

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

DYSCYPLINA NAUKOWA INŻYNIERIA CHEMICZNA

Rozprawa doktorska

mgr inż. Katarzyna Dobrowolska-Dziarnik

Badania procesu atomizacji cieczy jako metody wytwarzania aerozoli
do zastosowań medycznych z uwzględnieniem zjawisk
fizykochemicznych towarzyszących depozycji inhalowanych kropeł

Promotor
prof. dr hab. inż. Tomasz Sosnowski

Promotor pomocniczy
dr inż. Marcin Odziomek

WARSZAWA 2024

Składam najserdeczniejsze podziękowania, w pierwszej kolejności, mojemu Promotorowi Panu Prof. dr hab. inż. Tomaszowi R. Sosnowskiemu za możliwość realizacji tej pracy, pomoc, cenne rady i wskazówki oraz za poświęcony czas podczas trwania całego doktoratu.

W drugiej kolejności, chciałabym podziękować Panu Dr inż. Marcinowi Odziomkowi za współpracę, okazane wsparcie, rady oraz za nieustającą życzliwość podczas realizacji tej pracy.

Chciałabym przekazać szczególne podziękowania Mojej całej Rodzinie, a w szczególności Rodzicom i Mężowi, za wsparcie i pomoc w trudnych momentach, za cierpliwość, troskę oraz wiarę w końcowy sukces.

Dziękuję również Przyjaciółom za troskę i wsparcie, na które mogłam liczyć w trudnych chwilach.

STRESZCZENIE

Nebulizacja, będąca metodą rozpraszania cieczy do postaci drobnych kropelek tworzących mgłę, jest jednym z ważnych procesów stosowanych w aerozoloterapii, tj. inhalacyjnym podawaniu leków do płuc. Używane w tym procesie preparaty lecznicze są wodnymi roztworami lub zawiesinami zawierającymi - prócz samej substancji aktywnej farmakologicznie - także substancje stabilizujące formulację (np. syntetyczne związki powierzchniowo-czynne). Skuteczność leczenia inhalacyjnego zależy od miejsca depozycji kropeł mgły w układzie oddechowym, na co wpływa przede wszystkim rozkład wielkości kropeł wytwarzanych w nebulizatorach, który zależy od mechanizmu atomizacji i budowy nebulizatora a także od właściwości fizykochemicznych rozpylanej formulacji leczniczej.

Mimo wielu badań, wciąż brakuje dogłębnej analizy przebiegu procesów atomizacji w nebulizatorach o różnej konstrukcji (pneumatycznych, siateczkowych), w tym zależności pomiędzy składem preparatów leczniczych a właściwościami powstającego aerozolu, przekładającymi się na efektywność leczenia. Inżynieria chemiczna z jej narzędziami badawczymi z zakresu analizy układów rozproszonych oraz opisu zjawisk przebiegających w pobliżu powierzchni międzyfazowych (przepływ, transport masy) może znacząco przyczynić się do poszerzenia wiedzy dotyczącej nebulizacji leków, co powinno się przełożyć na wzrost efektywności aerozoloterapii.

Celem pracy jest charakterystyka procesu atomizacji wybranych cieczy w typowych nebulizatorach medycznych, obejmująca, w szczególności, analizę przebiegu procesu rozpylania w zależności od składu cieczy, a także wyliczenia przewidywanej depozycji kropeł w układzie oddechowym. Badania te poszerzono o pomiary oddziaływania badanych (tj. inhalowanych) substancji z modelowym surfaktantem płucnym, pozwalające na określenie bezpieczeństwa ich stosowania w stosunku do powierzchni pęcherzyków płucnych. W ramach badań wykazano, że poprzez wpływ na właściwości atomizowanych cieczy (w szczególności: dzięki zastosowaniu biozgodnych substancji pochodzenia naturalnego), możliwe jest uzyskanie aerozolu inhalacyjnego charakteryzującego się zwiększoną depozycją w określonych obszarach układu oddechowego, co powinno przekładać się na wzrost efektu leczniczego i jednoczesnym zmniejszeniu skutków ubocznych aerozoloterapii.

Jako zasadnicze właściwości cieczy mogące wpływać na wielkość wytwarzanych kropeł, a przez to – na procesy transportu aerozolu w układzie oddechowym i depozycję, wskazano właściwości reologiczne, napięcie powierzchniowe oraz przewodność elektrolityczną, i ich znaczenie było szczegółowo analizowane w pracy. Badania objęły wybrane leki inhalacyjne,

dodatki syntetyczne oraz nowo zaproponowane związki naturalne mogące stanowić potencjalnie substancje pomocnicze w lekach inhalacyjnych.

Badania dotyczące oceny wpływu zdeponowanego aerozolu na surfaktant płucny koncentrowały się na analizie zmian właściwości lepkością modelowej powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz. Zwrócono uwagę na związek tych właściwości z procesami wymiany masy w płucach, w tym z wymianą gazową oraz tzw. hydrodynamicznym *klirensem* (oczyszczaniem) płuc, które są powiązanych z efektami Marangoniego występującymi na powierzchni pęcherzyków płucnych. Pomiar oddziaływań ze strony wybranych leków inhalacyjnych i dodatków naturalnych przeprowadzono w warunkach dynamicznych (symulacja stanu powierzchni w płucach) z zastosowaniem dwóch modeli surfaktantu płucnego: lipidowego (jedno- i dwuskładnikowego) i wieloskładnikowego lipidowo-białkowego. W przypadku modelu lipidowego, pomiary wykonano przy użyciu wagi Langmuira-Wilhelmy'ego uzupełnioną o mikroskopię kąta Brewstera (BAM). Pomiary z zastosowaniem modelu wieloskładnikowego prowadzone metodą pulsującej kropli umożliwiły wyznaczenie dylatacyjnych właściwości reologicznych powierzchni ciecz-gaz oraz określenie histerezy napięcia powierzchniowego podczas oscylacji powierzchni. Dzięki wprowadzeniu odpowiednich parametrów ilościowych (kryteriów) opisujących badany układ dynamiczny możliwe było określenie wpływu substancji pomocniczych dodawanych do leków na przebieg pętli histerezy, a tym samym - na bezpieczeństwo ich stosowania w inhalacjach.

Podsumowując, w niniejszej pracy zweryfikowano tezy badawcze, które można sformułować następująco:

- 1) *Na charakterystykę aerozolu wytwarzanego w nebulizatorach medycznych wpływają zasada działania i konstrukcja urządzenia, właściwości fizykochemiczne cieczy rozpylanej oraz warunki prowadzenia procesu. Tym samym, odpowiednio dobierając parametry atomizacji prowadzonej w nebulizatorach można zmieniać jakość aerozolu, a dzięki temu – wpływać na efektywność depozycji kropeł inhalowanego aerozolu w poszczególnych obszarach układu oddechowego.*
- 2) *W celu poprawy parametrów aerozolu i depozycji można zastosować biozgodne związki pochodzenia naturalnego, których bezpieczeństwo stosowania w inhalacji może być ocenione doświadczalnie w warunkach in vitro przez pomiary ich oddziaływań fizykochemicznych ze składnikami płynów występujących w układzie oddechowym.*

Jednym z najważniejszych rezultatów jest stwierdzenie wyraźnej zależności rozkładu wielkości kropeł aerozoli uwalnianych z nebulizatorów od rodzaju urządzenia atomizującego

(zasada działania i indywidualne cechy konstrukcyjne) i właściwości fizykochemiczne cieczy rozpylanej. Sposób realizacji procesu atomizacji cieczy jest elementem dominującym w kształtowaniu właściwości chmury aerozolowej, w tym zakresu wielkości kropeł. Jednak w konkretnym nebulizatorze widoczny wpływ na masową wydajność emisji aerozolu, wielkość kropeł, ich polidispersyjność oraz udział kropeł drobnych (FPF), mają parametry fizykochemiczne cieczy (głównie lepkość oraz napięcie powierzchniowe).

Na podstawie badań dotyczących interakcji pomiędzy modelowym surfaktantem płucnym a składnikami inhalowanego aerozolu stwierdzono, że zaproponowane dodatki pochodzenia naturalnego nie wpływają negatywnie na biofizykochemiczną funkcję surfaktantu. W celu sprawniejszej analizy wyników pokazano, w jaki sposób można powiązać kryteria oceny kształtu histerezy napięcia powierzchniowego z parametrami opisującymi lepko-sprężyste cechy obszaru powierzchniowego modelującego obszar pęcherzyków płucnych.

W realizacji pracy plasującej się na pograniczu dyscyplin naukowych, wykorzystano wiedzę i narzędzia badawcze z obszaru inżynierii chemicznej, potwierdzając możliwość jej zastosowania do rozwiązywania ważnych praktycznie zagadnień z obszaru medycyny i farmacji. Zaproponowane metody pomiarowe i sposób analizy danych pomiarowych, pozwalające na badanie na poziomie fizykochemicznym wpływu substancji aktywnych oraz dodatków leków inhalacyjnych na proces powstawania aerozolu i jego oddziaływania na układ oddechowy mogą zostać wykorzystane do dalszego prowadzenia pomiarów nad innymi substancjami o podobnym potencjale.

Słowa kluczowe: atomizacja cieczy; aerozol leczniczy; nebulizator; surfaktant płucny; powierzchnia międzyfazowa; leki inhalacyjne

ABSTRACT

Nebulization, as a method of dispersing liquid into small droplets creating a mist, is one of the important processes used in aerosol therapy, i.e. inhalation administration of drugs into the lungs. The medicine used in this process are aqueous solutions or suspensions containing - apart from the pharmacologically active substance itself - also substances stabilizing the formulation (e.g. synthetic surfactants). The effectiveness of inhalation treatment depends on the deposition area of mist droplets in the respiratory system, which is influenced primarily by the size distribution of drops emitted via nebulizers, which depends on the mechanism of atomization and the nebulizer design, as well as on the physicochemical properties of the sprayed medicinal formulation. Despite many studies, there is still no in-depth analysis of the atomization processes in nebulizers of various designs (jet, mesh), including the relationship between the composition of drugs and the properties of the resulting aerosol, which results in the treatment effectiveness. Chemical engineering with its research tools of analysis of dispersed systems and description of phenomena occurring near interfacial surfaces (flow, mass transport) can significantly contribute to expanding knowledge about drug nebulization, which should result in an increase in the effectiveness of aerosol therapy.

The aim of the work is to characterize the atomization process of selected liquids in typical medical nebulizers, including, in particular, the analysis of the spraying process depending on the liquid composition, as well as the calculation of the expected deposition of drops in the respiratory system. These studies were extended to include measurements of the interaction of the tested (i.e. inhaled) substances with a model pulmonary surfactant, allowing for the determination of the safety of their use in relation to the surface of the alveoli. The research showed that by influencing the properties of atomized liquids (in particular: thanks to the use of biocompatible substances of natural origin), it is possible to obtain an inhalation aerosol characterized by increased deposition in specific areas of the respiratory system, which should translate into an increase in the therapeutic effect and a simultaneous reduction in side effects of aerosol therapy.

As basic properties of the liquid that may affect the size of the droplets, and thus the processes of aerosol transport in the respiratory system and deposition, were indicated: rheological properties, surface tension and conductivity, and their importance was analyzed in detail in this work. The research included selected inhalation drugs, synthetic additives and newly proposed natural compounds that could potentially excipients in inhalation drugs.

Studies assessing the impact of the deposited aerosol on the lung surfactant focused on analyzing changes in the viscoelastic properties of the model liquid-gas interface. It was paid

attention to the relationship between these properties and the mass exchange processes in the lungs, including gas exchange and the so-called hydrodynamic clearance of the lungs, which are related to the Marangoni effects occurring on the surface of the alveoli. Measurements of the effects of selected inhalation drugs and excipients were carried out in dynamic conditions (simulation of the surface condition in the lungs) using two models of lung surfactant: lipid (single- and two-component) and multi-component lipid-protein. In the case of the lipid model, measurements were performed using a Langmuir-Wilhelmy balance equipped with Brewster's angle microscopy (BAM). Measurements using a multi-component model carried out using the pulsating drop method made it possible to determine the dilatational rheological properties of the liquid-gas interface and to determine the surface tension hysteresis during oscillations. Thanks to the introduction of appropriate quantitative parameters (criteria) describing the tested dynamic system, it was possible to determine the impact of excipients added to drugs on the course of the hysteresis loop, and thus on the safety of their use in inhalations.

To sum up, in this work the following assumptions were verified:

- 1) *The characteristics of the aerosol produced in the nebulizers are influenced by the principle of operation and device design, the physicochemical properties of the sprayed liquid and the conditions of the process. Thus, by appropriately selecting the atomization parameters carried out in nebulizers, it is possible to change the quality of the aerosol and thus influence the efficiency of deposition of inhaled aerosol droplets in individual areas of the respiratory system.*
- 2) *In order to improve aerosol and deposition parameters, biocompatible compounds of natural origin can be used and their safety can be assessed experimentally in in vitro conditions by measuring their physicochemical interactions with the components of fluids present in the respiratory system.*

One of the most important results is the finding of a clear dependence of the size distribution of aerosol droplets released from nebulizers on the type of atomizing device (operating principle and individual design features) and the physicochemical properties of the sprayed liquid. The method of implementing the liquid atomization process is the dominant element in shaping the properties of the aerosol cloud, including the droplet size range. However, in a specific nebulizer, the physicochemical parameters of the liquid (mainly viscosity and surface tension) have a visible impact on the mass efficiency of aerosol emission, the size of droplets, their polydispersity and the fraction of fine droplets (FPF).

Based on studies on the interaction between a model lung surfactant and the components of the inhaled aerosol, it was found that the proposed additives of natural origin do not negatively affect the biophysicochemical function of the surfactant. In order to analyze the results more efficiently, it was shown how the criteria for assessing the shape of surface tension hysteresis can be linked to parameters describing the viscoelastic features of the surface area modifying the area of the alveoli.

In the course of this work, which is at the border of scientific disciplines, knowledge and research tools from the field of chemical engineering were used, confirming the possibility of its application to solve practically important issues in the field of medicine and pharmacy. The proposed measurement methods and method of analysis of measurement data, allowing for testing at the physicochemical level of the impact of active substances and additives of inhalation drugs on the process of aerosol formation and its impact on the respiratory system, can be used to further carry out measurements on other substances with similar potential.

Keywords: liquid atomization; medicinal aerosol; nebulizer; pulmonary surfactant; interfacial surface; inhalation drugs

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	5
ABSTRACT	8
SPIS TREŚCI	11
SPIS SKRÓTÓW I SYMBOLI	14
1. Wstęp	18
2. Terapie medyczne jako przykład szczególnego zastosowania atomizacji	21
3. Motywacja podjęcia badań	24
4. Teza i zakres pracy	26
5. Elementy inżynierii chemicznej w zastosowaniu do opisu procesów biegnących w układzie oddechowym	29
5.1. Budowa i funkcje dróg oddechowych człowieka	29
5.2. Inhalacyjne dostarczanie leków do płuc - transport aerozolu w układzie oddechowym	30
5.3. Metody obliczania dawek leków zdeponowanych w płucach	35
5.4. Układ surfaktantu płucnego i jego znaczenie jako bariery ochronnej organizmu	37
5.4.1. Charakterystyka biochemiczna struktury układu surfaktantu płucnego	38
5.4.2. Procesy biofizykochemiczne w obszarze układu surfaktantu płucnego	39
5.4.3. Podstawy opisu właściwości fizykochemicznych układu surfaktantu płucnego w obszarze międzyfazowym ciecz-gaz	42
5.4.4. Właściwości surfaktantu płucnego jako wskaźnika fizjologicznego stanu płuc	46
5.4.5. Parametry oceny oddziaływań zdeponowanego aerozolu na powierzchnię płucną	49
6. Charakterystyka procesu nebulizacji	57
6.1. Podstawy procesu	57
6.1.1. Fizykochemia zjawisk na powierzchni kropli	57
6.1.2. Podział nebulizatorów ze względu na zasadę działania i ich charakterystyka ...	59
6.2. Wpływ parametrów procesowych na jakość emitowanego aerozolu	65
6.2.1. Wpływ konstrukcji urządzenia	65
6.2.2. Wpływ właściwości fizykochemicznych cieczy	69
6.2.3. Wpływ warunków otoczenia	76
6.3. Wymagania dotyczące systemu lek-nebulizator	77
6.3.1. Wybrane aspekty oceny poprawności działania systemu lek-nebulizator	78
6.3.2. Wymagania stawiane aerozolom terapeutycznym	79
6.3.3. Techniki pomiarowe stosowane w ocenie jakości aerozoli inhalacyjnych emitowanych z nebulizatorów	80

6.3.4.	Kryteria ilościowe oceny aerozolu leczniczego emitowanego z nebulizatorów.	81
7.	Charakterystyka produktów leczniczych i wyrobów medycznych stosowanych w nebulizacji.....	84
7.1.	Informacje podstawowe.....	84
7.2.	Charakterystyka i podział leków używanych w nebulizacji.....	85
7.3.	Substancje pomocnicze w produktach inhalacyjnych podawanych z nebulizatorów ..	90
7.4.	Substancje pochodzenia naturalnego o potencjalnym zastosowaniu w nebulizacji	93
7.4.1.	Biosurfaktanty w roli potencjalnych stabilizatorów układów dyspersyjnych	94
7.4.2.	Polisacharydowe modyfikatory lepkości	95
8.	Metodyka badań - Materiały.....	99
8.1.	Substancje modelowe	99
8.2.	Leki inhalacyjne	99
8.3.	Substancje pochodzenia naturalnego.....	100
8.4.	Modelowy surfaktant płucny	100
9.	Metodyka badawcza – Metody pomiarowe i obliczeniowe	102
9.1.	Metodyka pomiarów właściwości atomizowanych cieczy.....	102
9.1.1.	Pomiary przewodności elektrolitycznej	102
9.1.2.	Pomiary napięcia powierzchniowego	102
9.1.3.	Pomiary właściwości reologicznych	104
9.1.4.	Pomiary stabilności zawiesin leczniczych	105
9.1.5.	Pomiary morfologii i wielkości cząstek substancji aktywnej	105
9.2.	Charakterystyka emitowanego aerozolu.....	107
9.2.1.	Dobór nebulizatorów.....	107
9.2.2.	Pomiary w zakresie badań wydajności emisji aerozolu.....	108
9.2.3.	Pomiary rozkładu wielkości kropeł w chmurze aerozolowej	109
9.2.4.	Pomiary dynamiki procesu atomizacji.....	111
9.3.	Oddziaływanie aerozolu z surfaktantem płucnym	116
9.3.1.	Obliczenia z zastosowaniem modelu MPPD	116
9.3.2.	Pomiary interakcji z surfaktantem płucnym	117
10.	Wyniki i ich omówienie	121
10.1.	Charakterystyka właściwości fizykochemicznych badanych cieczy	121
10.1.1.	Właściwości fizykochemiczne roztworów substancji modelowych.....	121
10.1.2.	Właściwości fizykochemiczne leków inhalacyjnych.....	122
10.1.3.	Właściwości fizykochemiczne modyfikatorów lepkości pochodzenia naturalnego.....	125

