

Katarzyna KRAMEK-ROMANOWSKA, Katarzyna JABŁCZYŃSKA, Tomasz R. SOSNOWSKI

e-mail: t.sosnowski@ichip.pw.edu.pl

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

Zmiany dynamicznej aktywności powierzchniowej surfaktantu płucnego pod wpływem liposomowych nośników leków inhalacyjnych

Wprowadzenie

Liposomowe nośniki leków inhalacyjnych stanowią jedną z nowoczesnych strategii dostarczania czynników terapeutycznych do układu oddechowego. Zaletą ich stosowania jest możliwość maskowania hydrofilowych cech leku, co ułatwia wnikanie leku do komórek nabłonka oraz makrofagów płucnych. Zastosowanie liposomów pozwala również na osiągnięcie efektu przedłużonego uwalniania leku.

Środowisko dolnych dróg układu oddechowego zawiera surfaktant płucny, którego specyficzna aktywność powierzchniowa, osiągnięta w dynamicznych warunkach cyklu oddechowego, wpływa na obniżenie wysiłku oddechowego oraz na procesy transportu masy w płucach (wymiana gazowa, usuwanie zanieczyszczeń pochodzenia aerozolowego), m.in. dzięki umożliwieniu powstawania efektów *Marangoniego* [Sosnowski, 2006].

W tym kontekście ważne jest podjęcie badań mających na celu określenie, czy liposomy wprowadzane do płuc na drodze inhalacji mogą wchodzić w fizykochemiczne interakcje ze składnikami surfaktantu. Przedstawione w pracy badania przeprowadzono metodą MBP (*Maximum Bubble Pressure*) niestosowaną dotąd w badaniach fizykochemicznych aspektów oddziaływania liposomów na surfaktant płucny. Zastosowanie metody MBP umożliwi dyskusję mierzonych zjawisk w odniesieniu do charakterystycznych skal czasowych zmian wielkości powierzchni pęcherzyków płucnych w procesie oddychania. Uzyskane wyniki pozwolą sformułować wnioski na temat bezpieczeństwa stosowania leków inhalacyjnych w formie rozpylanych liposomów ze względu na ich interakcje z biosurfaktantami obecnymi na powierzchni pęcherzyków płucnych.

Materiały i metody

W niniejszych badaniach w roli surfaktantu płucnego użyto preparatu leczniczego *Survanta* (*Abbot Laboratories*, Francja), będącego formułą odzwierciedlającą stosowaną jako lek uzupełniający niedobór naturalnego surfaktantu u wcześniaków. Jak stwierdzono we wcześniejszych pracach [m.in. *Kondej i Sosnowski, 2011; 2012*] wykazuje on dynamiczne właściwości powierzchniowo czynne zbliżone do naturalnego surfaktantu występującego na powierzchni pęcherzyków płucnych człowieka. Preparat był używany w rozcieńczeniu gwarantującym we wszystkich pomiarach jednakowe stężenie fosfolipidów surfaktantu płucnego, tj. 0,75 mg/ml. Do rozcieńczeń stosowano sterylny roztwór soli fizjologicznej (*Gilbert Laboratories*, Francja).

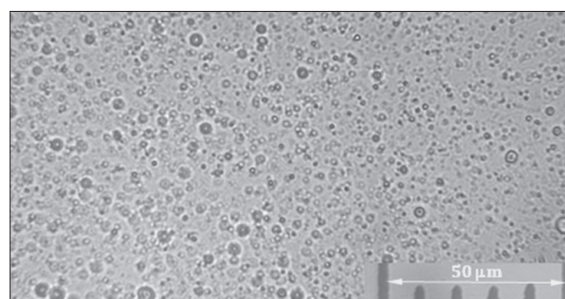
Liposomy wykorzystywane w badaniach wytwarzano z lecytyny (*Arros Organics*, USA) lub mieszaniny lecytyna/cholesterol (*Sigma-Aldrich*) (w stosunku wagowym 3:1) klasyczną metodą *Banghama* polegającą na hydratacji filmu lipidowego [m.in. *Jablczyńska, 2012*]. Badane próbki zawierały zawsze 0,75 mg/ml odpowiednio lecytyny lub mieszaniny lecytyny i cholesterolu.

