

Katarzyna JABŁCZYŃSKA, Tomasz R. SOSNOWSKI

e-mail: k.jablczynska@ichip.pw.edu.pl

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

Stabilność liposomowych nośników leków podczas rozpylania za pomocą wybranych urządzeń nebulizacyjnych

Wstęp

Aerzoloterapia jako metoda podawania leku do organizmu w postaci wdychanego aerozolu wyróżnia się ze względu na nieinwazyjność i wygodę stosowania. Pozwala na dostarczanie leków o działaniu miejscowym w terapii chorób układu oddechowego, lecz również leków o działaniu ogólnoustrojowym, gdyż dzięki dużej powierzchni płuc i cienkiej barierze krew/powietrze, możliwy jest szybki transport cząstek leku do krwi [Patton i in., 2004]. Z drugiej strony wchłanianie leku powoduje szybki spadek jego koncentracji na powierzchni dróg oddechowych poniżej stężenia terapeutycznego, co w przypadku leków o przeznaczeniu miejscowym skutkuje koniecznością częstego powtarzania inhalacji. Zmianę farmakokinetyki oraz dystrybucji substancji czynnej w organizmie można osiągnąć poprzez umieszczenie jej we wnętrzu nośnika, którego rozpad indukowany zmianą *pH*, zmianą temperatury lub interakcją z odpowiednim czynnikiem spowoduje wolne uwalnianie substancji czynnej.

Wśród stosowanych nośników leków można wymienić m.in. mikrocząstki wykonane z biodegradowalnych lub rozpuszczalnych polimerów, mikrokapsułki, micelle i liposomy. Liposomy są jednym z najintensywniej badanych systemów powolnego uwalniania leków w zastosowaniach inhalacyjnych, ponieważ zbudowane są z fosfolipidów, które stanowią główny składnik surfaktantu płucnego [Veldhuizen i in., 1998]. Liposomy są kulistymi agregatami cząstek fosfolipidów o średnicy od ok. 20 nm do kilkudziesięciu μm . W ich wnętrzu mogą być zamknięte leki zarówno hydro- jak i lipofilowe, co w przypadku tych drugich pozwala na uniknięcie reakcji zapalnych występujących przy podaniu leku w postaci wolnej [Swaminathan i Ehrhardt, 2011].

Pomimo licznych zalet liposomowych formułacji leków inhalacyjnych, ich zastosowanie może być ograniczone przez brak oczekiwanej stabilności podczas nebulizacji. Dlatego istotny jest odpowiedni dobór lub też opracowanie urządzenia atomizującego koloid liposomowy, które umożliwi uzyskanie kropeł o rozmiarze na tyle małym, aby uległy one transportowi w głąb układu oddechowego, a jednocześnie nie będzie powodować rozpadu liposomów w wyniku działania naprężeń hydrodynamicznych towarzyszących wytwarzaniu aerozolu.

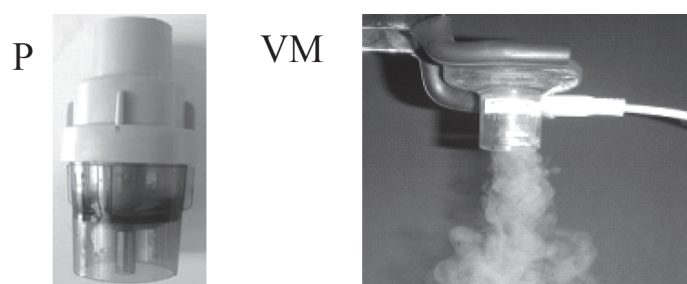
Urządzeniami stosowanymi do rozpylania ciekłych leków inhalacyjnych są nebulizatory o różnej konstrukcji [Sosnowski, 2010]. W niniejszej pracy porównano możliwości rozpylania koloidów liposomowych przy wykorzystaniu popularnie stosowanego nebulizatora pneumatycznego oraz stosunkowo nowego urządzenia, jakim jest nebulizator z wibrującą membraną (*vibrating mesh nebulizer*) [Sosnowski i Żołądkiwicz, 2011].