10.1.4. Właściwości fizykochemiczne modyfikatorów napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego.....	127
10.2. Badanie procesu nebulizacji i właściwości aerozolu.....	128
10.2.1. Wpływ właściwości fizykochemicznych rozpylanych cieczy na wydajność nebulizacji	128
10.2.2. Wpływ właściwości fizykochemicznych rozpylanych cieczy na charakterystykę aerozolu.....	130
10.2.3. Wpływ właściwości fizykochemicznych leków inhalacyjnych na właściwości aerozolu.....	153
10.3. Oddziaływanie składników inhalowanych aerozoli z surfaktantem płucnym.....	163
10.3.1. Wyliczenie ilości aerozolu deponowanego w płucach	163
10.3.2. Oddziaływania z modelem lipidowym surfaktantu płucnego (LM)	170
10.3.3. Oddziaływania z wieloskładnikowym modelem lipidowo-proteinowym surfaktantu płucnego (MPS)	179
11. Podsumowanie wyników badań	195
12. Wnioski końcowe	206
BIBLIOGRAFIA.....	208
OŚWIADCZENIA	232
ZAŁĄCZNIKI.....	233
SPIS PUBLIKACJI	245

SPIS SKRÓTÓW I SYMBOLI

SYMBOLE ŁACIŃSKIE

<i>A</i>	powierzchnia przypadająca na jedną zaadsorbowaną cząsteczkę ($\text{\AA}^2/\text{cząsteczka}$)
<i>Abs</i>	absorbancja (-)
<i>c</i>	stężenie ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
c_s^{-1}	współczynnik ściśliwości monowarstwy ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)
<i>D</i>	(efektywny) współczynnik dyfuzji ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)
d_d	średnica kropli (m)
<i>Dv(50)</i>	średnica mediany rozkładu objętościowego (m)
$F(d_d)$	funkcja rozkładu skumulowanego wielkości kropeł
$f(d_d)$	funkcja gęstości rozkładu wielkości kropeł
<i>g</i>	przyspieszenie ziemskie ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$)
<i>HAn</i>	znormalizowane pole histerezy napięcia powierzchniowego ($\text{m}\cdot\text{N}^{-1}$)
h_d	wysokość kropli mierzonej od płaszczyzny odniesienia (m)
<i>i</i>	liczebność składników
<i>K</i>	stała równowagi adsorpcji ($\text{m}^3\cdot\text{mol}$)
<i>k</i>	współczynnik konsystencji ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
k_B	stała Boltzmanna ($1,38\cdot 10^{23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$)
<i>n</i>	wskaźnik charakterystyczny płynięcia (-)
m_d	masa kropli (g)
<i>Q</i>	strumień objętościowy przepływu ($\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$)
<i>R</i>	stała gazowa ($8,31 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)
$R_{1,2}$	promień krzywizny kropli (m)
R_a	promień drogi oddechowej (m)
<i>Re</i>	liczba Reynoldsa (-)
<i>Stk</i>	liczba Stokesa (-)
<i>T</i>	temperatura (K)
<i>t</i>	czas (s)
<i>u</i>	prędkość płynu ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
T_a	temperatura absolutna powietrza (K)
u_a	prędkość aerozolu/powietrza ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
V_d	objętość kropli (m^3)
<i>Z</i>	względna zmiana wartości <i>Dv(50)</i> (%)

SYMBOLE GRECKIE

Γ_i	stężenie powierzchniowe składnika i ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$)
Γ_m	maksymalne stężenie powierzchniowe składnika ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$)
γ	odkształcenie powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz
$\dot{\gamma}$	szybkość ścinania (s^{-1})
$\dot{\gamma}_D$	szybkość dylatacyjnej deformacji powierzchni (s^{-1})
$\Delta\rho_{gl}$	różnica pomiędzy gęstością ośrodka gazowego i ciekłego ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
ΔP_0	zmiana ciśnienia w stosunku do płaszczyzny odniesienia
ε'	moduł zachowawczy ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)
ε''	moduł dyssypacyjny ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)
ε_D	moduł dylatacyjny, sprężystość powierzchniowa ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)
λ	długość fali (m)
μ	lepkość dynamiczna ($\text{Pa} \cdot \text{s}$)
μ_a	lepkość dynamiczna powietrza ($\text{Pa} \cdot \text{s}$)
μ_D	lepkość powierzchniowa ($\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$)
μ_i	molowy potencjał chemiczny ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)
κ	ściśliwość powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz ($\text{m} \cdot \text{N}^{-1}$)
π	ciśnienie powierzchniowe ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)
π_i	chwilowe ciśnienie powierzchniowe ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)
ρ	gęstość cieczy ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
ρ_d	gęstość cieczy tworzącej krople w chmurze aerozolowej ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
σ	napięcie powierzchniowe ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)
σ_i	chwilowe dynamiczne napięcie powierzchniowe ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)
σ_{max}	maksymalna wartość napięcia powierzchniowego cyklu kompresja-ekspansja ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)
σ_{min}	minimalna wartość napięcia powierzchniowego cyklu kompresja-ekspansja ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)
σ_e	równowagowe napięcie powierzchniowe ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)
σ_{sub}	napięcie powierzchniowe subfazy ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)
τ	naprężenia ścinające (Pa)
φ	kąt przesunięcia fazowego ($^\circ$)
ω	częstość oscylacji (s^{-1})

SKRÓTY I OZNACZENIA

ARLA	kalkulator depozycji aerosolu w płucach
AFM	mikroskopia sił atomowych (z ang. <i>atomic force microscopy</i>)
API	substancja aktywna (z ang. <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>)
BAC	chlorek benzalkoniowy
BAM	mikroskopia kąta Brewstera (z ang. <i>Brewster angle microscopy</i>)
CHOL	cholesterol
CBS	tensjometr uwięzionego pęcherzyka (z ang. <i>captive bubble surfactometer</i>)
CSD	tensjometr ograniczonej kropli (z ang. <i>constrained sessile drop</i>)
DOPC	1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfocholina
DPPC	1,2-dipalmitoilo-sn-glicerolo-3-fosfocholina
EDTA Na ₂	wersenian disodowy
ET	obszar górnych dróg oddechowych
FPF	udział cząstek drobnych (z ang. <i>Fine Particle Fraction</i>) (%)
G	stan gazowy organizacji monowarstwy
GLY	gliceryna
GLI	powierzchnia międzyfazowa ciecz-gaz (z ang. <i>gas-liquid interface</i>)
GLU	glukoza
GSD	geometryczne odchylenie standardowe (z ang. <i>Geometric Standard Deviation</i>) (-)
GRAS	generalnie uznane za bezpieczne (z ang. <i>generally recognised as safe</i>)
I	stan przejściowy organizacji monowarstwy
IV/VC	korelacja <i>in vitro/in vivo</i> (z ang. <i>in vivo/in vitro correlation</i>)
JN	nebulizator pneumatyczny (z ang. <i>jet nebulizer</i>)
LB	ciała lamelarne
LBB	waga Langmuira-Blodgetta (z ang. <i>Langmuir-Blodgett balance</i>)
LC	stan cieczy skondensowanej organizacji monowarstwy
LE	stan cieczy rozprężonej organizacji monowarstwy
LM	model lipidowy surfaktantu płucnego
LWB	waga Langmuir'a-Wilhelmy'ego (z ang. <i>Langmuir-Wilhelmy balance</i>)
MMAD	średnica aerodynamiczna mediany rozkładu masowego (z ang. <i>Mass Median Aerodynamic Diameter</i>)
MPS	model surfaktantu płucnego

MPPD	model wielościeżkowy obliczania depozycji cząstek (z ang. <i>multi-path particle dosimetry</i>)
NaCMC	sól sodowa karboksymetylocelulozy
P	pęcherzykowy obszar płuc
PA	kwas palmitynowy
PD	metoda wiszącej kropli (z ang. <i>pendant drop</i>)
PBS	tensjometr z pulsującym pęcherzem (z ang. <i>pulsating bubble surfactometer</i>)
POChP	przewlekła obturacyjna choroba płuc
POPE	1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfo-etanoloamina
POPG	1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfoglicerol
PS	surfaktant płucny (z ang. <i>pulmonary surfactant</i>)
RV	objętość rezydualna nebulizatora (m ³)
SI	indeks stabilności (-)
SPAN	rozpiętość rozkładu wielkości cząstek aerozolowych (-)
TB	tchawiczo-oskrzelowy obszar płuc
TM	membrany cylindryczne
UN	nebulizator ultradźwiękowy (z ang. <i>ultrasonic nebulizer</i>)
VMN	nebulizator siateczkowy (z ang. <i>vibrating mesh nebulizer</i>)

1. Wstęp

Świadectwem szczególnego znaczenia procesów atomizacji rozumianych jako procesy mające na celu rozbicie układu (na ogół: cieczy) na elementy o mniejszym rozmiarze jest szeroki zakres zastosowań, w których procesy tego typu odgrywają kluczową rolę. Wynika to przede wszystkim z niepodważalnych zalet układu będącego efektem atomizacji – aerozolu. Aerozol czyli układ dyspersyjny stworzony przez gazową fazę ciągłą oraz zawieszone w niej krople cieczy lub cząstki stałe tworzące fazę rozproszoną charakteryzuje się dużą sumaryczną powierzchnią międzyfazową gaz-ciecz oraz zredukowanym oporem przenoszenia masy w fazie ciągłej. Procesy atomizacji stanowią również źródło zjawisk naturalnych występujących w przyrodzie. Najlepszym przykładem jest m.in., bryza morska, ale także pożar czy erupcja wulkanu, w wyniku których powstają popioły i uwalniane są mikroelementy. Podobnie, za pewien rodzaj atomizacji można uznać erozję oraz wietrzenie, a więc procesy, w których w wyniku działania wody lub wiatru dochodzi do rozdrobnienia materiału stałego⁽¹⁾.

Obserwacje wspomnianych zjawisk naturalnych pozwoliły na zrozumienie mechaniki procesu atomizacji i tym samym pozwoliły podjąć próby wdrożenia atomizacji w różnych gałęziach przemysłu, w rolnictwie oraz w systemach ochrony środowiska. Ich efektem są m.in. atomizery wykorzystywane w absorpcyjnej spektrometrii atomowej, systemy natryskowe czy suszarki rozpyłowe. Przykłady zastosowań wspomnianych systemów zostały przedstawione w tabeli 1.1. Kolejnym, niezwykle ważnym krokiem było powiązanie procesu atomizacji z podawaniem leków. Współczesne atomizery, które znalazły zastosowanie w medycynie służą do podawania leków zarówno na skórę⁽²⁾, donosowo^(3,4), bezpośrednio do jamy ustnej czy gardła oraz do układu oddechowego^(5,6). Najczęściej proces ten wykorzystuje się jednak w aeroszoterapii do tworzenia aerozoli terapeutycznych w postaci m.in. mgieł, sprayów czy chmur aerozoli powstałych z proszków.

Obecnie, w wyniku ciągłego postępu gospodarczego, cywilizacyjnego i edukacyjnego wzrasta świadomość dotycząca płynących z tego rozwoju zagrożeń i negatywnych skutków dla zdrowia oraz życia człowieka. Przyczynia się to do szukania nowych, bardziej skutecznych rozwiązań w zakresie leczenia różnego typu schorzeń, w tym tych, w obrębie dróg oddechowych. Prowadzi to do długotrwałych badań na rzecz nowych substancji terapeutycznych, testowaniu nieznanych dotąd technik leczniczych czy rozwoju istniejących obecnie metod. Wśród prowadzonych badań istotnym elementem jest pogłębianie i wyjaśnienie mechanizmów oraz zależności pomiędzy składem leków i formulacji leczniczych, a uzyskiwanym efektem leczniczym. Dobrym przykładem jest w tym zakresie aeroszoterapia.

Stanowi ona metodę terapeutyczną, w której wciąż, mimo prowadzonych licznych działań rozwojowych, istnieje zapotrzebowanie na badania podstawowe mające na celu poszerzenie dostępnej wiedzy i wyjaśnienie zjawisk fizykochemicznych odgrywających kluczową rolę w procesie atomizacji leków inhalacyjnych. Prace badawcze podjęte w niniejszej rozprawie doktorskiej mają tym samym charakter interdyscyplinarny. Dzięki wykorzystaniu narzędzi inżynierii chemicznej, ale także wiedzy z zakresu medycyny i farmacji, zmierzają one do pogłębienia wiedzy w dominującym stopniu dotyczącej wytwarzania oraz mechaniki aerozoli leczniczych i ich interakcji z powierzchnią płucną.

Tab. 1.1. Przykłady zastosowań systemów wykorzystujących proces atomizacji

Przykład	Przeznaczenie	Obszar zastosowania
Atomizery	detekcja pierwiastków w atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu	analiza instrumentalna
	do dezynfekcji powierzchni, w środkach chemicznych stosowanych w gospodarstwach domowych ⁽¹⁾	środki czyszczące
	aplikatory dermokosmetyków, w tym kremów i emulsji ^(1,2)	przemysł kosmetyczny przemysł farmaceutyczny
Systemy natryskowe	poprawa homogeniczności rozprowadzenia pokrycia powierzchni ciał stałych takich jak pokrycia koloryzujące lub w funkcjonalizacji warstw ochronnych ⁽⁷⁻⁹⁾	budownictwo motoryzacja lakiernictwo
	nawożenie oraz stosowanie herbicydów czy pestycydów ⁽¹⁰⁾	rolnictwo
	równomierne nanoszenie cieczy podczas obróbki ropy ⁽¹¹⁾	przemysł mineralny
	układach oczyszczania powietrza ⁽¹²⁾ , poprawy jego jakości poprzez nawilżenie ⁽¹⁾ i systemy przeciwpożarowe ⁽¹³⁾	systemy ochrony środowiska
Suszarki rozpyłowe	przetwórstwo żywności ⁽¹⁴⁾ i mikrokapsulacja aromatów ⁽¹⁵⁾	przemysł spożywczy
	produkcja funkcjonalnych materiałów tekstylnych zawierających kosmetyki chroniące skórę (kosmetykotekstylii) ⁽¹⁶⁾	przemysł tekstylny
	produkcja leków proszkowych ⁽¹⁷⁾	przemysł farmaceutyczny

Szukanie możliwie najkorzystniejszych warunków przeprowadzania procesów atomizacji leków występujących w postaci cieczy lub też aerozolizacji proszków leczniczych, które leży

u podstawy aerozoloterapii, opiera się na ocenie i odpowiednim doborze wartości parametrów wpływających na proces. Parametry te można podzielić na dwie grupy (a) parametry zależne od osobniczych cech pacjenta oraz (b) wynikające z koncepcji samego procesu, które można zoptymalizować stosując dostępne narzędzia inżynierii chemicznej. Właśnie te zagadnienia zostały podjęte w części teoretycznej pracy, a następnie zweryfikowane na etapie badań.

Istotną rolę w projektowaniu użycia nowych substancji leczniczych oraz poprawy efektywności obecnie dostępnych technik aerozoloterapeutycznych stanowi prowadzona już na wczesnym etapie weryfikacja oddziaływań zdeponowanej dawki leku na powierzchnię płucną i pokrywającą ją płyny biologiczne w badaniach *in vitro*. Pomocnym przy tego typu badaniach jest ustanowienie kryteriów oceny, które w możliwie najpełniejszy sposób będą stanowić wskaźnik stanu fizjologicznego płuc. Przykładem takiego wskaźnika jest niewątpliwie surfaktant płucny odgrywający kluczową rolę w prawidłowej wentylacji płuc oraz z umożliwiającymi ocenę parametrami. Wyjaśnienie znaczenia badań *in vitro* nad interakcjami aerosol-surfaktant płucny stanowi jedno z kluczowych zadań podjętych w niniejszej pracy.

2. Terapie medyczne jako przykład szczególnego zastosowania atomizacji

Oprócz aerozoli zawierających zanieczyszczenia środowiskowe pochodzenia naturalnego np. pył pustynny lub pochodzenia antropologicznego np. cząstki stałe Diesla⁽¹⁸⁾, istnieje prężnie rozwijana grupa aerozoli terapeutycznych, wykorzystywanych jako medium nośnikowe substancji leczniczych podawanych wprost do układu oddechowego drogą wziewną. Terapeutyczne aerozole stanowią wielofazowe układy koloidalne, w których fazą dyspersyjną jest ośrodek gazowy (najczęściej powietrze, ale również czysty tlen lub heliox – mieszanina helu i tlenu)^(19,20), a fazą zdyspergowaną tworzą cząstki stałe lub krople. W przypadku układów koloidalnych zawierających substancję aktywną (API z ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*) w postaci cząstek stałych mamy do czynienia z aerozolami uwalnianymi m.in. z inhalatorów proszkowych lub ciśnieniowych. Natomiast układy dyspersyjne obejmujące API rozpuszczone w kroplach cieczy zawieszonych w gazie są określane mianem mgły i powstają przy użyciu m.in. inhalatorów donosowych oraz nebulizatorów⁽²¹⁾. Jak wspomniano wcześniej, to właśnie proces powstawania aerozoli (atomizacja) w specjalnie zaprojektowanych urządzeniach medycznych stanowi podstawę technik terapeutycznych wykorzystywanych w aeroszoterapii.

