

Paulina JAWORSKA, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA

e-mail: paulina.jaworska@pwr.wroc.pl

Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Wykorzystanie polimerowych membran do dozowania substancji

Wprowadzenie

Systemy kontrolowanego dostarczania leku DDS (*Drug Delivery System*) to obecnie bardzo intensywnie rozwijająca się dziedzina badań, łącząca elementy klasycznej chemii i nowoczesnej biotechnologii [Charman i in., 1999]. Zadaniem DDS jest uwolnienie takiej ilości substancji leczniczej, która jest konieczna do uzyskania tzw. efektu terapeutycznego a następnie długotrwałe utrzymanie stosunkowo stałego stężenia leku na tym poziomie, przy jednoczesnym ograniczeniu efektów niepożądanych.

Kluczową rolę w tworzeniu nośników pełnią polimery, zarówno naturalne jak i sztuczne, które spośród innych wyróżnia fakt biokompatybilności z tkankami ludzkimi.

Zainteresowanie tymi materiałami przy tworzeniu nośników leków wynika z faktu, że:

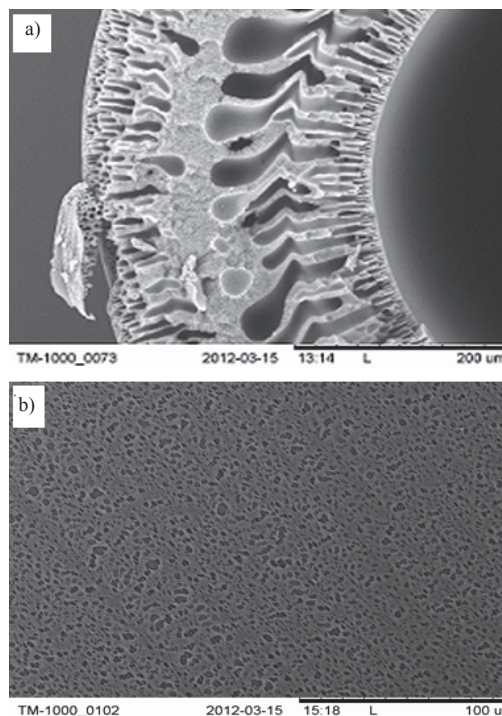
- wiele substancji leczniczych charakteryzuje się niską rozpuszczalnością w wodzie, zatem zachodzi potrzeba ich rozpuszczania w materiale nośnika;
- wiele leków charakteryzuje niską stabilność i w związku z tym wymagają utworzenia mikrośrodowiska otaczającego cząsteczkę i stanowiącą ochronę przed niekontrolowaną hydrolizą czy też degradacją enzymatyczną;
- niektóre leki wykazują dużą toksyczność, więc wymagany jest nośnik, który zabezpieczy lek przed zbyt wczesnym uwolnieniem i zapewni jego dotarcie do właściwych tkanek;
- proces uwalniania leku z nośnika może być kontrolowany, a zatem uzyskiwany jest pożądaný, długotrwały efekt terapeutyczny [Yang i Alexandridis, 2000].

Celem niniejszej pracy było doświadczalne wykazanie na przykładzie substancji modelowej – witaminy B12 (cyjanokobalaminy) możliwości wykorzystania membran do kontrolowanego spowolnienia transportu masy.

Materiały i metody

W przedstawionej pracy zbadano uwalnianie substancji modelowej (witaminy B12) ze struktur polimerowych, których wnętrze stanowił alginian sodu (r-r 1,5% w/v płynny lub sieciowany w 2% CaCl₂ przez 1 h, otrzymywany w postaci kapsułek o średnicy 3,8·10⁻³ m) lub roztwór wodny badanej substancji. Usieciowane kapsułki upakowywano bardzo ciasno we wnętrzu rurki a wolne przestrzenie między kapsułkami wypełniono wodą (stanowiła ona około 50% całej objętości światła rurki). Media wypełniające wnętrza membran nie były poddawane cyrkulacji. Alginian sodu (otrzymywany z brązowych alg, lepkość ≥ 2,000 cP) zakupiono w *Sigma-Aldrich*.