Metodyka badawcza

Liposomy wytwarzano klasyczną metodą hydratacji filmu lipidowego: 3 ml roztworu L- α -lecycyny (*Acros Organics*, USA) w chloroformie (*Chempur*, Polska) o stężeniu 20 mg/ml wlewano do kolby okrągłodennej, prowadząc następnie w temperaturze ok. 40°C odparowanie rozpuszczalnika z jej ścianek. W celu pozbycia się resztek rozpuszczalnika kolbę umieszczano na 15 minut w eksykatorze próżniowym. Następnie do kolby wprowadzano 3 ml wodnego roztworu rodaminu B (*POCH*, Polska) o stężeniu 0,025 mg/ml. Hydratację przeprowadzano w temperaturze 40°C, poddając zawartość kolby wytrząsaniu przez 5 minut. Tak otrzymany stężony koloid liposomowy, zawierający zamkniętą rodaminę B jako modelowy lek a jednocześnie substancję znacznikową,

scharakteryzowano na drodze obserwacji mikroskopowej (*PZO*, Polska). Uzyskany koloid rozcieńczano do objętości 150 ml wodą RO (woda oczyszczona przez osmozę odwróconą), a następnie poddawano rozpylaniu.

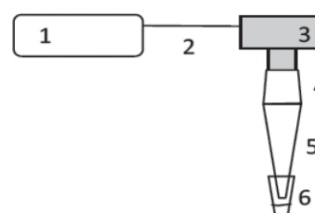
Aerozol wytwarzano przy użyciu nebulizatora pneumatycznego (*Sidestream Durable – Philips Respironics*, USA) zasilanego ze sprężarki *MPI – Medbryt*, Polska) oraz nebulizatora z wibrującą membraną, w skrócie *VM (Aeroneb Lab – Aerogen Inc., USA)* – rys. 1.



Rys. 1. Stosowane inhalatory: P – pneumatyczny (*Sidestream*), VM – z wibrującą membraną (*Aeroneb*)

Rozkład wielkości emitowanych kropeł mierzono za pomocą spektrometru aerozolowego (*Spraytec-Malvern Instruments*, Wielka Brytania), który umożliwiał pomiar w zakresie 0,1–900 μm .

Próbki cieczy do analizy zawartości znacznika pobierano co 2–3 minuty z wnętrza nebulizatorów, zaś w przypadku nebulizatora VM dodatkowe próbki stanowił również odkroplony aerozol. Schemat układu separacji aerozolu emitowanego z inhalatora typu VM przedstawiono na rys. 2. Z przyczyn technicznych niemożliwe było zebranie aerozolu emitowanego z nebulizatora pneumatycznego w ilości wymaganej do analizy stężenia znacznika.

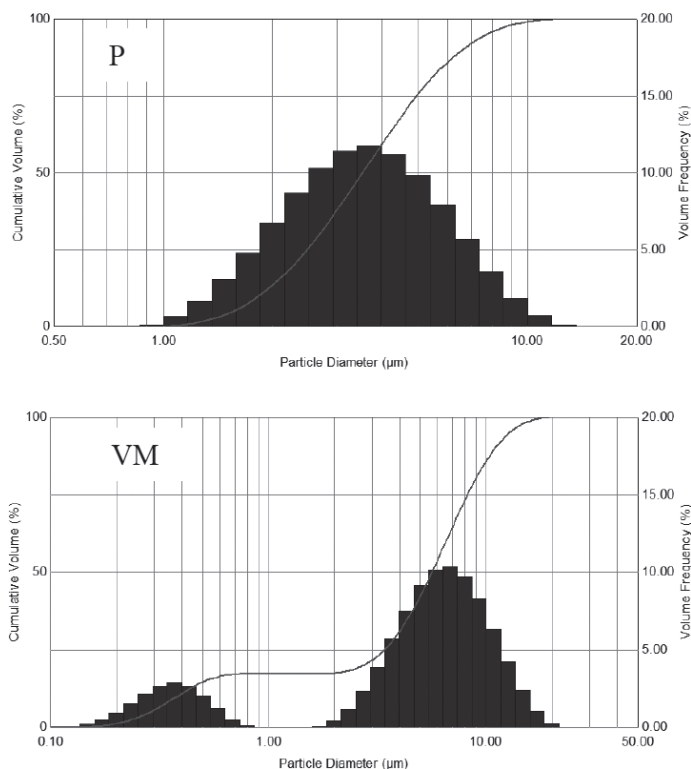


Rys. 2. Układ kolekcji aerozolu emitowanego z nebulizatora VM: 1 – moduł sterujący, 2 – przewód, 3 – inhalator VM, 4 – łącznik, 5 – dysza impakcyjna, 6 – naczynie zbiorcze