Jedną z wielu zalet aeroszoterapii jest szeroki zakres jej zastosowań. Farmaceutyki wziewne to zarówno (i) preparaty o ukierunkowanym działaniu lokalnym (miejscowym), które są stosowane w terapiach górnych i dolnych dróg oddechowych jak również (ii) preparaty o działaniu systemowym służące do ogólnoustrojowej dystrybucji leków. Obecnie w aeroszoterapii stosuje się: antybiotyki wziewne np. tobramycyna⁽²²⁾, aztreonam⁽²³⁾ czy kolistyna⁽²⁴⁾; leki antycholinergiczne np. atropina i skopolamina⁽²⁵⁾; biofarmaceutyki wziewne np. DNaza – dornaza alfa i insulina⁽²⁶⁾; leki immunosupresyjne np. cyklosporyna A⁽²⁷⁾; szczepionki np. przeciw grypie⁽²⁸⁾; leki przeciwgrzybicze np. amfoterycyna B^(23,29); leki przeciwgruźlicze np. amikacyna i kapreomycyna⁽³⁰⁾; wziewne leki sterydowe o krótkim i przedłużonym działaniu np. budezonid⁽³¹⁾; leki mukolityczne np. N-acetylocysteina i karbocysteina⁽³²⁾; leki przeciwzapalne np. α -1-antytrypsyna⁽³³⁾; leki rozszerzające oskrzela np. salbutamol i bromek ipratropium⁽³⁴⁾. Przedstawiony bogaty zbiór substancji aktywnych jest w znacznej części efektem zalet jakie wiążą się z wziewną drogą podawania leków. Zalety te sprawiają, że dużą wagę przykładą się nawet do adaptacji leków podawanych pierwotnie drogą doustną lub dożylną do formy wziewnej. Wynika to z wielu przyczyn. Jedną z nich jest fakt, że małoinwazyjna droga wziewna jest znacznie lepiej tolerowana przez pacjentów niż droga dożylna (zwłaszcza przez młodszych pacjentów)⁽³⁵⁾. Dodatkowo, porównując szybkość działania leków wziewnych oraz iniekcji podskórnej można zauważyć występowanie

przybliżonych efektów w podobnym czasie^(36,37). Natomiast zestawiając ze sobą leki doustne i inhalacyjne widoczna jest już wyraźna przewaga w szybkości występowania efektu terapeutycznego inhalacyjnej formy dostarczania leków⁽³⁸⁾. Efekt ten można tłumaczyć po części niską aktywnością enzymów w płucach oraz eliminacją biotransformacji substancji aktywnej (API) w wątrobie (brak tzw. efektu pierwszego przejścia, który jest obecny w przypadku doustnego podawania leków). Sprawia to, że leki inhalacyjne charakteryzują się dobrą biodostępnością płucną, czyli dawką leku wchłanianą przez układ oddechowy^(39,40). Za dobrą biodostępność płucną preparatów leczniczych odpowiada jednak również budowa samych płuc tj. nieznaczna grubość ścianki błony śluzowej pokrywającej płuca (0,1-0,2 μm), a co się z tym wiąże także duża jej przepuszczalność (absorpcja większości substancji o masie cząsteczkowej poniżej 40 kDa, w tym insuliny i morfiny), szybkość absorpcji przez błonę oraz silne ukrwienie dolnych dróg oddechowych, a przede wszystkim bardzo duża powierzchnia, która umożliwia absorpcję leku (ok. 100 m^2). Wysoka biodostępność oraz maksymalizacja depozycji lokalnej przy jednoczesnej minimalizacji dawki leku umożliwia znaczne ograniczenie efektów ubocznych związanych ze stosowaniem wielu leków co stanowi niepodważalną zaletę wziewnej drogi dostarczania leków⁽⁴⁰⁻⁴²⁾. Ze względu na wymienione zalety, obecnie upatruje się szczególnych szans w adaptacji do warunków inhalacyjnych farmakoterapii doustnej czy też dożylniej, przede wszystkim z obszaru obejmującego leki przeciwnowotworowe stosowane w leczeniu raka płuc⁽⁴³⁾, takie biofarmaceutyki wziewne, jak np. ludzki hormon wzrostu, środki stosowane w terapiach genowych, w tym plazmidy wektorowe⁽²⁶⁾, egzogenne surfaktanty stosowane w przypadku negatywnych skutków wentylacji płuc oraz w terapii noworodków z zespołem zaburzeń oddechowych⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾, czy też szczepionki m.in. testowana jest koncepcja wziewnej szczepionki przeciw COVID-19⁽⁴⁷⁾.

Mimo oczywistych zalet stosowania aerozoloterapii do leczenia systemowego, wciąż głównym przeznaczeniem tej metody jest podawanie leków o działaniu lokalnym w układzie oddechowym. Leki inhalacyjne wykorzystuje się w przypadku m.in. mukowiscydozy, astmy, nieżytu górnych dróg oddechowych, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP), przewlekłego zapalenia zatok czy zapalenia płuc oraz alergii. Znaczenie aerozoli leczniczych w terapiach chorób układu oddechowego jest ogromne⁽⁴¹⁾. Na oficjalnej stronie Światowej Organizacji Zdrowia⁽⁴⁸⁾, będącej opiniotwórczym autorytetem, pokazano jak istotną rolę odgrywa aerozoloterapia, w tym nebulizacja, jako narzędzie walki przeciwko astmie, POChP, pylicy czy mukowiscydozie. Przykładowo w 2019 roku POChP stała się trzecią najczęstszą przyczyną śmierci na świecie - w wyniku tej choroby zmarło 3,23 mln osób. Z kolei w tym samym roku astma, klasyfikowana obok POChP jako przewlekła choroba płuc, została

zdiagnozowana u 262 mln dzieci oraz dorosłych i odpowiada za ok. 455 tys. zgonów. Wspomniane schorzenia wg obecnego stanu wiedzy są nieuleczalne, ale mogą być kontrolowane. Odpowiedzią na pytanie, w jaki sposób można ograniczyć skutki takich chorób i spowolnić ich postępowanie jest bez wątpienia aerozoloterapia. Wśród wielu pacjentów szczególną grupę stanowią osoby, które, ze względu na zaawansowanie choroby, wiek (dzieci i osoby starsze) lub osobnicze cechy budowy płuc, cierpią na trudności oddechowe, a więc nie mogą wykonać poprawnego oddechu. W takim przypadku podawanie leku odbywa się przy pomocy nebulizatorów. Nebulizacja to technika lecznicza umożliwiająca atomizację cieczy do postaci drobnych kropeł, która w sposób ciągły, z wymuszeniem przepływu powietrza, wprowadza drogą wziewną lek do układu oddechowego⁽⁴⁹⁾. Krople powstające w nebulizatorach charakteryzują się polidyspersyjnym rozkładem wielkości, dlatego tylko część z nich, o odpowiedniej średnicy (poniżej 5 μm) może dotrzeć do pożądanego miejsca depozycji i wywołać efekt terapeutyczny (ogólnosystemowy lub lokalny)^(50,51).

Obszary depozycji mgieł leczniczych w drogach oddechowych, a co się z tym wiąże skuteczność terapii aerozolowej, zależą od właściwości i jakości aerozolu. Na właściwości chmury aerozolowej ma wpływ kilka elementów biologicznych i fizjologicznych np. indywidualne cechy pacjenta, wiek czy geometria płuc. Z drugiej strony skuteczność leczenia zależy również od czynników, które można zoptymalizować za pomocą narzędzi inżynierskich m.in. rozkładu wielkości cząstek aerozolu. Właściwości aerozolu można poprawić albo poprzez zmianę konstrukcji inhalatora, czy parametrów powietrza rozcieńczającego tj. wilgotności czy temperatury powietrza albo modyfikację właściwości fizykochemicznych preparatu^(51–54). Oba zagadnienia są bardzo interesujące z punktu widzenia pracy badawczo-rozwojowej, ponieważ optymalizacja charakterystyki mgły terapeutycznej może skrócić czas nebulizacji, obniżyć dawki farmaceutyku i zminimalizować skutki uboczne poprzez ograniczenie osadzania się aerozolu poza pożądaną miejscę depozycji^(55–57). Analiza dynamiki procesu atomizacji zachodzącego w komorze nebulizatora umożliwiająca lepsze poznanie wpływu wybranych czynników technicznych na rozkład wielkości kropeł w chmurze aerozolowej, wydaje się być szczególnie interesująca, przede wszystkim ze względu na potencjał rozwojowy terapii inhalacyjnych. Konieczność pogłębiania wiedzy w tym zakresie jest niepodważalna m.in. ze względu na stale pojawiające się wyzwania np. pandemia COVID-19⁽⁵⁸⁾. Jednocześnie, nowe wyzwania przed naukowcami stawia ciągły rozwój techniki umożliwiający wprowadzenie nowych rozwiązań, przykładowo stosunkowo nowe nebulizatory z wibrującą membraną⁽⁵⁹⁾ czy wprowadzanie modyfikacji we właściwościach formułacji leku.

3. Motywacja podjęcia badań

Głównym celem naukowym niniejszej rozprawy doktorskiej jest zbadanie procesu atomizacji cieczy pod kątem czynników technicznych wpływających na jakość aerozolu terapeutycznego uwalnianego z inhalatorów medycznych, ze szczególnym ukierunkowaniem na rolę właściwości fizykochemicznych cieczy atomizowanej. Podjętą tematykę badawczą umotywowano przede wszystkim potrzebą usystematyzowania i poszerzenia wiedzy od strony aspektów inżynierskich samego procesu, co jest podyktowane brakiem wystarczającej wiedzy w środowisku lekarskim, farmaceutycznym oraz wśród pacjentów. Krytyczna analiza aktualnego stanu informacji i istniejących w nich niedoborach leży u podstaw prezentowanych badań, które koncentrują się na wpływie właściwości fizykochemicznych rozpylanych cieczy oraz warunków nebulizacji na właściwości aerozolowe mgły leczniczej oraz jej potencjalne oddziaływanie na płuca. Zaproponowane w pracy podejście pozwala na przeprowadzenie badań o charakterze podstawowym, prowadzących do rozszerzenia znajomości z zakresu inżynierii chemicznej w zastosowaniu do wytwarzania i mechaniki aerozoli medycznych.

Przy rozważaniach nad technicznymi aspektami procesu atomizacji i analizie jakości aerozolu powstającego w nebulizatorach medycznych, należy zwrócić szczególną uwagę na niedoskonałość metod oceny skuteczności podawania leków oraz bezpieczeństwa inhalacji. Prowadzić to może do błędów skutkujących nieefektywnością leczenia. Ograniczenie technik pomiarowych i częściowa nieadekwatność ich stosowania w stosunku do analizy mgieł leczniczych zostało wykazane w podrozdziale 6.3. W niniejszej pracy poddano analizie normy, na podstawie których dopuszcza się do użytku nebulizatory medyczne. Regulacje te stosują pewnego rodzaju uproszczenia przy odtwarzaniu warunków ich działania np. założenie przepływu ustalonego. Uświadomienie istnienia takich założeń upraszczających jest istotne z punktu widzenia użytkownika oraz lekarza zlecającego terapię. Ten problem został szerzej omówiony w podrozdziałach 5.1-5.3 oraz rozdziale 6.

Kolejnym ważnym problemem, który poddano analizie, jest potrzeba testowania układów złożonych typu lek-nebulizator. Podyktowane jest to różnicami w konstrukcji i zasadzie działania urządzeń wykorzystywanych w nebulizacji. Może być to przyczyną odmiennego oddziaływania na ciecz zawierającą farmaceutyki, co przy złożoności ich składu, a więc i właściwościach fizykochemicznych rozpylanej cieczy, może wpływać na jakość uwalnianego aerozolu. Połączenie tej wiedzy przy uwzględnieniu innych inżynierskich aspektów aeroszoterapii, tj. dynamiki przepływu aerozolu i jego depozycji w układzie oddechowym, umożliwi w lepszym stopniu kontrolowanie i optymalizację terapii inhalacyjnych.

Kolejnym istotnym aspektem jest obserwowana na rynku produktów farmaceutycznych wzrost obecności leków generycznych (odtwórczych) bazujących na składzie leków innowacyjnych. Różnice w formulacji farmaceutyków jest akceptowana jedynie w kwestii substancji pomocniczych (ich zawartości oraz składu), których udział może stanowić do 99% całej kompozycji^(60,61). Dopuszczenie takich leków do użytku polega na analizie biorównoważności z lekiem oryginalnym, co zostało szerzej omówione w podrozdziale 7.2. Jednakże, inne zmiany w kompozycji mogą wpływać na jakość aerozolu, a więc na skuteczność aeroszoterapii, co nie podlega ścisłej ocenie przy rejestracji leków odtwórczych.

Uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej jest również coraz powszechniejsze stosowanie nowych nebulizatorów siateczkowych (membranowych), których działanie opiera się na wymuszeniu drgań o zadanej częstotliwości wprowadzających perforowaną membranę w vibracje. Urządzenia tego typu zapewniają liczne korzyści są pożądane z punktu widzenia pacjenta. Jednakże, w dalszym ciągu mało jest wyników dotyczących ich stosowania z konkretnymi produktami leczniczymi. Dokładny opis tych nebulizatorów zamieszczono w rozdziale 6.

Ostatni czynnik motywujący do podjęcia badań jest związany z dążeniem do zastąpienia stosowanych obecnie w formulacjach leczniczych syntetycznych substancji pomocniczych, substancjami o pochodzeniu naturalnym, charakteryzującymi się zbliżoną i dobrze kontrolowaną zdolnością do modyfikacji wybranych o właściwości formulacji leczniczych, w tym powierzchniowo czynnych lub reologicznych (płyny tiksotropowe lub rozrzedzane ścinaniem). Takie podejście może zindywidualizować formulacje lecznicze oraz terapię, zapewniając odpowiednią depozycję leku w pożądanym obszarze dróg oddechowych (terapia miejscowa). Dodatkowo, ze względu na fakt, że nebulizatory, wytwarzają aerozol polidispersyjny, zastosowanie nowych substancji pomocniczych może spowodować zwężenie szerokości rozkładu wielkości uwalnianych kropeł, co powinno przynieść korzyści podwyższające skuteczność terapii.

4. Teza i zakres pracy

W niniejszej pracy zweryfikowano poniższe przypuszczenia:

- 1) *Charakterystyka aerozolu do zastosowań medycznych zależy od konstrukcji nebulizatora, właściwości fizykochemicznych cieczy rozpylanej i sposobu użytkowania, a dobierając odpowiednie właściwości cieczy i warunki prowadzenia procesu atomizacji można poprawić efektywność dostarczania inhalowanego aerozolu.*
- 2) *W tym celu można również zastosować domieszki biozgodnych związków pochodzenia naturalnego. Jednocześnie bezpieczeństwo stosowania tych dodatków w inhalacji można ocenić doświadczalnie przez pomiary ich oddziaływań fizykochemicznych ze składnikami płynów występujących w układzie oddechowym.*

Udowodnienie postawionych tez wymaga przeprowadzenia szeregu zadań badawczych poczynwszy od (1) doboru substancji modelowych i opracowaniu metodyki badawczej; poprzez (2) charakterystykę roztworów leków inhalacyjnych oraz substancji pochodzenia naturalnego o potencjale aplikacyjnym w aeroszoterapii, (3) badanie właściwości aerodynamicznych aerozolu wytworzonego w procesie atomizacji wybranych roztworów aż do (4) oszacowania przewidywanej ilości zdeponowanego aerozolu w układzie oddechowym za pomocą modeli numerycznych i (5) określenia wpływu osadzonych substancji na płyn płucny w badaniach *in vitro* przeprowadzonych w warunkach dynamicznych. Działania przeprowadzone w ramach realizacji niniejszej pracy zostały zaplanowane jako sekwencja badań, co umożliwia odpowiednią kontrolę oraz zastosowanie uzyskanych wyników do rozważań w kolejnym etapie badań. Ogólny plan pracy został przedstawiony w formie schematu blokowego (Rys. 4.1.).

- i. *Charakterystyka właściwości fizykochemicznych wybranych cieczy przeznaczonych do atomizacji w poszczególnych typach nebulizatorów*

W ramach tego etapu badań dokonano, na podstawie przeglądu literaturowego, wyboru substancji modelowych zmieniających kluczowe właściwości cieczy wpływające na jakość aerozolu, leki inhalacyjne (w postaci roztworów wodnych lub zawiesin) oraz substancje pochodzenia naturalnego, które mogą zostać użyte jako substancje pomocnicze w lekach stosowanych w nebulizacji. Następnie, scharakteryzowano wybrane substancje pod względem właściwości fizykochemicznych. Otrzymane wyniki stanowią podstawę doboru najdogodniejszego stężenia cieczy w przypadku substancji pochodzenia naturalnego.

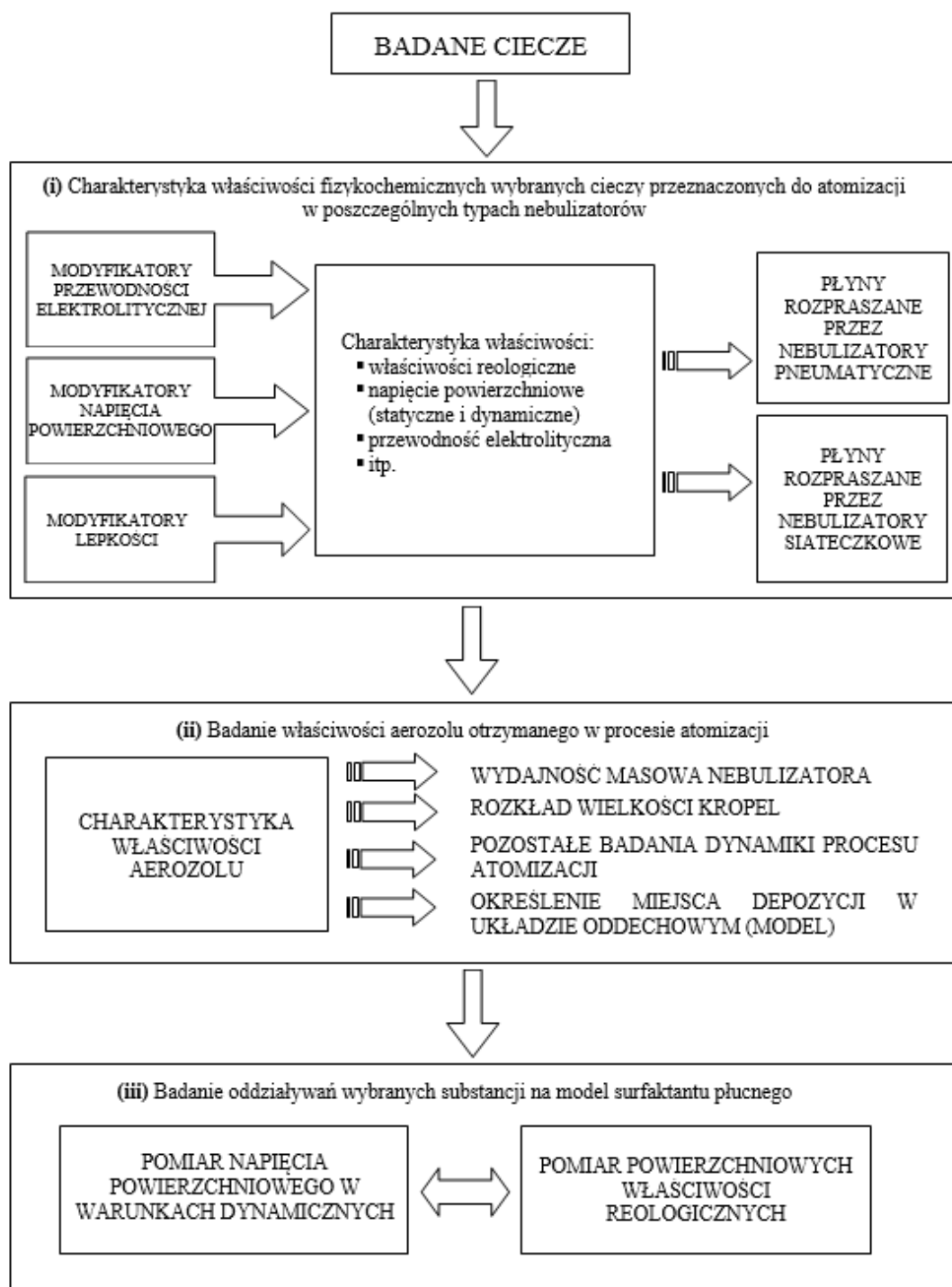
- ii. *Badanie właściwości aerozolu otrzymanego w procesie atomizacji w nebulizatorach*

Zakres tego etapu obejmował charakterystykę aerozolu uwalnianego z dwóch typów nebulizatorów (nebulizator pneumatyczny i nebulizator siateczkowy) poprzez atomizację

substancji wybranych w (i) etapie. Uzyskane wyniki rozkładu wielkości kropeł aerozolu zostały zaimplementowane do dostępnych modeli numerycznych zdeponowanych kropeł w drogach oddechowych. W konsekwencji, umożliwiło to obliczenie dawki zdeponowanej w każdym rejonie układu oddechowego, w tym w najgłębszej części płuc – pęcherzykach płucnych pokrytych surfaktantem płucnym.

iii. Badanie oddziaływań wybranych substancji na model surfaktantu płucnego

Wyliczona dawka aerozolu zdeponowanego w pęcherzykach płucnych umożliwia obliczenie stężeń badanych substancji osadzonych na powierzchni surfaktantu płucnego. Etap ten jest kluczowy do wykonania pomiarów interakcji inhalowanych cieczy z surfaktantem płucnym. Badania były prowadzone w układach *in vitro* poprzez pomiary napięcia powierzchniowego w warunkach statycznych i dynamicznych (symulujących procesy fizjologiczne w płucach podczas cyklu oddechowego) oraz zostały uzupełnione o analizę efektów związanych z reologicznymi właściwościami powierzchni ciecz-gaz. Tak zaprojektowana sekwencja pomiarowa umożliwia ocenę zachowania powierzchni międzyfazowej pęcherzyków płucnych.