Otoczkę rdzenia stanowiła membrana polimerowa z octanu celulozy lub z polieterosulfonu. Można przyjąć, że we wszystkich testowanych układach pory membran wypełnione były wodą. Wykorzystane w eksperymencie celulozowe membrany wyprodukowane przez *Spectra/Por® Biotech* dostarczone były przez firmę *Sigma-Aldrich*. Czynnikiem ograniczającym wybór struktury polimerowej była wielkość cząsteczki witaminy B12 (1355 Da). Pory membrany musiały być na tyle duże, by umożliwić cząsteczkom ich swobodną dyfuzję. Stąd do badań wybrano dwa typy membran celulozowych: jedną o wielkości porów w granicach 3,5–5 kDa, drugą w przedziale 8–10 kDa. Są to membrany o porach asymetrycznych, rozszerzających się nietypowo do wnętrza rurki o średnicy 10mm, grubość ścianki wyznaczono na ok. 120 μm (Rys. 1). Ponieważ producent nie dostarczył informacji na temat stopnia porowatości, na podstawie wykonanego zdjęcia (Rys. 1b) oszacowano, że porowatość $\epsilon = 0,3$.



Rys. 1. Zdjęcia własne membrany z octanu celulozy o punkcie odcięcia 3,5–5 kDa: a) przekrój poprzeczny, powiększenie 400×, b) powierzchnia zewnętrzna, powiększenie 800×

Moduł zawierający asymetryczne kapilary (gr. ścianki 150 μm, średnica wewn. 550 μm) wytworzone z polieterosulfonu o rozdziale 10 kDa zakupiono w *IBIB-PAN*, Warszawa. Porowatość tych membran przyjęto jako równą 0,5.

Prowadzono również badania porównawcze dla kapsułek alginianowych bez otoczki membranowej. Substancja modelowa zamknięta w ich wnętrzu uwalniana była do wody w kolbie umieszczonej na wytrząsarce płytowej. We wszystkich przypadkach umieszczenie początkowe wit. B12 we wnętrzu nośnika substancji było z zakresu 1÷19 g/l.

Testując polimerowe nośniki leków przyjęto następujące założenia:

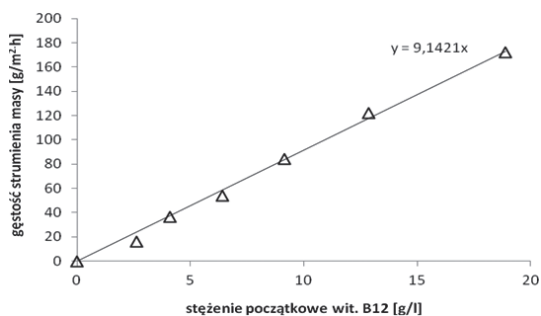
- Badany składnik jest transportowany na drodze dyfuzji;
- Cała objętość wewnętrzna kapilary, rurki wypełnionej odpowiednim medium jest dostępna dla substancji modelowej i odpowiada jej objętości geometrycznej;
- W warunkach początkowych wnętrza nośnika substancji traktuje się jako homogeniczny układ z jednakowym rozkładem stężeń w przekroju;
- Nie zachodzi adsorpcja składnika uwalnianego na powierzchni nośnika.

Proces prowadzono okresowo, w temperaturze 24°C, w warunkach burzliwego przepływu ($Re = 0,65$ l/h) po stronie odbioru substancji do momentu osiągnięcia stanu równowagi. Rdzeń membrany pozostawał nieruchomy. Wartość gęstości strumienia początkowego była obliczana na podstawie zmian stężenia w roztworze na zewnątrz membrany w pierwszych 48 godzinach, co odpowiadało < 10% uwolnienia masy początkowej.