Zmiany stężenia wskaźnika obecnego w fazie ciekłej (tj. uwolnionej z liposomów) mierzono spektrofotometrycznie (*Lumina-Thermo Scientific*, USA) przy długości fali wzbudzenia 553 nm. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech-pięciu powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Metoda hydratacji filmu lipidowego pozwoliła na otrzymanie wielowarstwowych liposomów o wielkości poniżej 5 μm . Pomiary rozkładu wielkości kropeł aerozolu uzyskiwanego z nebulizatorów, które wykonano za pomocą aparatu *Spraytec* wykazały, że krople generowane przez nebulizator pneumatyczny są przeciętnie mniejsze niż krople wytworzone przez nebulizator typu VM (Rys. 3). Pomimo że inhalator VM emituje pewną ilość kropeł submikronowych nieobecnych w aerozolu wytwarzanym w inhalatorze pneumatycznym, to przeważająca część masy cieczy jest atomizowana do kropeł o większej średnicy. Sugeruje



Rys. 3. Rozkłady objętościowe wielkości kropli emitowanych z nebulizatora pneumatycznego (P) i nebulizatora z wibrującą membraną (VM)

to, że inhalator pneumatyczny wytwarza więcej aerozolu mogącego dostawać się w głąb płuc. Percentyle objętościowego rozkładu wielkości kropli wytwarzanych przez badane nebulizatory wraz z wartościami odchylenia standardowego, σ , podano w tab. 1.

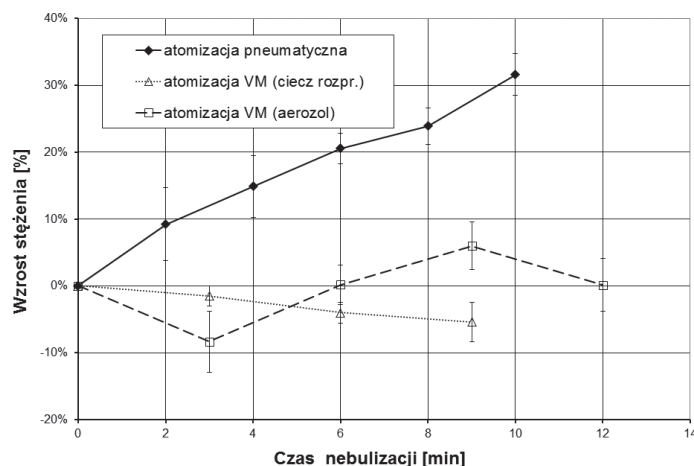
Tab. 1. Parametry rozkładu wielkości kropli generowanych przez nebulizator pneumatyczny *Sidestream* oraz nebulizator z wibrującą membraną *Aeroneb*

	Dv(10) [μm]	σ	Dv(50) [μm]	σ	Dv(90) [μm]	σ
<i>Sidestream</i>	1,8	0,0	3,5	0,0	6,6	0,1
<i>Aeroneb</i> (VM)	0,4	0,9	5,6	0,3	11,0	0,3

W aerozolu wygenerowanym za pomocą obu urządzeń nebulizacyjnych obecne są krople o średnicy mniejszej od 5 μm, które będą mogły skutecznie penetrować w głąb układu oddechowego. Powstawanie kropli o rozmiarach kilku mikrometrów wiąże się jednak z występowaniem dużych naprężeń hydrodynamicznych, które mogą powodować rozrywanie pęcherzyków lipidowych znajdujących się w rozpylanym koloidzie.

Przypuszczenie, że nebulizacja pneumatyczna, ze względu na mniejszy rozmiar wytwarzanych kropli, będzie powodować silniejszy rozpad liposomów zostało potwierdzone w spektrofotometrycznych pomiarach obecności wolnej rodamin B w cieczy ulegającej atomizacji. Procentowe zmiany stężenia wolnej rodamin B w pobranych próbkach w zależności od czasu nebulizacji przedstawiono na rys. 4.