Rys. 4.1. Schemat blokowy sekwencji zadań badawczych

5. Elementy inżynierii chemicznej w zastosowaniu do opisu procesów biegnących w układzie oddechowym

5.1. Budowa i funkcje dróg oddechowych człowieka

Drogi oddechowe jako system odpowiadający za doprowadzanie tlenu do krwi oraz usuwanie CO_2 z organizmu, jest wyeksponowany na ciągły kontakt z ośrodkiem gazowym. Oddychanie wiąże się z wymianą do 10 m^3 powietrza w ciągu doby. Dlatego, z punktu widzenia inżynierii chemicznej układ oddechowy, pod względem funkcji, można potraktować jako wymiennik masy (absorber-desorber) jednocześnie pełniący funkcję separatora cząstek aerozolowych, dzięki swojej strukturze, na którą składają się przewody o malejącym przekroju⁽²¹⁾. Same płuca można uprościć do systemu rozgałęzień „Y”-kształtnych zakończonych strukturą przypominającą plaster miodu⁽⁶²⁾. Taka geometria odpowiada za bardzo dobre właściwości separacyjne układu oddechowego. Dodatkowo, funkcje układu są wspomagane poprzez pokrycie wewnętrznych ścianek systemem włosków i rzęsek oraz biologicznymi płynami płucnymi tj. śluzem nosowo-oskrzelowym czy surfaktantem płucny^(37,41,51). Mechanizmy chroniące drogi oddechowe przed zanieczyszczeniami oraz odpowiadające za depozycję leku wprowadzanego drogą wziewną zostały przedstawione w podrozdziale 5.2. Z drugiej strony, główną funkcją układu oddechowego jest pośredniczenie w efektywnym przebiegu procesów przenikania masy, co może wykorzystywanym m.in. przy podawaniu farmaceutyków o działaniu ogólnosystemowym. Sprawna wymiana masy jest możliwa dzięki dużej powierzchni (do 100 m^2) oraz barierze dyfuzyjnej powietrze/krew o małej grubości (do $1 \mu\text{m}$)⁽⁴⁰⁾.

Kolejnym istotnym aspektem, z punktu widzenia inżynierii, jest zmienny charakter przepływu (przepływ nieustalony wdech-wydech) w układzie oddechowym. Przepływ powietrza może cechować się lokalną burzliwością, przejściowym lub laminarnym charakterem w zależności od regionu dróg oddechowych i fazy cyklu oddechowego. Przepływ burzliwy cechuje się zwiększonym oporem przepływu i dominuje w większych, pod względem przekroju poprzecznego, przewodach układu oddechowego oraz w okolicy ich rozgałęzień. Przepływ laminarny zwykle występuje w przewodach o niewielkich średnicach. Dynamika wdychanego aerozolu ulega również zmianie w zależności od aktywności fizycznej organizmu – wyróżniamy stan spoczynkowy oraz podwyższoną/obniżoną wydolność oddechową^(49,62–64). Przepływ nieustalony powietrza wynika bezpośrednio z cykliczności wdech-wydech, którą można przyrównać do działania pompy wytwarzającej zmienny (periodyczny) przepływ o natężeniu Q . Złożoność czasowo-przestrzenna procesów towarzyszących cyklowi wdech-

wydech wynika m.in. ze zmian zwrotu kierunku przepływu, lokalnej fluktuacji prędkości powietrza zależnej od przekroju danego przewodu układu oddechowego oraz zmian wielkości natężenia przepływu w czasie⁽⁶⁵⁾. Ze względu na właściwości mechaniczne ścianek dolnych dróg oddechowych, płuca można potraktować jako membranę o bardzo dobrych parametrach elastycznych, która poddawana jest periodycznym zmianom ciśnienia. Energia dostarczana do płuc podczas wdechu, nie jest całkowicie oddana w trakcie wydechu. Wynika to z częściowej dyssypacji energii oraz częściowego przekształcenia jej na przepływy powierzchniowe związane z hydrodynamicznymi procesami oczyszczania płuc⁽⁶⁶⁾. Opisane zjawisko można zaobserwować jako histerezę objętościowo-ciśnieniową, jak również w głębszych partiach dróg oddechowych – pęcherzykach płucnych w postaci histerezy napięcia powierzchniowego^(66–69).

5.2. Inhalacyjne dostarczanie leków do płuc - transport aerozolu w układzie oddechowym

Tak, jak już wspomniano w podrozdziale 5.1, drogi oddechowe stanowią bardzo dobry system filtracyjny o budowie, charakteryzującej się dychotomicznym podziałem oskrzeli i oskrzelików, w której wyróżnia się 23 generacje (pokolenia) charakteryzujące się zmniejszającą średnicą przewodów oddechowych. Podczas przepływu powietrza przez zwężające się drogi oddechowe dochodzi do oczyszczania powietrza z zawieszonych w nim kropeł⁽⁷⁰⁾. W przypadku bioaerozolu zawierającego drobnoustroje, ich fragmenty lub metabolity, niebiologiczne cząstki mineralne czy zanieczyszczenia pyłowe stanowi to pożądany efekt ochronny, lecz w przypadku leków wziewnych jest barierą przeszkadzającą w dotarciu farmaceutyku do płuc. W niniejszym podrozdziale zdecydowano się na prześledzenie drogi jaką przebywają cząstki aerozolowe inhalowanego leku w drogach oddechowych.

Terapie inhalacyjne prowadzone z wykorzystaniem nebulizatorów są to zwykle sesje trwające od kilku- do kilkunastu minut, polegające na wdychaniu zatomizowanego ciekłego leku przez ustnik, maseczkę lub też podawanego dotchawiczo^(49,71). Aerozol uwalniany z nebulizatora i wprowadzony przez ustnik dociera w pierwszej kolejności do jamy ustnej i wraz z wdychanym powietrzem przepływa przez krtań, tchawicę do dolnych dróg oddechowych, gdzie może osiągnąć oskrzeliki i pęcherzyki płucne. Krople tworzące chmurę aerozolową mogą ulec depozycji w każdym z pokonywanych odcinków dróg oddechowych. Należy przy tym jednak zaznaczyć, że sprawność depozycji małych kropli (o średnicy z zakresu 200-800 nm) jest ograniczona przez co zostają one usunięte z organizmu podczas wydechu⁽⁷²⁾.

Znaczna część wprowadzanego aerozolu leczniczego (głównie duże krople >10 µm) deponuje się już w obszarze jamy ustnej, a szczególnie intensywna depozycja zachodzi na tylnej ścianie gardła oraz w krtani. Obecność dużych kropeł wynika z polidispersyjności chmury

aerozolowej wytwarzanej w nebulizatorach, natomiast ich depozycja w początkowym odcinku dróg oddechowych jest związana z geometrią charakterystycznego przejścia - jama ustna-gardło-krtani, uniemożliwiającej penetrację takich kropeł w głąb dróg oddechowych. W odcinku tym depozycji przeważnie ulegają krople o średnicy powyżej 5 μm i to one odpowiadają za ewentualne lokalne działania niepożądane leku np. w przypadku budezonidu i innych sterydów: kaszel, suchość w gardle, czy kandydoza jamy ustnej⁽⁶⁵⁾. Działania niepożądane o charakterze ogólnosystemowym mogą wystąpić po przedostaniu się farmaceutyku do układu krwionośnego. Ma to miejsce po połknięciu leku osadzonego w gardle, choć może on ulec metabolizmowi w wątrobie^(39,49).

Fracja inhalowalna (respirabilna), czyli krople o średnicy aerodynamicznej poniżej 5 μm , swobodnie pokonują opisany obszar i penetrują drogi oddechowe aż do najgłębszych partii. Zgodnie z wiedzą dotyczącą geometrii płuc oraz osadzania się kropeł można stwierdzić, że krople o średnicy z zakresu 2-5 μm deponują się głównie w oskrzelach, a o średnicy 1-2 μm - w oskrzelikach i pęcherzykach płucnych^(50,70,73,74). Jednocześnie, całkowita i regionalna depozycja cząstek tej wielkości zależy także od szeregu innych czynników tj. od właściwości samych kropeł (ich wielkość i skład chemiczny), właściwości aerozolu (stężenie kropeł fazy rozproszonej, parametry fazy ciągłej: temperatura i wilgotność powietrza), dynamiki przepływu oraz skuteczności mechanizmów osadzania cząstek aerozolowych (Rys. 5.1.)^(51,75).

Wprowadzenie aerozolu do dróg oddechowych powoduje, że oddziałuje on ze środowiskiem gazowym cechującym się wysoką wilgotnością (nasycenie) oraz temperaturą fizjologiczną (zwykle wyższą niż temperatura otoczenia). Z jednej strony powoduje to zmianę parametrów fazy dyspergującej (powietrza), ale także sprawia, że już w bliskiej odległości od wlotu (w jamie ustnej) zmianie mogą ulegać parametry cząstek fazy rozproszonej. Związane jest to z możliwością wzrostu wielkości kropeł na skutek kondensacji pary wodnej (dotyczy cieczy higroskopijnych) oraz koalescencji^(76,77).

Depozycji na skutek wychwytu oraz wytrącania elektrostatycznego podlegają głównie cząstki o wydłużonym kształcie i obdarzone ładunkiem elektrostatycznym, co w przypadku aerozoli zawierających krople leków inhalacyjnych ma pomijalne znaczenie^(78,79). Natomiast zderzenie bezwładnościowe (inercja), sedymentacja i dyfuzja zależą od wielkości inhalowanych kropeł oraz prędkości przepływu. Ze względu na możliwość występowania przepływu burzliwego w szczytowej fazie wdechu w siedmiu pierwszych generacjach drzewa oskrzelowego, dominującym mechanizmem depozycji w tym obszarze kropeł jest inercja. Wraz ze zwężaniem przekroju dróg przewodzących i wzrostem całkowitej powierzchni przekroju dróg oddechowych (z 1,6 cm^2 na wysokości tchawicy do 700000 cm^2 na poziomie pęcherzyków

płucnych), średnia prędkość powietrza przemieszczającego się w głąb dróg oddechowych maleje. W związku z tym przepływ ulega laminaryzacji i tym samym depozycja na drodze sedymentacji oraz dyfuzji (w obszarze pęcherzyków) zaczyna przeważać^(75,80,81). Jednocześnie, sposób oddychania również ma wpływ na to, który typ mechanizmu będzie dominował. Powolne oddychanie wydłuża czas przebywania aerozolu w płucach, zwiększając efektywnością działania dyfuzji i sedymentacji⁽⁵²⁾. Poniżej omówiono trzy najważniejsze mechanizmy depozycji inhalowanych kropeł aerozoli leczniczych. Ogólnie przyjęto, że ze względu na pokrycie dróg oddechowych płynami biologicznymi depozycja jest nieodwracalna, tj. uderzająca kropla lub cząstka nie ulega odbiciu.

Mechanizm zderzeń bezwładnościowych

Mechanizm inercyjny dominuje w pierwszych 7 generacjach^(77,82). Inercja (bezwładność) to zjawisko fizyczne, którym można wyjaśnić tendencję elementów fazy rozproszonej aerozolu do utrzymywania trajektorii ruchu zgodnej z pierwotnym przepływem gazu w warunkach, w których dochodzi do zaburzenia kierunku tego przepływu, np. na skutek jego dostosowania do krzywizn dróg oddechowych⁽⁸³⁾. Krople cechujące się wystarczającym pędem podlegają działaniu siły odśrodkowej w miejscach nagłej zmiany kierunku przepływu fazy gazowej, co prowadzi do ich zderzenia ze ścianą przewodu oddechowego. Do oceny depozycji w wyniku zderzeń stosuje się bezwymiarową liczbę Stokesa, Stk (równanie 5.1). Wraz ze wzrostem wartości liczby kryterialnej Stk wzrasta prawdopodobieństwo zajścia zderzeń bezwładnościowych:

$$Stk = \frac{\rho_d d_d^2 u_a}{18 \mu_a R_a} \quad (5.1)$$

gdzie ρ_d oznacza gęstość materiału cząstek, u_a to prędkość aerozolu/powietrza, d_d to średnica cząstki (kropki), μ_a określa lepkość powietrza, a R_a oznacza promień drogi oddechowej⁽⁷⁸⁾. Mechanizm ten jest dominujący przede wszystkim dla cięższych kropeł, gdyż Stk jest proporcjonalna do kwadratu średnicy kropli d_d .

Mechanizm sedymentacji

Sedymentacja jest procesem polegającym na grawitacyjnym opadaniu cząstek. Z tego względu określone warunki inhalacji tj. wstrzymywanie oddechu oraz spowolniony cykl oddechowy sprzyjają zwiększonej depozycji⁽⁷⁸⁾. Sedymentacja dotyczy głównie kropeł o średnicy z zakresu 1-3 μm i dominuje w drogach oddechowych od 5. do 17. generacji, gdzie przepływ powietrza jest mniejszy i ulega laminaryzacji. Sprawność mechanizmu zależy od masy, a więc wielkości cząstek oraz długości drogi opadania w stosunku do czasu przebywania cząstki w danym obszarze⁽⁸¹⁾.

Mechanizm dyfuzji

Dynamika transportu leku wziewnego w drogach oddechowych opiera się na fundamentalnym prawie mówiącym, że elementy fazy rozproszonej poruszają się z taką prędkością co faza gazowa. Takie założenie dotyczy jednak w większości kropeł o znacznej masie. W przypadku kropeł drobniejszych równorzędną rolę do wyżej opisanego transportu konwekcyjnego odgrywa dyfuzja, którą można wyrazić za pomocą wyrażenia opisującego tzw. efektywny współczynnik dyfuzji D (równanie 5.2). Zgodnie z równaniem Stokesa-Einsteina:

$$D = \frac{k_B T_a}{3\pi\mu_a d_d} \quad (5.2)$$

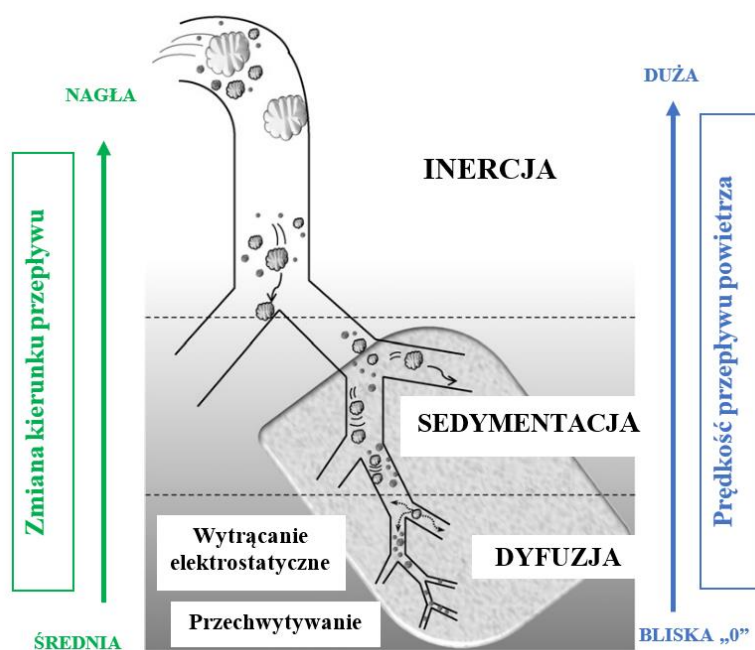
gdzie k_B oznacza stałą Boltzmanna, a T_a określa temperaturę bezwzględną powietrza. Współczynnik dyfuzji są tutaj odwrotnie proporcjonalne do średnicy kropeł^(52,79). Krople submikronowe ulegają oddziaływaniom wynikającym z licznych przypadkowych zderzeń z molekułami gazu, co prowadzi do ich dyfuzji (ruchów Browna). W wyniku ich przemieszczenia dochodzi do osadzania na powierzchni dróg oddechowych⁽⁷⁵⁾.

W zależności od miejsca depozycji substancja lecznicza jest wchłaniana i transportowana poprzez warstwę płynu biologicznego pokrywającego drogi oddechowe, tj. śluz oskrzelowy lub surfaktant płucny, do receptorów znajdujących się w błonach komórek nabłonka wywołując tym samym lokalny efekt farmakologiczny, lub trafia do krwioobiegu przynosząc efekt ogólnoustrojowy^(18,84). Jednocześnie, w przypadku niektórych formułacji leczniczych, a zwłaszcza tych o charakterze zawiesin istnieje możliwość, że cząstki farmaceutyku nie zostaną wchłonięte i będą podlegać tzw. *klirensowi* – naturalnemu procesowi samooczyszczania się płuc, którego podstawę stanowi transport śluzowo-rzęskowy w obrębie drzewa oskrzelowego oraz hydrodynamiczny transport w obszarze dystalnym, będący wynikiem efektów Marangoniego (patrz: podrozdział 5.4.4). Układ śluzowo-rzęskowy jest tworzony przez nabłonkowy system wypustek komórek migawkowych (rzęsek) rytmicznie poruszających się w warstwie zolu. Najbardziej zewnętrzną warstwę układu stanowi lepkością żel⁽⁸⁵⁾. Całkowita grubość pokrycia nabłonka warstwą śluzu zmienia się od 0,05 μm (16. generacja) do 15 μm (oskrzela)⁽⁸⁶⁾ w zależności od umiejscowienia w drogach oddechowych. Mimo stosunkowo dużej szybkości transportu śluzu, która w zależności od numeru generacji wynosi ok. 0,001-5 mm/min, czas retencji (przebywania do momentu usunięcia) cząstek i leków, które nie uległy rozpuszczeniu w warstwie śluzu i wchłonięciu, wynosi do 40 h^(70,87). Czas ten stanowi szczególnie istotny parametr w przypadku zawiesin posiadających API w postaci cząstek słabo rozpuszczalnych w wodzie⁽⁸⁸⁾. Kolejnym, ważnym mechanizmem ochronnym wspomagającym usuwanie cząstek zdeponowanych na powierzchni

śluzu oraz surfaktantu płucnego jest fagocytoza makrofagowa, która stanowi element odpowiedzi immunologicznej organizmu⁽⁸⁹⁾. Naturalnym odruchem obronnym organizmu przed zanieczyszczeniami znajdującymi się we wdychanym powietrzu jest również kaszel. Może powodować on usunięcie zdeponowanego leku z górnych jak i dolnych partii dróg oddechowych na skutek odrywania małych porcji śluzu i porywania ich przez wymuszony nagły wyrzut powietrza^(90,91).