Stężenie uwolnionej witaminy B12 mierzone było z zastosowaniem chromatografii HPLC na kolumnie C18, *Waters™ LC Module 1 plus*, według metody zastosowanej w pracy [Heudi i in., 2006].

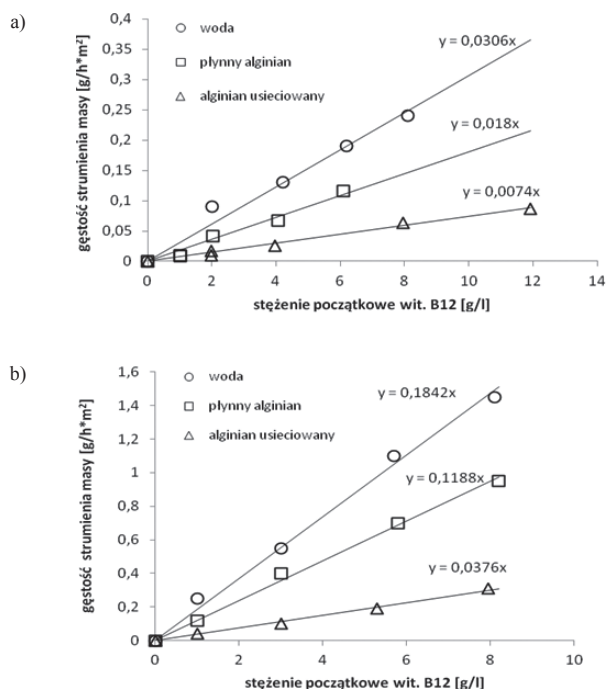
Wyniki i ich omówienie

Wartości początkowych gęstości strumieni masy witaminy B12 uzyskane dla kapsulek zawierających 1,5% w/v alginian sodu sieciowanego przez 1 h w łaźni z 2% CaCl_2 przedstawiono na rys. 2. Pokazano, że struktura tego naturalnego polimeru w niewystarczający sposób reguluje i spowalnia tempo uwalniania substancji modelowej. Zaszeregowano to użycie dodatkowej bariery, jaką może być porowata membrana stała.



Rys. 2. Wartości początkowych gęstości strumienia uwalnianej witaminy B12 z 1,5% w/v kapsulek alginianowych

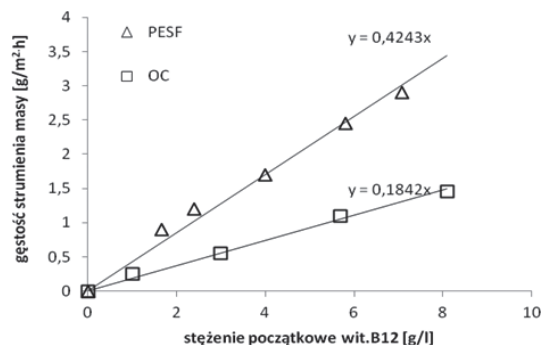
Wyniki początkowych gęstości strumienia dla poszczególnych membran z octanu celulozy o punkcie odcięcia 3,5–5 kDa i 8–10 kDa przedstawiono odpowiednio na rys. 3a i 3b.



Rys. 3. Wartości początkowych gęstości strumienia uwalnianej witaminy B12 przy trzech wypełnieniach struktur (woda, płynny alginian, alginian usieciowany) membran z octanu celulozy o punkcie odcięcia 3,5–5 kDa (a) i 8–10 kDa (b)

Na rys. 4 porównano uzyskane wartości gęstości strumieni dla membran z punktem odcięcia 10 kDa wypełnionych roztworami wodnymi z witaminą B12. Membrany te różniły się rodzajem polimeru (octan celulozy i polieterosulfon), grubością i krętością.