Istotne informacje w odniesieniu do układu oddechowego mogą dać jedynie pomiary dynamicznego napięcia powierzchniowego, gdyż surfaktant płucny funkcjonuje w cyklu oddechowym, podczas którego pole powierzchni cieczy powlekającej pęcherzyki płucne podlega ciągłym zmianom. Dynamiczną aktywność powierzchniową składników surfaktantu płucnego badano za pomocą tensjometru pęcherzykowego BP2 (*Krüss*, RFN) przy wykorzystaniu metody MBP jako techniki dotąd szerzej niestosowanej w pomiarach oddziaływania substancji wziewnych na surfaktant płucny. Umożliwia ona pomiar zmian napięcia powierzchniowego w układzie w chwili tworzenia się nowej powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz (wzrastający pęcherzyk powietrza), przy czym

czas formowania tej powierzchni może zmieniać się od około 10 ms do kilkudziesięciu sekund. Badania prowadzono w temperaturach 25 i 37 °C stosując zewnętrzny termostat *GP100* (Wielka Brytania).

Wyniki i dyskusja

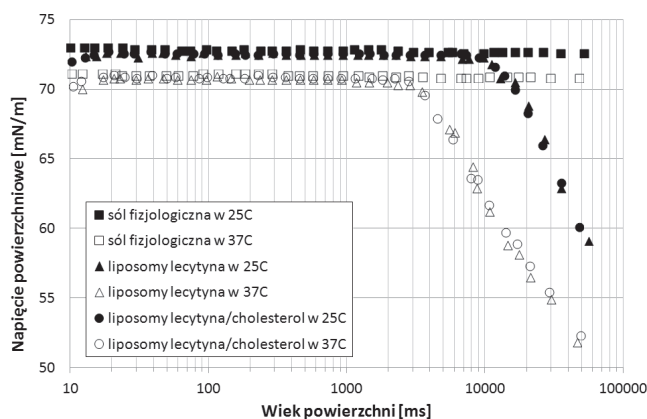
Dla skutecznej inhalacji istotne jest, by wdychany aerozol składał się z możliwie dużej liczby cząstek lub kropelek mniejszych niż 5 µm. Warunek ten gwarantuje ich łatwą penetrację i efektywną depozycję w drzewie oskrzelowym. Na rys. 1 przedstawiono przykładowe zdjęcie mikroskopowe liposomów otrzymanych w ramach przeprowadzonych badań.



Rys. 1. Liposomy otrzymane metodą *Banghama*

Porównanie z załączoną na rysunku skalą wskazuje, że praktycznie wszystkie wytworzone liposomy spełniają wspomniany warunek wymagany do skutecznej inhalacji. W osobnych badaniach potwierdzono istnienie technik atomizacji zapewniających trwałość liposomów po rozpyleniu m.in. [Sosnowski i Kramek-Romanowska, 2012]. Tym samym, prezentowane tutaj wyniki mają ściśle odniesienie do możliwych przyszłych zastosowań w aeroszoterapii.

Badania dotyczące wpływu liposomów na aktywność powierzchniową surfaktantu płucnego przeprowadzono na dwóch wariantach pomiarów. Na rys. 2 przedstawiono porównanie zależności dynamicznego napięcia powierzchniowego dla czystego roztworu soli fizjologicznej oraz koloidu zawierającego liposomy zbudowane z lecytyny lub mieszaniny lecytyna/cholesterol (3:1 w/w).



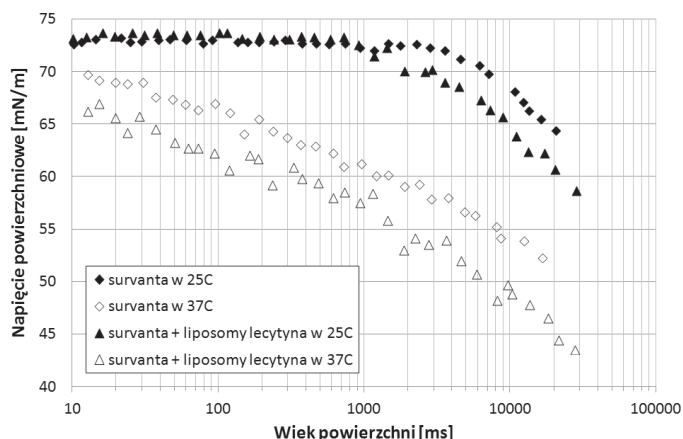
Rys. 2. Porównanie dynamicznego napięcia powierzchniowego dla soli fizjologicznej i koloidu zawierającego liposomy w 25 i 37°C