Biorąc pod uwagę wspomniane mechanizmy można jednoznacznie stwierdzić, że dawka leku wygenerowana przez nebulizator różni się od dawki zdeponowanej. Wybrane osobnicze cechy chorego (tj. sposób oddychania, czy indywidualna morfologia płuc) sprawiają, że sprawność depozycji cząstek aerozolowych w drogach oddechowych jest kwestią w dużej mierze indywidualną. Cząstki charakteryzujące się nieodpowiednim rozmiarem dla danego pacjenta, tzn. niezapewniającym depozycji w drogach oddechowych zostaną usunięte podczas wydechu. Jednocześnie, dawka odpowiadająca za efekt terapeutyczny różni się od nominalnej dawki leku również ze względu na pewną ilość leku, która nie opuszcza w ogóle nebulizatora (tzw. objętość rezydualna), deponuje się w obszarze niepożądanym (np. jama ustna) lub zostaje usunięta przez *klirens*.

Przedstawione informacje potwierdzają, że szereg zagadnień związanych z depozycją inhalowanych leków w układzie oddechowym wpisują się w obszar zainteresowań badawczych inżynierii chemicznej i procesowej, przede wszystkim dotyczących m.in. dynamiki przepływu układów rozproszonych – w tym przypadku: aerozolu.



Rys. 5.1. Dominujące mechanizmy depozycji cząstek aerozolu leczniczego w układzie oddechowym^(75,77)

5.3. Metody obliczania dawek leków zdeponowanych w płucach

Przy obliczaniu depozycji leków inhalacyjnych umownie przyjęto rozróżnienie układu oddechowego na trzy główne regiony: (i) górnych dróg oddechowych (ET, z ang. *extra-thoracic*) obejmujący jamę nosową, jamę ustną aż do tchawicy; (ii) tchawiczo-oskrzelowy (TB, z ang. *tracho-bronchial*); (iii) pęcherzykowy (P, z ang. *pulmonary*), w którym zachodzi wymiana gazowa(92). Do matematycznej analizy płuc stosuje się morfometryczne modele obszarów TB i P, w których zazwyczaj przyjmuje się podział na tzw. generacje. W założeniu dolne drogi oddechowe stanowią przewodzące rurki cylindryczne o jednakowych średnicach i długościach w ramach generacji. Historycznymi przykładami takich modeli są model Weibla, dzielący płuca na 23 generacje (rozwidlenia), stanowiące sieć przewodów: oskrzeli i oskrzelików, Horsfielda i Cumminga, Hansena i Ampaya oraz Yeha i Schuma^(70,73,80,93). Modele różnią się między sobą założeniami, oznaczeniami (nomenklaturą) oraz stosowanymi uproszczeniami, co zostało przedstawione w tabeli 5.1. Obecnie mimo ogromnej popularności, modele morfometryczne ustępują na rzecz dokładniejszych i spersonalizowanych modeli opartych na technice rezonansu magnetycznego i tomografii komputerowej^(75,94).

Założenia morfometryczne połączone z modelowymi krzywymi oddechowymi mogą posłużyć m.in. do analiz *in vitro* miejsca depozycji aerozoli leczniczych poprzez zwiększenia precyzji wyliczeń względem rzeczywistych danych⁽⁹⁵⁻⁹⁹⁾. Większość powyższych modeli (morfometrycznych oraz wzorów krzywych oddechowych) stanowi narzędzie inżynierskie przy projektowaniu nowych inhalatorów oraz leków i stosowane jest w modelach obliczających dawki zdeponowane aerozoli rozpylanych w urządzeniach medycznych.

Jednym z najbardziej popularnych modeli obliczeniowych jest model MPPD (z ang. *multi-path particle dosimetry model*) stworzony przez *Applied Research Associates*. Model MPPD umożliwia oszacowanie depozycji cząstek aerozolu monodispersyjnego lub polidispersyjnego w drogach oddechowych człowieka lub szczura (zastosowanie modeli zwierzęcych w toksykologii). Oprogramowanie umożliwia obliczenia na wyidealizowanym modelu morfometrycznym płuc m.in. Yeh-Schum, Weibel lub 5-płatowym. Model oparty jest na metodzie jednościeżkowej (z ang. *single-path*), obliczającej depozycję cząstek w głównej drodze przepływu oraz wielościeżkowej (z ang. *multi-path*) metodzie śledzenia przepływu aerozolu, która umożliwia wyliczenie depozycję cząstek we wszystkich ścieżkach dróg oddechowych. Model opiera się na teoretycznych kalkulacjach wydajności depozycji cząstek aerozolowych uwzględniających działanie mechanizmów: dyfuzji, sedymentacji oraz sił impakcyjnych w rozgałęzieniach dróg oddechowych. Obliczenia modelowe uwzględniają również efekt usuwania zdeponowanych cząstek przez organizm (*klirens*) oraz filtracji aerozoli

w jamie nosowej^(100,101). W wyniku obliczeń otrzymuje się informacje o wielkości frakcji zdeponowanej, czyli o stosunku masy cząstek o określonej wielkości zdeponowanych w danym regionie (ET, TB i P) do masy zainhalowanych cząstek tej samej wielkości⁽¹⁰²⁾. Model ten umożliwia analizę depozycji cząstek aerozolowych charakteryzujących się szerokim zakresem wielkości, tj. od 1 nm do 100 μm .

Tab. 5.1. Porównanie założeń i cech wybranych modeli morfometrycznych^(52,70,73,80,92,93,103–106)

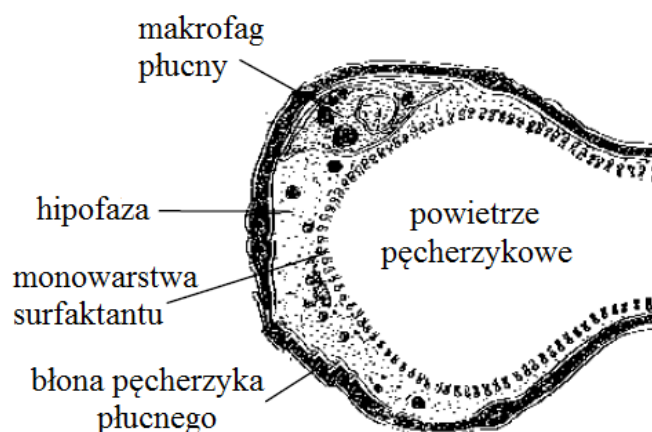
Założenia/Cechy	MODELE			
Opis struktury płuc				
Założony kształt generacji dróg oddechowych	system rozgałęzień cylindrycznych rurek (Weibel; Yeh i Schum; International Commission on Radiological Protection)	system rozwidleń „Y”-kształtnych (Koblinger i Hofmann)	na podstawie morfometrycznych pomiarów m.in. uwzględnienie długości oraz kątów rozgałęzień (Raabe et al.)	
Typ rozgałęzień	asymetryczne (Horsfield i Cumming; Raabe et al.; Koblinger i Hofmann)		symetryczne (uproszczone) (Weibel; Yeh i Schum; International Commission on Radiological Protection)	
Topologia dróg oddechowych względem tchawicy	tchawica – generacja „0” (Weibel; International Commission on Radiological Protection)	tchawica – generacja „1” (Yeh i Schum; Koblinger i Hofmann)	tchawica – generacja „25” (odwrócona numeracja) (Horsfield i Cumming)	
Uwzględnienie pęcherzyków płucnych	kuliste objętości (workowate struktury) (Hansen i Ampaya)		struktury groniaste (struktura plastra miodu) (Haefeli-Bleuer i Weibel)	
Pierwzór założeń				
Przyjęte założenia innych modeli	na podstawie Weibla (Haefeli-Bleuer i Weibel)	na podstawie ścieżki głównej (Yeh i Schum)	na podstawie morfologicznych pomiarów (Raabe et al.)	na podstawie założeń kilku różnych modeli (James)

Obecnie do obliczania sprawności depozycji cząstek aerozolowych w wybranych obszarach układu oddechowego stosuje się modelowanie CFD. Wymaga to uwzględnienie złożoności geometrii układu oddechowego oraz doboru o odpowiednich warunków brzegowych przy rozwiązaniu równań przepływu oraz ruchu cząstek zawieszonych w płynie^(98,108–110). W celu skrócenia czasu obliczeń często wykonuje się je dla przepływu ustalonego powietrza, co jest znaczącym uproszczeniem. Pokazują to m.in. prace zespołu PW^(98,111). Metoda ta zyskuje również coraz większe uznanie w klinicznych zastosowaniach do oceny zabiegów inhalacyjnych⁽¹⁰⁹⁾.

5.4. Układ surfaktantu płucnego i jego znaczenie jako bariery ochronnej organizmu

Jak już wspomniano w podrozdziale **Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.**, w procesie atomizacji w nebulizatorach powstają krople o pewnym zakresie rozmiarów, w tym na tyle małe, że podczas inhalacji w fazie wdechu mogą dotrzeć do pęcherzyków płucnych. Obszar ten ma powierzchnię ok. 100 m², co sprzyja efektywnej wymianie gazowej⁽⁴⁰⁾. Pęcherzyki płucne są pokryte biologicznie aktywnym płynem płucnym, który stanowi naturalną barierę dla środowiska zewnętrznego⁽¹¹²⁾ (Rys. 5.2.). Ze względu na swój skład, tj. zawartość fosfolipidów, białek i sacharydów, opisywany układ biologiczny, zwany surfaktantem płucnym (PS), wykazuje unikalne cechy. Jego składniki umożliwiają formowanie monowarstwy na powierzchni ciecz-gaz pęcherzyków płucnych.

Układ surfaktantu płucnego (Rys. 5.2.) tworzy cienką warstwę cieczy, zwana hipofazą oraz zaadsorbowane na jej powierzchni związki powierzchniowocynne pochodzenia głównie lipidowego. Uzupełnienie stanowią zawieszone w hipofazie komórki żerne, tzw. makrofagi płucne odpowiedzialne za ochronę organizmu poprzez wchłanianie i fagocytozę zanieczyszczeń. Dodatkowo, w bliskim sąsiedztwie znajdują się komórki odpowiedzialne za syntezę składników surfaktantu płucnego – pneumocyty typu II. Zgodnie z koncepcją Clementsa^(114,115), warstwa tego płynu o grubości ok. 0,1 µm wyściełająca nabłonek pęcherzyka jest istotnym elementem wspomagającym funkcję płuc mechaniczną podczas oddychania. Zapewnia także cykliczne zmiany napięcia powierzchniowego podczas cyklu oddechowego oraz wg koncepcji Gradonia i Podgórskiego, uczestniczy w oczyszczaniu płuc (dzięki efektowi Marangoniego)^(69,116). Zmiany w strukturze monowarstwy lub w składzie tworzącej ją biosurfaktantów mogą mieć ogromny wpływ na fizjologię całego układu oddechowego. Przewidywanie kierunków ewentualnych zmian w strukturze, co jest możliwe m.in. dzięki badaniom wpływu różnych czynników na warstwę PS^(117,118) oraz rozwojowi modeli PS⁽¹¹⁹⁾ umożliwia także rozwijanie nowych formułacji leków w terapii aerozolowej.



5.4.1. Charakterystyka biochemiczna struktury układu surfaktantu płucnego

W skład surfaktantu płucnego wchodzi przede wszystkim związki lipidowe, które mogą stanowić do 90% suchej masy surfaktantu. Wśród związków tłuszczowych największy udział mają fosfolipidy, z czego ok. 40-60% masowych to amfoteryczne fosfatydylocholiny nasycone oraz nienasycone. Pozostałe fosfolipidy należą do grupy związków anionowych (ok. 20% ogólnej masy fosfolipidów), np. fosfatydyloglicerole lub fosfatydyloetanolaminy. Rola poszczególnych grup związków anionowych jest wciąż badana i uważa się, że mogą one pośredniczyć w tłumieniu stanów zapalnych^(112,120). Grupa związków tłuszczowych jest uzupełniona o lipidy obojętne – przede wszystkim cholesterol. Cholesterol jest jednym ze składników usztywniających monowarstwę oraz pełni funkcje regulacyjne^(120,121). Duża zawartość związków tłuszczowych sprzyja solubilizacji cząstek nierozpuszczalnych w wodzie i ułatwia ich transport poprzez warstwę cieczy⁽¹²²⁾.

Dominującym związkiem należącym do grupy fosfatydocholin jest 1,2- dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina (DPPC), która charakteryzuje się największą aktywnością powierzchniową spośród wszystkich składników surfaktantu płucnego. Cząsteczka DPPC posiada grupę hydrofilową pochodzącą od fosfatydylocholiny („głowa”) oraz dwa węglowodorowe - C₁₆ łańcuchy hydrofobowe pochodzące od nasyconego kwasu tłuszczowego – kwasu palmitynowego („ogon”). Taka amfifilowa budowa cząsteczki bezpośrednio odpowiada za aktywność powierzchniową związku i umożliwia obniżenie napięcia powierzchniowego nawet do 0 mN/m w warunkach silnej kompresji powierzchni ciecz-gaz z zaadsorbowaną DPPC(68). Molekuły DPPC, dzięki swojej amfifilowej budowie, cechują się zdolnością do formowania wysoce stabilnych warstw adsorpcyjnych. Stabilność filmu DPPC opiera się na silnej hydratacji części polarnej oraz wynika z wysokiej temperatury zeszklenia cechującej ten związek (41°C). Grupa fosfocholinowa występuje w postaci podwójnego jonu, a przez to może ulec łatwej hydratacji nawet przez 12-15 cząsteczek wody. Z kolei, wynosząca 36,6°C temperatura panująca w ciele człowieka sprawia, że łańcuchy węglowodorowe DPPC są w takich warunkach usztywnione. Tłumaczy to stabilną konfigurację i wyprostowany kształt łańcuchów węglowodorowych w upakowanym filmie powierzchniowym. Obecność fosfolipidów nienasyconych w układzie (o niższej temperaturze zeszklenia) sprzyja natomiast szybszej adsorpcji molekuł DPPC na powierzchni ciecz-gaz. Dzięki obecności nasyconych łańcuchów węglowodorowych, DPPC jest odporne na utlenianie^(113,123).

Pod względem udziału, drugą grupę składników surfaktantu płucnego stanowią związki peptydowe z grupy apoprotein. Białka te, których zawartość w surfaktancie szacowana jest na

5-10% (suchej masy) można zaklasyfikować do dwóch grup obejmujących hydrofilowe SP-A i SP-D oraz hydrofobowe SP-B i SP-C. Ich wspólną funkcją jest zapewnienie oraz utrzymanie odpowiednio wysokiej aktywności powierzchniowej surfaktantu płucnego. Proteina SP-A jest największym udziałowo składnikiem peptydowym. Pośredniczy ona w przyspieszeniu i zwiększeniu adsorpcji składników lipidowych na powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz. Ponadto, stymuluje przekształcanie ciał lamelarnych w membrany cylindryczne w procesie syntezy i adsorpcji surfaktantu płucnego, co szczegółowo opisano w podrozdziale 5.4.2. Dodatkowo, jest elementem wrodzonej odpowiedzi odpornościowej organizmu, a funkcję tę dzieli z białkiem SP-D, które charakteryzuje się podobną budową do SP-A. Apoproteiny hydrofilowe pełnią kluczową rolę w mechanizmach obronnych obszaru pęcherzykowego, współuczestnicząc w eliminacji drobnoustrojów oraz alergenów^(120,124). Także apoproteiny hydrofobowe są niezbędne do poprawnego funkcjonowania układu oddechowego, a ich niedobór wiąże się z jego ciężkim upośledzeniem. Charakteryzują się one dodatnim ładunkiem i z łatwością wiążą się z anionowymi fosfolipidami. Sprzyja to zachodzeniu złożonych interakcji ułatwiających rozprowadzenie monowarstwy na powierzchni międzyfazowej oraz jej stabilizację mechaniczną. Białko SP-B bierze czynny udział w biogenezie ciał lamelarnych oraz ich transformacji. Dodatkowo, ułatwia agregację, rozpad i fuzję wytworzonych agregatów składników lipidowych, tzw. pęcherzyków surfaktantowych. Pośredniczy także w ich transporcie do granicy faz oraz oddziałuje z błoną lipidową^(120,125). Natomiast SP-C ulega reakcji palmitoilacji polegającej na przyłączeniu reszt cysteinowych białka do łańcuchów kwasów tłuszczowych w obrębie fosfolipidów. Zapewnia to udział SP-C w powierzchni międzyfazowej podczas fazy kompresji przyczyniając się tym samym do możliwości osiągnięcia i utrzymania niskiego napięcia powierzchniowego w pęcherzykach płucnych. Palmitoilacja ułatwia również wymianę lipidów w ich dwuwarstwowych agregatach⁽¹²⁶⁾.

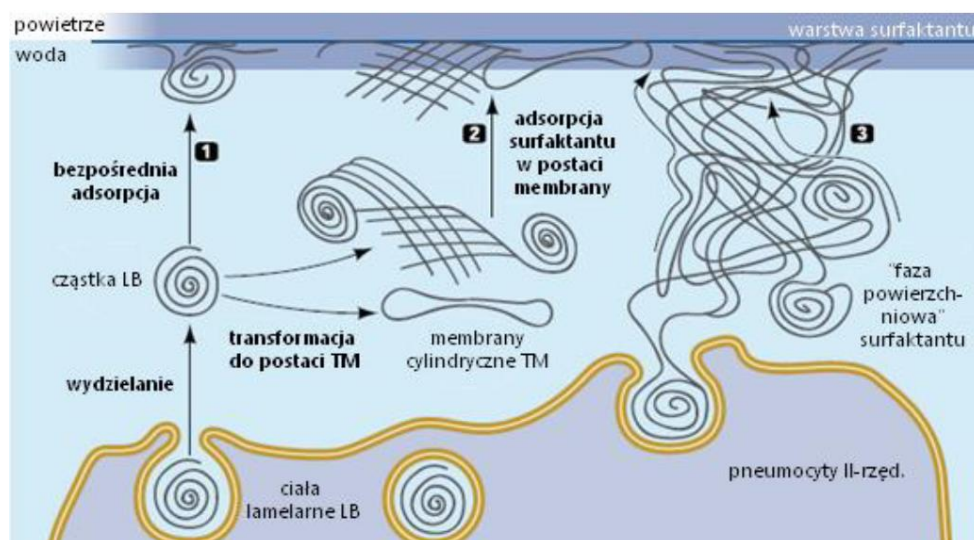
Ostatnią grupę składników surfaktantu płucnego stanowią węglowodany i ich zawartość szacowana jest na ok. 2% suchej masy⁽¹²⁰⁾.