Pomimo, że transportowana cząsteczka jest w przeliczeniu na masę ponad dwukrotnie mniejsza niż podany punkt odcięcia membrany bardziej selektywnej (3,5–5 kDa) widocznym jest, że rozmiar porów znacząco limituje transport składnika. Wynika to najprawdopodobniej z silnej hydratacji cząsteczki witaminy B12 oraz jej odstępstwa od struktury kulistej (na podstawie kształtu i wielkości cząsteczki szacowany jest standardowo punkt odcięcia membrany). Dwukrotne zwiększenie średnicy porów membrany spowodowało zwiększenie o około 6 razy wartości strumienia masy.



Rys. 4. Wartości początkowych gęstości strumienia uwalnianej witaminy B12 z r-ru wodnego otoczonego membraną o punkcie odcięcia 10 kDa z octanu celulozy (OC) i polieterosulfonu (PESF)

Zgodnie z oczekiwaniami, dla każdego rozmiaru porów membrany i rodzaju wypełnienia jej rdzenia, strumień masy jest wprost proporcjonalny do stężenia początkowego składnika wewnątrz struktury tj. siły napędowej procesu dyfuzji.

Uzyskane wartości gęstości strumienia są kilkaset razy niższe aniżeli te otrzymane dla samych kapsulek alginianowych, co pokazuje, że poprzez wprowadzenie otoczki z membrany stałej znacząco zwiększono opór transportu masy.

Dla danej membrany gęstości strumienia rosną wraz ze wzrostem współczynnika dyfuzji (dla usieciowanego alginianu $D = 9,10 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, dla roztworu wodnego $D = 3,79 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) [Haufova i in., 2011] w medium wypełniającym przestrzeń ograniczoną membraną w szeregu usieciowanych alginian – płynny roztwór alginianu – roztwór wodny. Niemniej różnice te znacznie mniejsze niż różnice spowodowane zastosowaniem otoczki membranowej (maksymalnie 4-5-krotne), co potwierdza, że największy opór transportu masy znajduje się w porach membrany.

Porównanie wartości gęstości strumieni uzyskanych w układach z dwoma różnymi membranami polimerowymi o tym samym punkcie odcięcia również wskazuje na dominujący opór w transporcie pochodzący od transportu w porach membrany, stąd jej grubość, krętość porów znacząco wpływa na szybkość uwalniania substancji.

Wnioski

Idea otoczenia struktury alginianowej membraną stałą, która winna dawać dodatkowy, znaczący opór została potwierdzona doświadczalnie. Przez zastosowanie membran polimerowych transport masy spowolniono kilkaset razy, przybliżając wartość strumienia masy do wartości oczekiwanych przy transporcie leków.

Pokazano, że medium wypełniające przestrzeń otoczoną membraną ma znacznie mniejszy wpływ na szybkość transportu substancji organicznej, niż parametry pochodzące od membrany, począwszy od rodzaju polimeru z jakiego jest wykonana, jej grubości, po rozmiar i krętość porów.

LITERATURA

- Charman W.N., Chan H.K., Finin B.C., Charman S.A., 1999. Drug delivery: a key factor in realizing the full therapeutic potential of drugs *Drug Dev. Res.*, **46**, 316–327. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2299(199903/04)46:3/4<316::AID-DDR18>3.3.CO;2-5
- Haufova P., Knejzlik Z., Hanuš J., Zdražil A., Štěpánek F., 2011. Reversible buckling and diffusion properties of silica-coated hydrogel particles *J. Colloid Interface Sci.*, **357**, nr 1, 109–115. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.01.106
- Heudi O., Kilinc T., Fontannaz P., Marley E., 2006. Determination of Vitamin B12 in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction *J. Chromatogr. A*, **1101**, 63–68. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.09.059
- Yang L., Alexandridis P., 2000. Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.*, **5**, 132–143. DOI: 10.1016/S1359-0294(00)00046-7

Praca finansowana ze środków statutowych przeznaczonych dla Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej na rok 2010/2011 (nr 331 380 W3).