. Powyżej tego stężenia wartość współczynnika D_e zmniejsza się, co jest najprawdopodobniej związane ze wzrostem usieciowania śluzu. Początkowy wzrost współczynnika D_e może wynikać z silnych właściwości higroskopijnych dekstranu, sprzyjających lepszemu uwodnieniu badanej próbki, a także ograniczeniu oddziaływań pomiędzy składnikami śluzu. Wartość współczynnika D_e rodamininy B dla śluzu ze wzrastającą zawartością NAC zwiększa się osiągając $58 \cdot 10^{-11}$ m²/s (dla zawartości 2% mas.), co jest wartością dwukrotnie wyższą niż dla czystego śluzu. W przypadku modyfikacji śluzu przez funkcjonalne nośniki DA-1 maksymalna osiągnięta wartość D_e jest równa $43 \cdot 10^{-11}$ m²/s (zawartość: 1% mas.). Większy dodatek cząstek DA-1 prowadzi do zmniejszenia wartości współczynnika D_e rodamininy co jest prawdopodobnie związane z wyższą zawartością dekstranu w wytworzonych cząstkach.

Wnioski

Modyfikacja struktury sztucznego śluzu wywołana przez opracowane funkcjonalne prozkowe nośniki leków inhalacyjnych, a także przez ich indywidualne składniki wywiera znaczny wpływ na wartość efektywnego współczynnika dyfuzji wyznaczonego dla rodamininy B w śluzie. Zauważalny jest również wyraźny wpływ tych dodatków na lepkość śluzu.

Uzyskane rezultaty potwierdzają, że koncepcja funkcjonalnych nośników może być użyteczna na polu wziewnego dostarczania leków. Dla pełnego scharakteryzowania użyteczności cząstek tych nośników niezbędne jest jednak przeprowadzenie dalszych badań, uwzględniających szerszą grupę leków, zróżnicowanych pod względem masy cząsteczkowej, stopnia hydrofobowości i własności jonowych.

LITERATURA

- Cone R.A., 2009. Barrier properties of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 75-85. DOI: 10.1016/j.addr.2008.09.008
- Desai M.A., Vadgama P., 1991. Estimation of effective diffusion coefficients of model solutes through gastric mucus: Assessment of a diffusion chamber technique based on spectrophotometric analysis. *Analyst.* **116**, 1113-1116. DOI: 10.1039/AN9911601113
- Heyder J., 2004. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, **1**, nr 4, 315-320. DOI: 10.1513/pats.200409-046TA
- King M., Rubin B.K., 2002. Pharmacological approaches to discovery and development of new mucolytic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 1475-1490. DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00156-4
- McGill S.L., Smyth H.D., 2010. Disruption of the mucus barrier by topically applied exogenous particles. *Mol. Pharm.* **7**, nr 6, 2280-2288. DOI: 10.1021/mp100242r
- Odziomek M., Sosnowski T.R., Gradoń L., 2012. Conception, preparation and properties of functional carrier particles for pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.* **433**, 51-59. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.067

Projekt został częściowo sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji DEC-2011/03/N/ST8/04912.