5.4.2. Procesy biofizykochemiczne w obszarze układu surfaktantu płucnego

Synteza i adsorpcja monowarstwy surfaktantu płucnego

Pneumocyty typu II to wyspecjalizowane komórki nabłonkowe budujące rusztowanie pęcherzyka płucnego, odpowiedzialne za syntezę składników surfaktantu płucnego. Wydzielają one najczęściej składniki w postaci upakowanej tzw. ciał lamelarnych - LB (Rys. 5.3.) lub w postaci nieuporządkowanej. Ciała LB przyczyniają się do uporządkowania monowarstwy surfaktantu płucnego poprzez bezpośrednią adsorpcję oraz wytworzenie na powierzchni międzyfazowej ciecz-powietrze nowej warstwy surfaktantu (Rys. 5.3. – proces 1). Mogą one

ulec również transformacji do postaci membran cylindrycznych - TM (Rys. 5.3.). TM stanowią uporządkowaną formę, która tworzy krzyżujące się struktury. W takiej postaci następuje adsorpcja na powierzchnię międzyfazową ciecz-powietrze (Rys. 5.3. – proces 2). Składniki surfaktantu, które nie przybrały formy LB, tworzą bezpośrednie połączenie poprzez tzw. fazę powierzchniową pomiędzy komórką pneumocytu i granicą faz (Rys. 5.3. – proces 3)⁽¹²⁷⁾.



Rys. 5.3. Mechanizmy biosyntezy surfaktantu płucnego⁽¹²⁷⁾

Szybka adsorpcja międzyfazowa

Jednym z kluczowych elementów wpływających na wydajność procesu oddychania jest szybka adsorpcja i desorpcja składników surfaktantu płucnego na powierzchni międzyfazowej podczas cyklu oddechowego. Proces tworzenia się nowej warstwy surfaktantu płucnego (adsorpcji) może trwać do kilku sekund, co pokazały badania prowadzone nad mechaniką oddechową u zdrowych noworodków⁽¹²⁸⁾. Dużą rolę odgrywają tutaj białka SP-B i SP-C, które pośredniczą w zwiększeniu adsorpcji form LB i TM lipidów na powierzchni ciecz-gaz. Skład LB i TM również wpływa na przebieg procesu, gdyż obecność lipidów anionowych oraz nienasyconych jest niezbędna do przeprowadzenia wydajnej i szybkiej adsorpcji^(120,129,130).

Analizując sposób, w jaki fosfolipidy wchodzące w skład surfaktantu adsorbują na powierzchni należy wziąć pod uwagę ich właściwości. Fosfolipidy charakteryzują się niskimi wartościami krytycznego stężenia micelizacji (rzędu 10^{-10} - 10^{-9} mol/dm³), przy czym stężenie molekuł w układzie, ze względu na specyfikę funkcji surfaktantu płucnego i dynamikę procesów m.in. szybkiej adsorpcji, jest znacznie przekroczone⁽¹³¹⁾. W konsekwencji adsorpcja lipidów na granicy faz przebiega w dwuetapowym procesie z udziałem dwuwarstwowych agregatów tych molekuł. W pierwszej fazie, dużą rolę odgrywa dyfuzja, która umożliwia zbliżenie się struktury do granicy międzyfazowej. Etap ten zależy od stężenia agregatów. Proces ich adsorpcji charakteryzuje się małą szybkością (niskie współczynniki dyfuzji).

W drugiej fazie następuje rozplątanie oraz wprowadzenie materiału lipidowego na powierzchnię międzyfazową. Aby rozplątać dwuwarstwowe agregaty należy pokonać znaczne siły kohezji wynikające z oddziaływań elektrostatycznych (sił van der Waalsa) oraz efektów hydrofobowych, które są prekursorem samoorganizacji błon w środowisku wodnym^(130,132). Etap ten jest znacząco przyspieszany przez białka SP-A oraz jony wapnia, gdyż za ich pośrednictwem odbywa się łączenie agregatów^(133–135). Obecność nienasyconych fosfolipidów przyspiesza zajście procesu. Wykazano, również dużą rolę hydrofobowych białek SP-B i SP-C charakteryzujących się działaniem powierzchniowoczynnym w adsorpcji dwuwarstwowych agregatów w drugim etapie procesu. Klenz i wsp.⁽¹³⁶⁾ zaproponowali koncepcję przebiegu drugiej fazy adsorpcji fosfolipidów na powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz, w której oba typy hydrofobowych białek pełnią odrębne role. Białko SP-B pośredniczy w transporcie poprzez lokalne naruszenie upakowanej monowarstwy – jest to początkowy moment „wstawienia” nowej porcji materiału. Natomiast SP-C ułatwia adsorpcję przy wyższych stężeniach powierzchniowych. Wykazano również synergiczne działanie obu typów białek w odzyskiwaniu optymalnej aktywności powierzchniowej ekstraktów lipidowych surfaktantu płucnego zubożonych o białka⁽¹³⁷⁾.

Adsorpcja składników surfaktantu i formowanie monowarstwy umożliwia redukcję równowagowego napięcia powierzchniowego z 70,1 mN/m do nawet 20 mN/m (wartości w 36,6°C). Kompresja monowarstwy pozwala na uzyskanie stanu metastabilnego o wysokim stopniu uporządkowania i jeszcze niższych wartości σ ⁽⁶⁸⁾.

Reorganizacja uformowanej monowarstwy surfaktantu płucnego

Struktura surfaktantu płucnego stanowi dynamicznie zmieniający się układ w wyniku ciągłej zmiany powierzchni na skutek cyklu wdech-wydech, a także przepływów powierzchniowych (efekty Marangoniego). W fazie wdechu dochodzi do ekspansji powierzchni pęcherzyka płucnego, tj. wzrostu powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz, co pociąga za sobą wzrost zapotrzebowania na szybki transport składników surfaktantu płucnego do granicy faz. W celu kompensacji deficytu napięcia powierzchniowego następuje adsorpcja świeżo wytworzonej porcji związków powierzchniowoczynnych, jak i molekuł, które zostały usunięte z powierzchni międzyfazowej w fazie wydechu, gdy następuje kompresja powierzchni. W jej wyniku część molekuł wykazujących się mniejszą stabilnością zostaje usuniętych do wnętrza hipofazy, tzw. proces *squeeze-out*⁽¹³⁸⁾. Tak jak opisano w podrozdziale 5.4.1, na powierzchni hipofazy obecne są, obok fosfolipidów, także lipidy nienasycone, wykazujące znacznie mniejszą aktywność powierzchniową niż DPPC. Odpowiadają one głównie za stabilność i usztywnienie struktury monowarstwy, co jest potrzebne w fazie

ekspansji powierzchni. Prawdopodobnie, właśnie takie molekuly są usuwane z powierzchni podczas wydechu, lecz do tej pory nie istnieje usystematyzowana wiedza opisująca interakcje tych składników. W szczytowej fazie wdechu napięcie powierzchniowe osiąga maksymalną wartość sprawiając, że udział sił powiązanych z napięciem powierzchniowym jest dominujący w kształtowaniu całkowitej elastyczności płuc (siły retrakcji)⁽¹¹³⁾. Osiągnięcie pożądanych niskich wartości dynamicznego napięcia powierzchniowego jest niezbędne do poprawnego funkcjonowania układu oddechowego: tj. obniżenia pracy potrzebnej do wykonania wdechu, płynnego przejścia z fazy wydechu do ekspansji powierzchni, a także obniżenia ryzyka sklejenia się ścianek pęcherzyków płucnych na szczycie wydechu. Materiał, który w fazie wdechu nie zostanie ponownie zaadsorbowany na powierzchni międzyfazowej ulega reorganizacji do formy kulistych jednowarstwowych struktur. Ze względu na fakt, że tracą one stabilność powierzchniową możliwe jest ich łatwe usunięcie wskutek działania makrofagów lub w wyniku transportu hydrodynamicznego (w procesie samooczyszczania płuc). Porcje molekuł, które nie uległy usunięciu są zawracane, na drodze endocytozy, do pneumocytów typu II, gdzie służą jako materiał budulcowy do syntezy ciał lamelarnych⁽¹²¹⁾.

5.4.3. Podstawy opisu właściwości fizykochemicznych układu surfaktantu płucnego w obszarze międzyfazowym ciecz-gaz

Charakterystykę zjawisk przebiegających w obszarze kontaktu dwóch faz: cieczy i powietrza należy rozpocząć od rozpoznania sensu fizycznego napięcia powierzchniowego (σ). W ujęciu termodynamicznym stanowi ono miarę pracy izotermicznej odwracalnej ekspansji powierzchni. Jednakże w momencie, w którym podczas zwiększania powierzchni następuje dyssypacja energii, a utrzymanie warunków izotermicznego i odwracalnego procesu nie jest dłużej możliwe, przedstawiona interpretacja traci sens⁽¹³⁹⁾. Takie zjawisko ma miejsce w układzie surfaktantu płucnego i w takim przypadku należy rozważyć napięcie powierzchniowe, zgodnie z interpretacją mechaniczną, jako siły działającej stycznie do powierzchni na odcinku o jednostkowej długości⁽¹⁴⁰⁾.

Opisując zjawisko adsorpcji związków powierzchniowoczynnych, gdy szybkość procesu jest znacząca, można oprzeć rozważania o koncepcję układu dwóch kontaktujących się faz, między którymi występuje obszar o niewielkiej grubości, tzw. faza powierzchniowa. Adsorpcja surfaktantów (składniki i charakteryzujące się molowym potencjałem chemicznym μ_i) umożliwia formowanie w fazie powierzchniowej warstewki adsorpcyjnej, która, wg definicji, powstała w samorzutnie przebiegającym procesie gromadzenia się molekuł aktywnych powierzchniowo. Występują one na powierzchni w nadmiarze w stosunku do ilości w głębi fazy ciekłej, osiągając pewne stężenie powierzchniowe Γ_i ^(113,140). Proces adsorpcji trwa do

osiągnięcia stanu równowagi termodynamicznej i towarzyszy mu zmiana napięcia powierzchniowego. Opis przebiegu zmian $d\sigma$ ujmujemy równanie adsorpcji Gibbsa:

$$d\sigma = -\sum_i \Gamma_i d\mu_i \quad (5.3)$$

Równanie 5.3, przy założeniu idealności roztworu pojedynczego niejonowego składnika, którego stężenie w fazie objętościowej wynosi c , przyjmuje postać:

$$d\sigma = -RT\Gamma d\ln c \quad (5.4)$$

gdzie R to stała gazowa ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) a T oznacza temperaturę (K). Z równania 5.4. wynika, że substancja, która gromadzi się na powierzchni wywołuje obniżenie napięcia powierzchniowego. Efekt ten jest tłumaczony częściowym równoważeniem asymetrycznych oddziaływań międzycząsteczkowych przy granicy faz ciecz-gaz. Do opisu równowagowej zależności między Γ a c ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$) z uwzględnieniem wzajemnych oddziaływań międzycząsteczkowych można stosować równanie izotermy adsorpcji np. Frumkina lub van der Waalsa. Z kolei, najprostsze równanie izotermy adsorpcji Langmuira (równanie 5.5.), stosowane do powierzchniowych warstw monomolekularnych (monowarstw) powstałych w wyniku spontanicznej adsorpcji związku powierzchniowoczynnego z roztworu nie uwzględnia wzajemnych oddziaływań molekuł^(113,140). W zależności tej uwzględniono maksymalne stężenie powierzchniowe składnika Γ_m oraz stałą równowagi adsorpcji K .

$$\frac{\Gamma}{\Gamma_m} = \frac{Kc}{1+Kc} \quad (5.5)$$

Koncepcja struktury monowarstwy Langmuira

Zaadsorbowane na powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz składniki surfaktantu płucnego formują monowarstwę o określonych właściwościach. Na potrzebę rozważań oraz badań modelowych i eksperymentalnych można przybliżyć ją do dobrze opisanej w literaturze monowarstwy Langmuira. Doświadczalne zależności ciśnienia powierzchniowego (równanie 5.6) od wielkości powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę związku obecnego w monowarstwie są dogodną metodą analizy właściwości monowarstwy Langmuira⁽¹⁴¹⁾. Za pomocą izotermy kompresji można śledzić zmianę organizacji powierzchni wraz ze zmieniającym się ciśnieniem powierzchniowym. W miarę zwiększania kompresji monowarstwy cząsteczki związku powierzchniowo czynnego zbliżają się do siebie, przez co całość filmu zmienia stan fizyczny. Wyróżniamy: stan gazowy (G), stan cieczy rozprężonej (LE), stan przejściowy (I), stan cieczy skondensowanej (LC) i stan stały (S). Monitorowanie zmian organizacji cząsteczek fosfolipidu w monowarstwie pozwala m.in. na określenie wpływu obecności dodatkowych substancji np. toksycznych^(118,142,143) oraz leków lub potencjalnych składników formulacji leczniczej na właściwości PS w warunkach *in vitro*^(144–146).

Podczas izotermicznej i *quasi*-równowagowej kompresji monowarstwy, przejścia fazowe zaczynają się od sprężania fazy gazowej. W tym stanie fizycznym, przy niskim ciśnieniu powierzchniowym, występują słabe oddziaływania pomiędzy rozproszonymi na powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz molekułami związków powierzchniowoczynnych ze względu na duże odległości pomiędzy molekułami. Przy dużej powierzchni przypadającej na molekułę związku na powierzchni, cząsteczki charakteryzują się dużą ruchliwością a ich ruch jest spontaniczny (chaotyczny). W miarę sprężania monowarstwy, dochodzi do zbliżania się cząsteczek i ich uporządkowania oraz wzrostu interakcji międzycząsteczkowych m.in. oddziaływań van der Waalsa. Następuje wtedy przejście ze stanu gazowego do stanu cieczy rozprężonej. Kolejno występującym przejściom fazowym towarzyszy również zmiana orientacji molekuł, a wraz ze wzrostem stopnia kompresji, cząsteczki ustawiają się w pozycji pionowej. Stan przejściowy jest to faza, w której dochodzi do współlistnienia obu stanów LE i LC. Przejawia się ona charakterystycznym wypłaszczeniem izotermy tzw. *plateau*. W stanie cieczy sprężonej (skondensowanej) mamy do czynienia z monowarstwą, w której cząsteczki są ułożone ściśle obok siebie. Przy dalszym sprężaniu monowarstwy osiągany jest stan stały, a następnie dochodzi do zjawiska załamania monowarstwy, z ang. *collapse*⁽⁶⁸⁾. Załamanie monowarstwy jest procesem, który polega na „zwijaniu się” części warstwy w wyniku sprężania, przez co dochodzi do powstania lokalnych dwuwarstwowych lub wielowarstwowych zgrupowań, mogących posłużyć za rezerwuary molekuł⁽¹⁴⁷⁾.

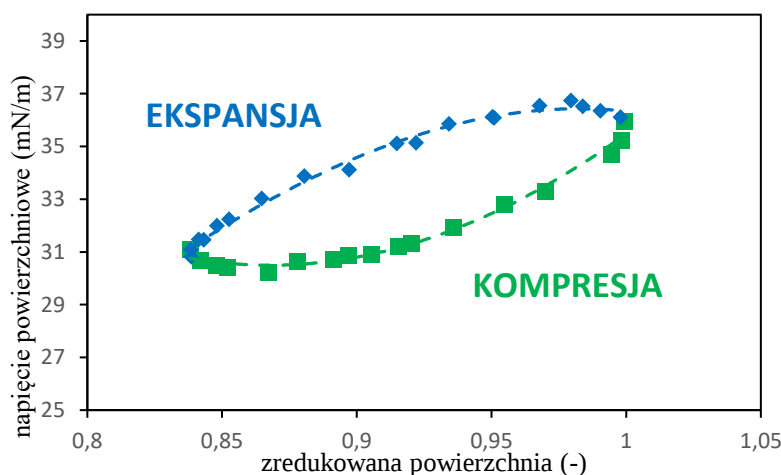
Dynamiczne właściwości warstwy powierzchniowej

Ze względu na zmienność warunków panujących w układzie surfaktantu płucnego podczas cyklicznej kompresji i ekspansji, istotnym parametrem opisującym dynamiczne właściwości tego płynu biologicznego jest dynamiczne napięcie powierzchniowe. W takim przypadku rozszerzenie interpretacji napięcia powierzchniowego o warunki dynamiczne jest konieczne, chociażby ze względu na fakt, że molekuły surfaktantu docierają na powierzchnię zbyt wolno w stosunku do tempa deformacji powierzchni. Obok dynamicznego napięcia powierzchniowego wyróżnia się również powiązane z nim ciśnienie powierzchniowe (wielkość dwuwymiarowa). Chwilowe ciśnienie powierzchniowe π rozpatrywane w dwuwymiarowej przestrzeni można definiować jako różnicę między chwilowym dynamicznym napięciem powierzchniowym σ a napięciem powierzchniowym subfazy (rozpuszczalnika) σ_{sub} :

$$\pi_i = \sigma_{sub} - \sigma \quad (5.6.)$$

Pomiaru równowagowego napięcia powierzchniowego można dokonać w warunkach oscylującej powierzchni lub przy stałej powierzchni⁽⁶⁸⁾. Obie metody badawcze przedstawiono w podrozdziale 5.4.5.

Podczas monitorowania zmian dynamicznego napięcia powierzchniowego powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz w obecności fosfolipidów, wywołanych oscylacjami tej powierzchni, można zaobserwować histerezę napięcia powierzchniowego (Rys. 5.4). Istnienie pętli histerezy można wytłumaczyć m.in. faktem wymiany masy między powierzchnią a objętością cieczy, będącą rezerwuarem molekuł substancji powierzchniowo czynnej. Podczas kompresji powierzchni ciecz-gaz stężenie powierzchniowe wzrasta powyżej równowagowego, powodując desorpcję cząsteczek surfaktantu i ich transport do fazy objętościowej. Przy ekspansji sytuacja jest odwrotna i deficyt surfaktantu na powierzchni jest siłą napędową procesu adsorpcji z fazy objętościowej. Ze względu na fakt, że procesy te będą z skończoną szybkością, występuje histereza napięcia powierzchniowego (wymiana masy i adsorpcja nie nadążają za zmianami wielkości powierzchni). Pętla histerezy to połączenie izotermy kompresji i izotermy ekspansji w obszarze wyższych ciśnień powierzchniowych⁽¹⁴⁸⁾. Zjawisko histerezy można powiązać z również z lepkosprężystymi właściwościami układów zawierających warstewki powierzchniowe⁽¹³⁹⁾. Dylatacyjne lepkosprężyste właściwości reologiczne powierzchni zależą m.in. od przestrzennej struktury związków obecnych na powierzchni. Wpływ na usieciowanie, uporządkowanie, orientacje łańcuchów czy wzajemne interakcje ma szereg czynników, w tym temperatura, siła jonowa subfazy lub wielkość i szybkość odkształceń. Obecność lub brak jonów w hipofazie zmienia ładunek powierzchniowy składników warstewki powierzchniowej. W warstwach DPPC kationy sodowe, pochodzące od zdysocjowanej soli NaCl, tworzą wiązanie z grupami karbonyłowymi lipidów, zastępując uporządkowane cząsteczki wody, a aniony chlorkowe tworzą tzw. chmurę jonową wokół grup cholinowych tego lipidu⁽¹⁴⁹⁾. Szersze omówienie parametrów używanych do charakterystyki surfaktantu płucnego zaprezentowano w podrozdziale 5.4.5.