Wyniki wskazują na postępującą destabilizację liposomów znajdujących się w cieczy zawartej wewnątrz nebulizatora pneumatycznego w trakcie prowadzenia procesu atomizacji. Stężenie wolnej rodamin B wzrasta na skutek rozpadu liposomów z enkapsulowanym wewnątrz roztworem rodamin B o wysokim stężeniu. Po 10 minutach rozpylania zaobserwowano ponad 30% wzrost stężenia wolnej rodamin B w atomizowanym koloidzie. Intensywny rozpad liposomów w tym nebulizatorze jest niewątpliwie związany ze sposobem jego działania. Ciecz podlega atomizacji w dyszy pneumatycznej, zaś wytworzone krople ulegają impakcji na elementach urządzenia, która prowadzi do atomizacji wtórnej, ale i intensywnego odcieknięcia cieczy do naczynia. W ten sposób ciecz wielokrotnie ulega rozdzieleniu na krople i recyrkulacji [Sosnowski, 2010]. W przypadku nebulizatora VM daje się zauważyć jedynie niewielkie wahania stężenia rodamin B ($\pm 6\%$) w stosunku do wartości początkowej, zarówno w aerozolu jak i w koloidzie znaj-



Rys. 4. Zmiany stężenia wolnej rodamin B w czasie nebulizacji: atomizacja pneumatyczna – pomiar tylko w cieczy rozpraszanej, atomizacja VM – pomiar w cieczy rozpraszanej oraz w cieczy wyemitowanej jako aerozol

dującym się w nebulizatorze, świadczące o nieznacznym rozpadzie liposomów w trakcie procesu atomizacji. Odnotowane wartości poniżej stężenia początkowego wynikają prawdopodobnie z ograniczeń metody pomiarowej, choć mogą być również one rezultatem zamykania części wolnej rodamin B przez liposomy jednowarstwowe powstające w wyniku redukcji warstw liposomów wielowarstwowych przetwarzanych przez wibrującą membranę.

Wnioski

W wyniku badań uzyskano enkapsulację modelowej substancji w liposomach o wielkościach umożliwiających ich dostarczenie do płuc przy zastosowaniu atomizacji realizowanej w dwóch typach inhalatorów medycznych.

Jednocześnie stwierdzono częściowy rozpad liposomów wielowarstwowych w trakcie procesu atomizacji koloidu w inhalatorze pneumatycznym, o czym świadczy fakt przyspieszonego uwalniania enkapsulowanej substancji znacznikowej. Stopień destabilizacji liposomów był nieznaczny w przypadku nebulizatora typu VM, co wynika z innej techniki generacji kropli i związanych z nią niższych naprężeń hydrodynamicznych. Mniejsza trwałość liposomów podczas rozpraszania pneumatycznego wynika również z faktu, że koloid znajdujący się wewnątrz nebulizatora *Sidestream* cyркуluje i wielokrotnie zderza się z przegrodą impakcyjną, podczas gdy w nebulizatorze typu VM krople raz wytworzone podczas przejścia przez otwórki membrany, nie powracają już do nebulizatora.

Wyniki badań wskazują na przewagę zastosowania nebulizatorów z grupy VM do atomizacji inhalacyjnych preparatów leczniczych zawierających nośniki liposomowe. Mechanizm generacji kropli poprzez drgania perforowanej membrany wydaje się na tyle łagodny dla liposomów, że metoda ta może być rozważana jako efektywna technika rozpraszania formułacji leczniczych mających postać koloidu liposomowego.

LITERATURA

- Patton J.S., Fishburn C.S., Weers, J.G., 2004. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **1**, nr 4, 338–344. DOI: 10.1513/pats.200409-049TA
- Sosnowski T.R., 2010. *Aerozole wziewne i inhalatory*. WICHiP PW, Warszawa
- Sosnowski T.R., Żołądkowicz J., 2011. Charakterystyka procesu atomizacji cieczy w układach z wibrującą membraną (VM) stosowanych w wybranych inhalatorach medycznych. *Inż. Ap. Chem.* **50**, nr 5, 100-101
- Swaminathan J., Ehrhardt C., 2011. *Liposomes for pulmonary drug delivery*. [w:] Smyth H.D.C., Hickey A.J., (Eds). *Controlled pulmonary drug delivery*. Springer, New York, 313-334
- Veldhuizen R., Nag K., Orgeig S., Possmayer F., 1998. The role of lipids in pulmonary surfactant. *BBA-Mol. Basis Dis.* **1408**, nr 2–3, 90–108. DOI: 10.1016/S0925-4439(98)00061-1

Praca była finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2010-2013 (projekt nr NN209 0233 39)