Przedstawiony wariant pomiarowy pozwolił na określenie wpływu liposomów na wartość dynamicznego napięcia powierzchniowego czystego roztworu soli fizjologicznej w celu stwierdzenia ewentualnej

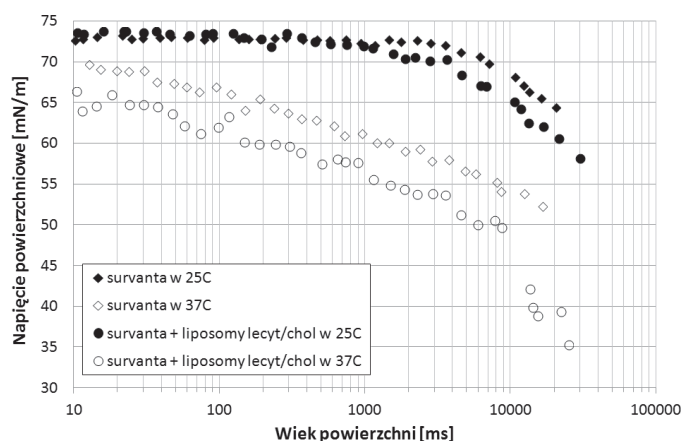
aktywności powierzchniowej samych wesićki (*vesicles*) lub związków (lecytyny i cholesterolu) je tworzących.

Analizując rys. 2 można stwierdzić, że oba rodzaje liposomów mają bardzo zbliżony wpływ na dynamiczne napięcie powierzchniowe w układzie sól fizjologiczna-powietrze. Wyraźne obniżenie napięcia powierzchniowego jest widoczne w obu temperaturach i dla czasów adsorpcji ok. 50 sekund wynosi ono ok. 12 mN/m w 25°C i ok. 18 mN/m w 37°C. Dla wyższej temperatury pomiarowej widoczne obniżenie napięcia powierzchniowego występuje dla krótszych czasów adsorpcji, co jest prawdopodobnie związane z szybszą niż w 25°C reorganizacją struktury liposomów i szybszą migracją cząstek związków lipidowych wchodzących w skład lub zamkniętych w wesićkach do powierzchni ciec-z-gaz.

Na rys. 3 i 4 przedstawiono wyniki drugiego wariantu pomiarów, w którym analizowano wpływ dodatku liposomów na modelowy surfaktant płucny (*Survanta*).



Rys. 3. Porównanie dynamicznego napięcia powierzchniowego dla roztworu leku *Survanta* (0,75 mg/ml) i koloidu zawierającego liposomy utworzone z lecytyny w 25 i 37°C



Rys. 4. Porównanie dynamicznego napięcia powierzchniowego dla roztworu leku *Survanta* (0,75 mg/ml) i koloidu zawierającego liposomy utworzone z lecytyny i cholesterolu (3:1 w/w) w 25 i 37°C

Modelowy surfaktant w badanych tutaj, stosunkowo niskich stężeniach, wyraźnie wykazuje aktywność powierzchniową. Analizując rys. 3 i 4 można stwierdzić, że w temperaturze 25°C wpływ liposomów obu typów na aktywność surfaktantu jest podobny i zaczyna być widoczny przy wieku powierzchni 1÷2 s, choć bardziej wyraźne obniżenie napięcia powierzchniowego jest obserwowane dopiero przy czasie adsorpcji powyżej 10 sekund.

Z punktu widzenia zastosowań medycznych istotniejsze są wyniki uzyskane w temperaturze fizjologicznej (37°C). W tych warunkach zaobserwowano zdecydowanie wyższą aktywność powierzchniową samego surfaktantu, jak i dodawanych liposomów – w całym mierzo-nym zakresie czasów adsorpcji występuje silniejsze obniżenie napięcia powierzchniowego o 2÷5 mN/m, a dla czasów adsorpcji powyżej 10 se-

kund – nawet o ponad 10 mN/m (tj. do wartości ok. 35 mN/m – Rys. 4). Wynika to prawdopodobnie z ułatwionej, w wyższej temperaturze, restrukturyzacji błony tłuszczowej liposomów oraz szybszego wbdow- wywania się uwolnionych molekuł związku amfifilowego w warstwę adsorpcyjną na powierzchni ciec-z-gaz. Ma to związek ze zwiększoną mobilnością hydrofobowych fragmentów cząstek lipidu w tempera- turze zbliżającej się do temperatury przejścia szklistego lecytyny.