Rys. 5.4. Przykładowa pętla histerezy napięcia powierzchniowego modelowego surfaktantu płucnego w temperaturze 36,6°C. Na podstawie badań własnych

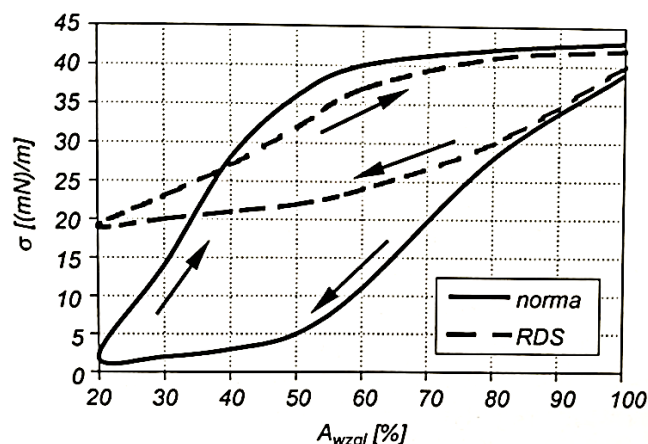
5.4.4. *Właściwości surfaktantu płucnego jako wskaźnika fizjologicznego stanu płuc*

Histeresa napięcia powierzchniowego jako wskaźnik fizjologiczny jakości

Dynamiczne napięcie powierzchniowe może stanowić wskaźnik cech fizjologicznych, świadczący o poprawnej mechanice oddychania. Pomiar histerezy napięcia powierzchniowego, której podstawowe zagadnienia omówiono w podrozdziale 5.4.3, jest jedną z możliwości przeprowadzenia takiej oceny. Wykorzystywany jest przy tym fakt, że histeresa jest wynikiem efektów relaksacyjnych w układzie PS, które są konsekwencją zarówno oddziaływań międzycząsteczkowych różnych składników błony, jej reorganizacji na poziomie molekularnym, jak i z międzyfazowych procesów przenoszenia masy o skończonej szybkości. Zjawisko histerezy jest wynikiem zmian poddanej periodycznym oscylacjom (odkształceniom) powierzchni pęcherzyków płucnych, która następuje w wyniku cyklu oddechowego. Istotne znaczenie mają stosunkowo szybkie (15-30 razy na minutę) oscylacje powierzchni międzyfazowej, a także duża, dochodząca nawet do 40% ekspansja powierzchni⁽¹¹³⁾. Występowanie histerezy napięcia powierzchniowego można tłumaczyć występowaniem procesów dyssypacyjnych oraz częściowego przekształcenia dostarczonej podczas wdechu energii na przepływy powierzchniowe, tj. efekty Marangoniego, które umożliwiają zajście hydrodynamicznych procesów oczyszczania płuc. Jej kształt, z kolei, wynika z udziału właściwości lepkosprężystych (lepkości oraz elastyczności powierzchniowej). Ilościowe wartości parametrów reologicznych powierzchni poddawanej oscylacjom są odzwierciedleniem wielu zjawisk o charakterze dynamicznym, dlatego należy traktować je jako wartości efektywne (lub: pozorne)⁽¹³⁹⁾.

Powierzchnia ograniczona pętlą histerezy zależy od częstotliwości oddechowej oraz od indywidualnych cech pacjenta m.in. wieku czy aktualnego stanu zdrowia. Przykładowo, pole powierzchni pętli histerezy zdrowego człowieka będzie się różnić w porównaniu do pacjenta z chorobą lub niewydolnością układu oddechowego powiązaną z niedoborem surfaktantu płucnego, takich jak zespół błon szklistych, zespół ostrej niewydolności oddechowej oraz zespół zaburzeń oddechowych u noworodka⁽¹⁵⁰⁾. Surfactant pozyskany od pacjentów ze zdiagnozowanymi stanami chorobowymi powiązanymi z dysfunkcją PS cechuje się wyższą minimalną wartością napięcia powierzchniowego oraz zawężoną pętlą histerezy o pomniejszonym polu (Rys. 5.5.)⁽¹¹³⁾. Do zmniejszenia pola histerezy napięcia powierzchniowego może również dojść na skutek wdychania aerozoli lub gazów. Do takich zaliczamy te pochodzenia antropogenicznego (np. smog, dym papierosowy) lub naturalnego (np. pył pustylny, pył wulkaniczny), które podczas oddychania mogą penetrować do obszaru

pęcherzyków płucnych⁽¹⁵¹⁾. Innym czynnikiem będącym przyczyną uszkodzenia PS jest wdychanie powietrza o bardzo wysokiej temperaturze⁽¹⁵²⁾.



Rys. 5.5. Porównanie pętli histerezy napięcia powierzchniowego zmierzonej w przypadku zdrowego człowieka (norma) i pacjenta, u którego zdiagnozowano zespół niewydolności oddechowej (RDS)⁽¹¹³⁾

Inżynieria chemiczna a surfaktant płucny – rola surfaktantu płucnego w procesach transportu masy i mechanice oddychania

Zaburzenia w dynamicznej aktywności PS będą powiązane również z osłabieniem lub w skrajnych przypadkach z trwałym upośledzeniem jego funkcji transportowej oraz obronnej w płucach. Surfaktant płucny pośredniczy w przenoszeniu słabo rozpuszczalnych w fazie wodnej gazów przez warstwę płynu płucnego. Zintensyfikowane procesy hydrodynamiczne w hipofazie surfaktantu płucnego poprawiają szybkość absorpcji tlenu. Aktywność powierzchniowa składników PS oraz dynamiczne warunki panujące na granicy faz indukują okresowe gradienty napięcia powierzchniowego, co istotnie wspomaga proces oddychania^(72,153,154). Surfaktant płucny reguluje również wydatek energetyczny powiązany z procesem wymiany gazowej (wymiany masy) poprzez generowanie spadku napięcia powierzchniowego podczas fazy biernej cyklu oddechowego (wydech)⁽¹¹³⁾. PS zapewnia stabilność pęcherzyków płucnych i prawidłowe równomierne napowietrzenie płuc. Uzyskane niskie wartości napięcia powierzchniowego zapobiegają także przesiąkaniu płynów ustrojowych (śródtkankowych), w tym osocza, do wnętrza dróg oddechowych. Jest to tzw. rola antyobrzękowa PS. Przy deficycie lub uszkodzeniu PS uzyskanie niskich wartości napięcia powierzchniowego jest niemożliwe, co prowadzi do przesiąkania płynów ustrojowych w przestrzeni płucnej, blokowania wymiany gazowej, a także rozwoju stanu zapalnego⁽¹⁵⁵⁾.

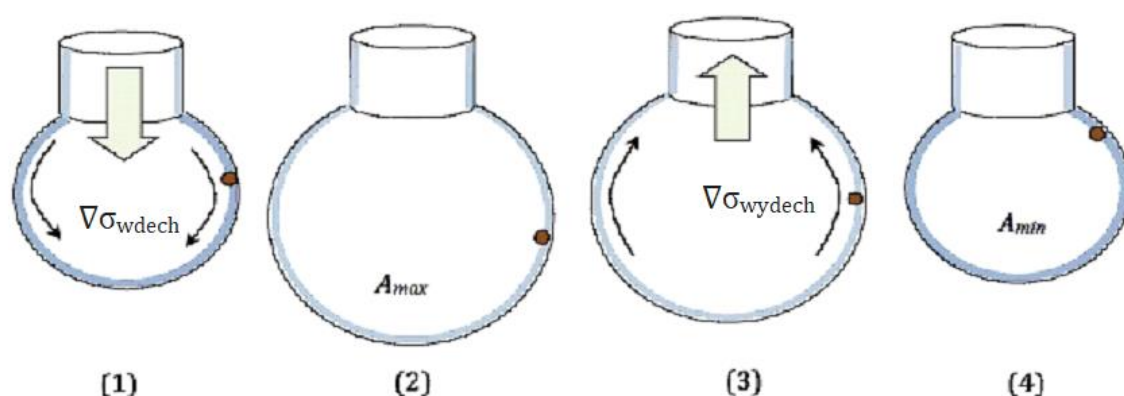
Ostatnia z ważnych funkcji pełnionych przez surfaktant płucny jest związana z funkcjonowaniem naturalnych mechanizmów obronnych organizmu w obrębie dróg oddechowych. PS bierze m.in. udział w pierwotnej odpowiedzi organizmu na zdeponowane na jego powierzchni cząstki, co zostało pokrótce omówione w podrozdziale 5.4.1 i 5.4.2, ale także

pełni istotną rolę w powstaniu przepływu z obszaru pęcherzyków płucnych w kierunku oskrzelików na skutek działania efektów Marangoniego. Mechanizmy neutralizacji zdeponowanych cząstek, w tym fagocytozę próbowano wyjaśnić w oparciu o narzędzia inżynierii chemicznej. Koncepcja ta zakłada, że cząstka aerozolu, która uległa depozycji na granicy faz pociąga za sobą adsorpcję składników PS na powierzchni cząstki. Lokalny spadek stężenia surfaktantu prowadzi do wzrostu napięcia powierzchniowego, generując sygnał o charakterze hydrodynamicznym (efekt Marangoniego). Zjawiska te stymulują poruszanie się makrofagów w kierunku zdeponowanej struktury po powierzchni filmu, poprzez występowanie mikroprzepływów (o szybkości kilkudziesięciu $\mu\text{m/s}$)^(156–158). Sugeruje to znaczną rolę surfaktantu płucnego w przekazywaniu informacji o depozycji obcych obiektów na powierzchni płuc. Opisany mechanizm jest jedynie impulsem aktywującym makrofagi, natomiast w dłuższym okresie ich reakcja jest regulowana przez gradient chemoatraktantu (sygnał chemiczny)⁽¹⁵⁸⁾. Zdeponowana cząstka może wywołać również lokalne uszkodzenie (zaburzenie) ciągłości układu surfaktantu płucnego, co pociąga za sobą przepływ sąsiadujących obszarów PS w kierunku zdeformowanej powierzchni. Jeżeli liczba depozytów będzie zbyt duża może się to przełożyć na zaburzenie fizjologicznych funkcji surfaktantu. Skuteczność zjawiska kierunkowania makrofagów zostanie obniżona, a skład powierzchni cieczy może zostać zaburzony, w wyniku nadmiernego ubytku składników PS z powierzchni ciecz-gaz w wyniku adsorpcji na powierzchni zdeponowanych cząstek⁽¹⁵⁷⁾. Dużą rolę w adsorpcji składników PS na powierzchni osadzonych ciał obcych odgrywa charakter materiału (hydrofilowość/hydrofobowość) oraz struktura cząstek, w tym ich porowatość. Wzrost ubytku surfaktantu jest większy w przypadku struktur porowatych niż dla powierzchni gładkich powodując równocześnie bardziej istotny wzrost napięcia powierzchniowego. Niedobór surfaktantu doprowadzi do spowolnienia mikroprzepływów oraz osłabienia sygnału hydrodynamicznego przyczyniając się tym samym do spowolnienia procesów *klirensu pęcherzykowego*. PS będzie preferencyjnie adsorbować na powierzchniach hydrofobowych i to w przypadku tego typu materiałów efekt opisanego oddziaływania będzie większy⁽¹⁵⁹⁾.

Wpływ efektów Marangoniego tj. przepływu cienkiej warstwy cieczy wywołanego przez opisane wyżej zjawiska powstania gradientu napięcia powierzchniowego na transport masy w płucach został przedstawiony w modelu Gradonia-Podgórskiego^(69,160). Koncepcja zakłada, że niesymetryczne w czasie (rzeczywiste) oscylacje powierzchni ciecz-gaz płynu biologicznego w pęcherzykach płucnych indukują przepływy Marangoniego, co umożliwia przemieszczanie zdeponowanych obiektów do oskrzelików i w górę drzewa oskrzelowego. Efekty te postulują mechanizm hydrodynamicznego samooczyszczania płuc, w którym w dalszym etapie bierze

udział również system śluzowo-rzęskowy. Wizualizację przepływu płynu biologicznego w obszarze pęcherzykowym przedstawiono na poniższym rysunku (Rys. 5.6.). W trakcie fazy aktywnej cyklu oddechowego (tj. wdechu) (Rys. 5.6. - 1) następuje wzrost powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz i napięcia powierzchniowego, aż do osiągnięcia maksymalnej wartości powierzchni (Rys. 5.6. - 2). W czasie wdechu zdeponowana cząstka przesuwa się, dzięki efektowi Marangoniego ($\nabla\sigma_{wdech}$) ku dnu pęcherzyka. Gdy rozpoczyna się faza wydechu, GLI zaczyna się kurczyć, napięcie powierzchniowe powoli się obniża, a zdeponowany obiekt zaczyna się przesuwać w kierunku oskrzelików (Rys. 5.6. - 3). W wyniku kilku cykli oddechowych, w momencie osiągnięcia minimalnej powierzchni może dojść do wypchnięcia ciała obcego poza obszar pęcherzyka (Rys. 5.6. - 3)⁽⁷²⁾.

Podsumowując, na podstawie przedstawionych wielu funkcji układu surfaktantu płucnego o charakterze ochronnym, regulacyjnym i transportowym, uzależnionych od właściwości powierzchniowo czynnych jego składników, oraz wykazaniu jego roli w prawidłowym procesie oddechowym można uzasadnić tezę, że wielkość pętli histerezy napięcia powierzchni jest wyznacznikiem jakości fizjologicznej płuc.



Rys. 5.6. Schemat przepływu płynu biologicznego w pęcherzyku płucnym podczas pełnego cyklu oddechowego z uwzględnieniem gradientu napięcia powierzchniowego⁽⁷²⁾

5.4.5. Parametry oceny oddziaływań zdeponowanego aerozolu na powierzchnię płucną

Istnieje kilka możliwości oceny wpływu aerozolu na surfaktant płucny, posługując się wiedzą o roli histerezy w interpretacji stanu fizjologicznego płuc. Koncepcje te są oparte na ocenie zmian dynamicznej aktywności surfaktantu płucnego, uwzględniając opisane wcześniej modele dynamiki obniżania napięcia powierzchniowego (zagadnienia omówione w podrozdziale 5.4.3-5.4.4). Spośród wielu technik opracowanych w celu przeprowadzenia badań *in vitro* oddziaływań z PS istnieje pięć najpopularniejszych bazujących na dynamicznych pomiarach zjawisk na powierzchniach międzyfazowych ciecz-gaz: (1) metoda wagi Langmuira-Wilhelmy'ego (LWB) lub inne warianty tej metody np. waga Langmuira-Blodgett

(LBB), (2) tensjometr z pulsującym pęcherzykiem (PBS), (3) metoda uwiecznionego pęcherzyka (CBS), (4) ograniczonej kropli (CSD) i (5) wiszącej kropli (PD). Nierzadko te techniki są wspomagane przez metody mikroskopowe do analizy stanu powierzchni: mikroskopia kąta Brewstera (BAM) oraz mikroskopia sił atomowych (AFM) oraz przez symulacje komputerowe oparte o dynamikę molekularną. Jednakże, na potrzebę tej pracy ograniczono się do wskazania dwóch podejść: **(i)** analiza powierzchni międzyfazowej ciec-z-gaz w obecności modelu surfaktantu płucnego tylko podczas jej stałej kompresji w układzie LWB oraz **(ii)** analiza powierzchni międzyfazowej w obecności modelu PS poddanej sinusoidalnym oscylacjom (cykl kompresji-ekspansji) powierzchni w układzie PD^(121,161–163).

Obie koncepcje doświadczalne wymagają wprowadzenia funkcjonalnego modelu układu surfaktantu płucnego (MPS). PS jak wykazano w podrozdziale 5.4.1, w warunkach naturalnych tworzy monowarstwę lipidową (ok. 90%) wzbogaconą o białka (ok. 10%) i węglowodany⁽¹²⁰⁾. Składniki tego płynu biologicznego charakteryzują się zróżnicowaną aktywnością powierzchniową, jednak niektóre wykazują najistotniejsze właściwości powierzchniowo czynne np. fosfolipid DPPC oraz białka SP-B i SP-C. W literaturze znajdziemy wiele przykładów zastosowanych modeli, wśród których możemy wyróżnić następujące grupy: (a) jednoskładnikowe, (b) wieloskładnikowe lipidowe, (c) wieloskładnikowe mieszaniny zawierające białka surfaktantowe (bazujące na preparatach kalfaktantowych lub beraktantowych). Przykładowe modele PS zamieszczono w tabeli 5.2.

Najbardziej rozpowszechnionym modelem jest jednoskładnikowy układ zawierający DPPC. Ten prosty model sprawdza się w badaniach z wykorzystaniem techniki wagi Langmuira-Wilhelmy'ego, która umożliwia analizę zmian właściwości modelowego surfaktantu płucnego w oparciu o śledzenie izotermi kompresji. Dodanie białek hydrofobowych do takiego układu znacząco zmienia przebieg izotermi. Przy tych samych ciśnieniach powierzchniowych obserwuje się większe powierzchnie przypadające na molekułę DPPC. Jednocześnie, obserwowane jest charakterystyczne *plateau* przy ciśnieniu powierzchniowym ok. 50 mN/m, co pokrywa się z danymi otrzymywanymi w pomiarach natywnego PS, gdzie faza przejściowa występuje przy wartościach 40-50 mN/m⁽¹⁶⁴⁾. Innym podejściem jest rozszerzenie jednoskładnikowego modelu o składniki frakcji tłuszczowej np. model Tanaki⁽¹⁶⁵⁾. Błony wzbogacone o cząsteczki cholesterolu charakteryzują się dużo większym upakowaniem molekuł oraz usztywnieniem⁽¹⁴²⁾. Jednocześnie należy zwrócić uwagę, że lipidy nienasycone wykazują znacznie mniejszą aktywność powierzchniową niż DPPC⁽⁶⁸⁾. Filmy zawierające różnorodne składniki lipidowe charakteryzują się występowaniem równowagi pomiędzy stanami LE-LC oraz załamaniem monowarstwy przy wąskim zakresie

ciśnień, ok. 46 mN/m(164). Dla porównania, monowarstwy natywnego PS przy ciśnieniach wyższych niż 46 mN/m nie ulegają załamaniu, co dowodzi ich metastabilnego charakteru⁽¹⁶⁶⁾.