Dodatkowo, porównanie ze sobą wyników dla obu typów liposomów w 37°C wskazuje, że wyższą aktywność powierzchniową wykazują liposomy wytworzone z mieszaniny lecytyna/cholesterol (3:1 w/w) (Rys. 4). Może to świadczyć o synergicznym procesie reorganizacji molekularnej, adsorpcji i/lub redukcji napięcia powierzchniowego. Bar- dzo duży wzrost aktywności jest widoczny zwłaszcza dla liposomów mieszanych przy czasach adsorpcji powyżej 10 sekund. Efekt ten ma jednak raczej ograniczone znaczenie dla fizjologii płuc, gdyż charak- terystyczny czas zmian powierzchni podczas cyklu oddechowego jest kilkukrotnie krótszy.

Na uwagę zasługuje również porównanie wyników z obu wariantów pomiarowych (tzn. rys. 2 z rys. 3 i 4). Zarówno w temperaturze 25°C, jak i 37°C widoczne są wyraźne różnice w przebiegu krzywych pomia- rowych uzyskanych dla odpowiednich układów zawierających liposo- my. Rozbieżność między krzywymi jest znacząca, zwłaszcza w 37°C (od 5 do 15 mN/m). Uzyskany wynik może świadczyć o silnym oddzia- ływaniu składników surfaktantu płucnego z liposomami prowadzącym do szybszego niż w pozostałych przypadkach uwolnienia cząstek lecytyny i ich współadsorpcji na powierzchni międzyfazowej.

Wnioski

W wyniku przeprowadzonych pomiarów stwierdzono, że liposomy, które mogą pojawić się w układzie surfaktantu płucnego jako nośniki leku inhalacyjnego, mają wpływ na dynamiczne napięcie powierzchni- owe, które pełni istotną rolę w fizjologii oddychania. Dla obu typów liposomów (wytworzonych z lecytyny i mieszaniny lecytyna/choleste- rol 3:1 w/w) stwierdzono wzrost aktywności powierzchniowej wyni- kający najprawdopodobniej z obecności wolnych lipidów uwalnianych podczas rozpadu liposomów, zwłaszcza w temperaturze 37°C.

Interpretacja znaczenia fizjologicznego obserwowanych efektów nie jest jednoznaczna. Z jednej strony wzrost aktywności powierzchniowej w układzie surfaktantu płucnego można uznać za korzystne w kontek- ście stosowania liposomów jako nośników leków inhalacyjnych. Stan- om chorobowym często towarzyszy bowiem dodatkowo zaburzenie funkcji naturalnego surfaktantu, a wspomniany efekt oznacza zwiększe- nie zawartości substancji aktywnych powierzchniowo na powierzchni pęcherzyków płucnych. Z drugiej strony, współadsorpcja uwolnionych z liposomów związków lipidowych na powierzchni ciec-z-gaz wyściółki płucnej wprowadza jednak określone zaburzenie naturalnej aktywno- ści surfaktantu płucnego, co może wywoływać skutki uboczne. Wyniki wskazują również na częściowy rozpad liposomów w obecności surfak- tantu płucnego, a więc ograniczenie ich funkcji jako nośników leków o przedłużonym uwalnianiu.

LITERATURA

- Jabczyńska K., 2012. *Charakterystyka liposomowych nośników leków inhalacyj- nych*. Praca magisterska. WICHIP PW, Warszawa
- Kondej D., Sosnowski T.R., 2011. Oddziaływanie nanocząstek haloizytu na sur- faktant płucny. *Inż. Ap. Chem.*, **50**, nr 5, 56-57
- Kondej D., Sosnowski T.R., 2012. Changes in the activity of the pulmonary sur- factant after contact with bentonite nanoclays particles. *Chem. Eng. Trans.*, **26**, 531-536. DOI: 10.3303/CET1226089
- Sosnowski T.R., 2006. *Efekty dynamiczne w układach ciec-z-gaz z aktywną po- wierzchnią międzyfazową*. OW. Pol. Warszawskiej, Warszawa
- Sosnowski T.R., Kramek-Romanowska K., 2012. Atomization of liposomal col- loids in the vibrating mesh device [in:] Abstracts of the 5th International Work- shop: Bubble and Drop Interfaces. Kraków, 20-24.05.2012, p. 98

Praca była finansowana ze środków budżetowych na naukę w la- tach 2010-2013 jako projekt badawczy Ministerstwa Nauki i Szkolnic- twa Wyszego nr NN 209 0233 39 pt.: Układy aerozolowe do innowa- cyjnych zastosowań terapeutycznych.