Tab. 5.2. Przykładowe modele układu surfaktantu płucnego z uwzględnieniem wybranych stosowanych metod badawczych

Rodzaj modelu	Składniki	Przykładowa metoda badawcza	Referencje
Jednoskładnikowy	1,2-dipalmitoilo-sn-glicerolo-3-fosfocholina (DPPC)	LBW	(68,118,123,142,167,168)
	1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicerolo-3-fosfo-etanolamina (POPE)		
Dwuskładnikowe lipidowe	DPPC:cholesterol (CHOL), 8:2, 7:3, 6:4 (w/w)	LWB, LBB, AFM	(169–173)
	DPPC:1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicerolo-3-fosfoglicerol (POPG), 7:3 (w/w)		
	DPPC:1,2-dioleoilo-sn-glicerolo-3-fosfocholina (DOPC) 63:37 (w/w)		
Wieloskładnikowe lipidowe	Model Tanaka: DPPC:POPG: kwas palmitynowy (PA), 68:22:9 (w/w)	LWB	(119,165,171,174)
	saponiny z kory mydłodziwna		
Wieloskładnikowe mieszaniny zawierające białka surfaktantowe	Alveofact® (Lyomark Pharma, Niemcy)	LWB, PBS, PD, AFM	(118,169,173,175–177)
	Curosurf® (Chiesi, Włochy)		
	Survanta® (AbbVie, USA)		
	Infasurf® (ONY Biotech, USA)		

Podsumowując, modele zawierające tylko część składników bazowych nie mogą w pełni odzwierciedlać właściwości PS i interakcji z substancjami obcymi, a więc uogólnianie wniosków uzyskanych przy ich pomocy jest obciążone niepewnością. Jednakże, praca z takimi modelami pozwala na łatwe wykrycie i identyfikację ewentualnych interakcji pomiędzy grupą składników PS o wybranych właściwościach (np. lipidów obojętnych lub zawierających dodatkową grupę funkcyjną) a substancją zaadsorbowaną. Takie podejście umożliwia lepsze przewidzenie i zrozumienie mechanizmu oddziaływań w modelach wieloskładnikowych.

Analiza powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz w obecności PS podczas jej kompresji w wadze Langmuira-Wilhelmy’ego

W wyniku kompresji powierzchni międzyfazowej zawierającej model lipidowy PS prowadzonej ze stałą szybkością przesuwania barierki (ruch symetryczny) wyznacza się zależność ciśnienia powierzchniowego π w funkcji powierzchni przypadającej na jedną zaadsorbowaną cząsteczkę A (izoterma kompresji π -A). Metodę tą stosowano w niniejszej pracy, a jej szczegółowy opis przedstawiono w podrozdziale 9.3.2.

Badając zmiany ciśnienia powierzchniowego zauważono, że są one związane ze zmianą stanu fizycznego (termodynamicznego) monowarstwy, który dodatkowo pociąga za sobą

zmiany w zakresie jej właściwości reologicznych. Dzięki temu analiza zmian elastyczności powierzchni monowarstwy występujących np. pod wpływem osadzania się zanieczyszczeń na powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz (GLI) dostarcza cennych informacji o jej stanie fizycznym. Dynamika zmian powierzchni międzyfazowej GLI jest związana z jej odkształceniami γ , które w przypadku monowarstw lipidowych przybierają formę ściskania lub rozciągania charakteryzowanych przez moduł dylatacyjny ε_D . Odkształcenie można zdefiniować przez względne wydłużenie powierzchni:

$$\gamma = \frac{dA}{A} = d \ln A \quad (5.7.)$$

Moduł dylatacyjny jest miarą zmian napięcia powierzchniowego na skutek odkształceń powierzchni^(113,178).

$$\varepsilon_D = \frac{d\sigma}{\gamma} = \frac{d\sigma}{d \ln A} \quad (5.8.)$$

Eksperymentalne wyznaczenie ε_D polega najczęściej na monitorowaniu odpowiedzi układu (tj. zmian σ lub π) na sinusoidalne zmiany powierzchni (cykl kompresja-ekspansja) o zadanej amplitudzie⁽¹⁷⁹⁾. Podczas jednostronnej kompresji, właściwości mechaniczne monowarstwy najczęściej opisuje się za pomocą ściśliwości κ :

$$\kappa = -\frac{1}{A} \frac{dA}{d\pi} = -\frac{d \ln A}{d\pi} \quad (5.9.)$$

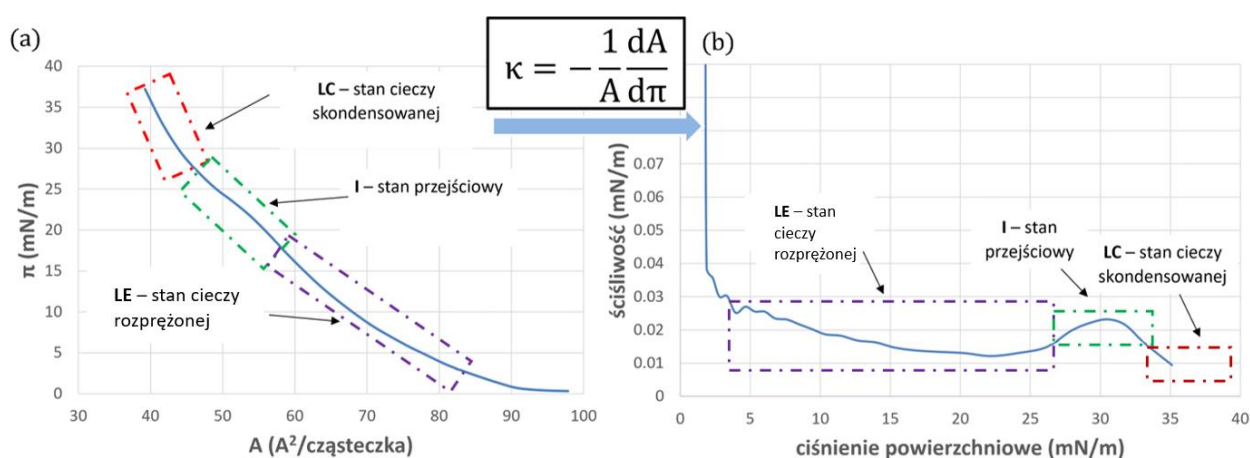
Ściśliwość monowarstwy należy rozumieć jako jej podatność na odkształcenie w postaci kompresji (ściskania). Jak łatwo pokazać, ściśliwość powierzchni (lub monowarstwy) można powiązać z modułem dylatacyjnym (zależność 5.10.)^(113,139,178), który w tych warunkach pomiaru odpowiada sprężystości powierzchni Gibbsa^(139,180).

$$\kappa = \frac{1}{\varepsilon_D} \quad (5.10.)$$

Ściśliwość jako parametr służący do analizy właściwości mechanicznych monowarstwy jest stosunkowo prosty do obliczenia i nie zależy od sposobu wyrażenia (jednostki) pola powierzchni ($\text{\AA}^2/\text{cząsteczka}$ lub cm^2), co wykazano w pracy⁽¹⁸¹⁾. Analiza przebiegu krzywej ściśliwości (Rys. 5.8.), wyliczanej na podstawie izoterm π -A, umożliwia czytelne wyróżnienie zakresów odpowiadających stanom organizacji monowarstwy lipidu, opisanych w rozdziale 5.4.3, w tym stanu gazowego (G) o nieskończonej ściśliwości, stanu cieczy rozprężonej (LE), stanu przejściowego (I) o charakterystycznym lokalnym maksimum, oraz stanu cieczy skondensowanej (LC) o bardzo małej ściśliwości. Alternatywnym parametrem oceny oddziaływań zdeponowanego aerozolu na powierzchnię płucną jest współczynnik ściśliwości c_s^{-1} :

$$c_s^{-1} = -A \frac{d\pi}{dA} = \frac{1}{\kappa} \quad (5.11.)$$

Odzwierciedla on wprost elastyczność warstwy międzyfazowej ciec-z-gaz podczas jej kompresji (jest równoważny definicji sprężystości Gibbsa). Wartości c_s^{-1} zostały zaproponowane przez Daviesa i Rideala do wyznaczenia stanów termodynamicznych monowarstwy. Na podstawie analizowanej krzywej współczynnika ściśliwości $c_s^{-1}-\pi$ oraz stosując ww. kryteria, przyjmuje się następujące zakresy c_s^{-1} : gazowa G - $c_s^{-1} < 12,5$ mN/m; stan cieczy rozproszonej LE - $c_s^{-1} = 12,5-50$ mN/m; przejściowa I - $c_s^{-1} = 50-100$ mN/m; stan cieczy skondensowanej LC - $c_s^{-1} = 100-250$ mN/m i stała S - $c_s^{-1} > 250$ mN/. Takie podejście szczególnie często stosowane jest przy przenoszeniu monowarstwy na powierzchnię stałą (transfer Langmuira-Blodgett), gdzie szczególnie istotne jest uzyskanie filmów zawierających cząsteczki o odpowiedniej orientacji przestrzennej^(182–184).



Rys.5.8. Przykładowa izoterma kompresji (a) i zależność ściśliwości powierzchni międzyfazowej ciec-z-gaz (b) w obecności DPPC, z uwzględnieniem stanów organizacji monowarstwy. Na podstawie badań własnych ($T = 37^\circ\text{C} \pm 0,3^\circ\text{C}$)

Analiza powierzchni międzyfazowej w obecności PS podczas sinusoidalnych oscylacji

Kolejna koncepcja badań wymaga zastosowania metody pomiarowej umożliwiającej cykliczną kompresję i ekspansję GLI. Jedną z takich metod jest technika oscylującej (pulsującej) kropli. Dzięki pomiarowi dynamicznego napięcia powierzchniowego przy zmieniającej się wielkości powierzchni międzyfazowej ciec-z-gaz uzyskuje się informację o przebiegu histerezy napięcia powierzchniowego oraz o powierzchniowych właściwościach reologicznych. Metodę tą zastosowano w tej pracy, a jej dokładny opis został przedstawiony w podrozdziale 9.3.2. Analiza wyników pomiarowych wymaga zrozumienia istoty lepkosprężystej natury powierzchni międzyfazowej. Periodyczna sinusoidalna deformacja GLI $\gamma(t)$, jest opisana jako:

$$\gamma(t) = \gamma_m \sin(\omega t) \quad (5.12.)$$

gdzie ω (rad/s) oznacza częstość oscylacji:

$$\omega = 2\pi f \quad (5.13.)$$

zaś f (Hz) jest ich częstotliwością. Deformacja taka wywołuje dynamiczne zmiany σ w funkcji czasu $t^{(113,139)}$. Uzyskana zależność σ - A obrazuje histerezę napięcia powierzchniowego. Analizując przebieg histerezy przy zastosowaniu odpowiednich kryteriów ilościowych można ocenić przebieg zmian właściwości powierzchni międzyfazowej ciec-z-gaz. W tym celu stosuje się, takie parametry jak: (a) minimalna i maksymalna wartość napięcia powierzchniowego w cyklu, odpowiednio σ_{min} i σ_{max} ; (b) znormalizowane pole histerezy HAn , czy (c) indeks stabilności $SI^{(115,185)}$:

$$HAn = \frac{[\int_A \sigma dA]_{eksp} - [\int_A \sigma dA]_{komp}}{A_{max} - A_{min}} \quad (5.14.)$$

$$SI = \frac{\sigma_{max} - \sigma_{min}}{\frac{1}{2}(\sigma_{max} + \sigma_{min})} \quad (5.15.)$$

Tak jak wspomniano, zjawisko histerezy jest konsekwencją m.in. właściwości lepkosprężystych obszaru powierzchniowego. W przypadku powierzchni o takich cechach postać modułu dylatacyjnego (równanie 5.8.) można zapisać w postaci zespolonej ε^* jako:

$$\varepsilon^* = \varepsilon' + i\varepsilon'' \quad (5.16.)$$

gdzie wyróżniamy część rzeczywistą odpowiadającą cechom sprężystym określoną mianem modułu zachowawczego ε' oraz część urojoną charakteryzującą właściwości lepkie, nazywaną modułem stratności (dyssypacyjnym) ε'' (178). W zapisie trygonometrycznym moduł zachowawczy wyrażony jest zależnością:

$$\varepsilon' = |\varepsilon_D| \cos \varphi \quad (5.17.)$$

a moduł stratności:

$$\varepsilon'' = |\varepsilon_D| \sin \varphi \quad (5.18.)$$

gdzie φ stanowi kąt przesunięcia fazowego (kąt strat) i może przyjmować wartości od 0 do $\pi/2$. Łatwo wykazać, że^(113,139):

$$\tan \varphi = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} \quad (5.19.)$$

wobec czego $\varphi=0$ odpowiada powierzchni czysto sprężystej ($\varepsilon''=0$, $\tan \varphi=0$), a $\varphi=\frac{\pi}{2}$ – czysto lepkiej ($\varepsilon'=0$, $\tan \varphi=\infty$). Opis powierzchni lepkosprężystej wg modelu Kelvina-Voigta, z uwzględnieniem zależności między odpowiedzią powierzchni $\Delta\sigma$ a dylatacyjną deformacją granicy faz γ i szybkością dylatacyjną $\dot{\gamma}_D = \frac{d\gamma}{dt}$ pozwala uzyskać następującą zależność:

$$\Delta\sigma = \varepsilon_d \gamma + \mu_d \dot{\gamma}_D \quad (5.20.)$$

która obrazuje związek między modułami: zachowawczym ε' i dyssypacyjnym ε'' a parametrami reologicznymi powierzchni: sprężystością ε_d i lepkością μ_d . GLI poddana deformacjom o niskiej częstości przejawia głównie cechy lepkie, natomiast wraz ze

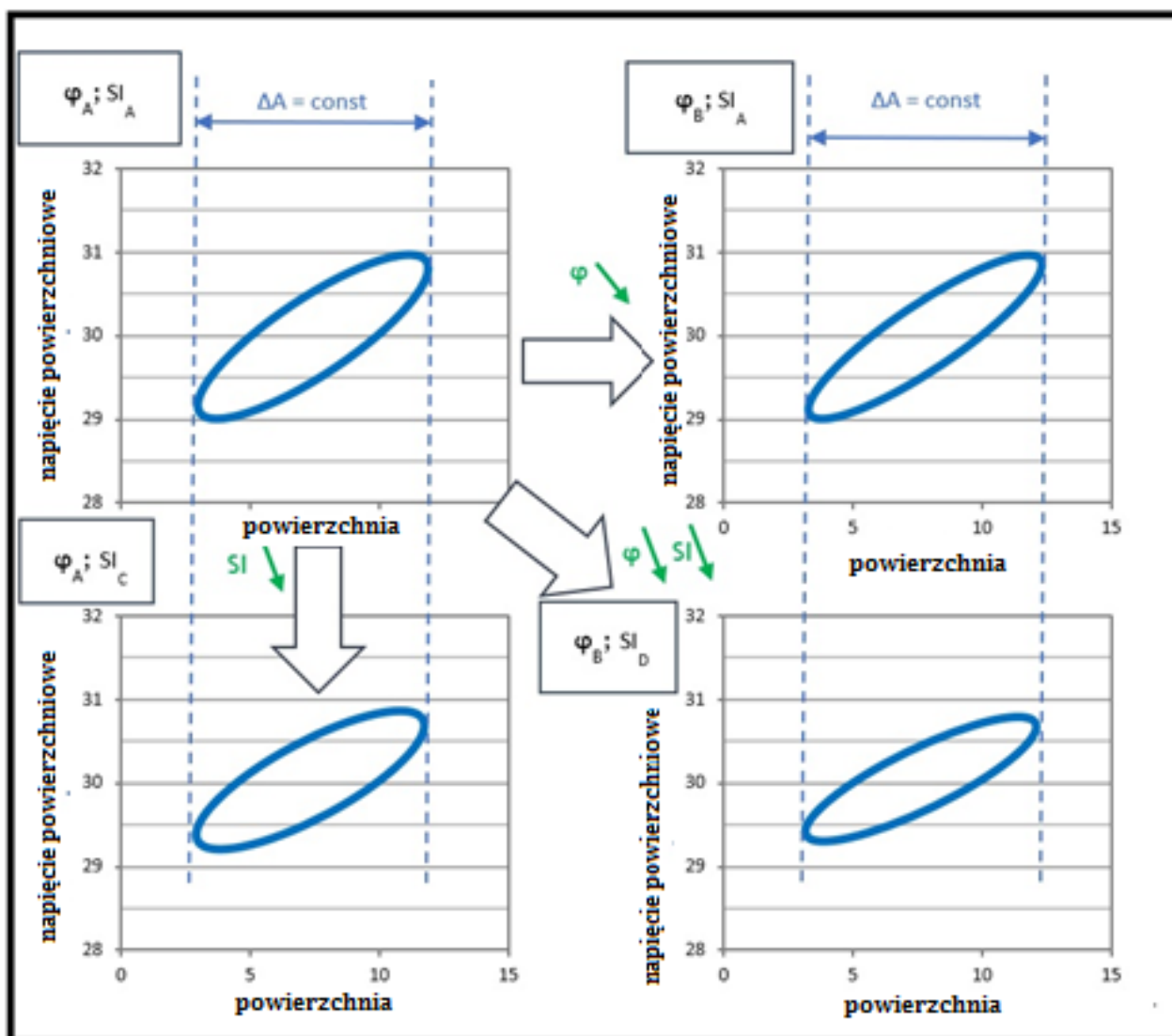
zwiększaniem częstości zaczynają przeważać cechy elastyczne⁽¹⁴³⁾. Wartość μ_d oraz ε_d mogą zależeć także od częstotliwości i amplitudy oscylacji. Wynika to z faktu, że ww. parametry reologiczne są pozorne i zależą nie tylko od mechanicznych właściwości GLI, ale także od dynamiki procesów adsorpcji i desorpcji cząsteczek surfaktantu oraz kinetyki wymiany masy między obszarem przypowierzchniowym a objętością cieczy⁽¹³⁹⁾.

Stosując stałą amplitudę oscylacji, w pomiarach surfaktantu płucnego można uzyskać wartości μ_d i ε_d , umożliwiające śledzenie zmian właściwości powierzchni płynu biologicznego (w tym: pętli histerezy σ) np. w badaniach oddziaływań zdeponowanego aerozolu na powierzchnię płucną^(186,187). Na podstawie 5.16. i 5.20. można wykazać, że:

$$\varphi = \arctan\left(\frac{\mu_d \omega}{\varepsilon_d}\right) \quad (5.21.)$$

co pokazuje, że kształt histerezy zależny jest od elastyczności dylatacyjnej, lepkości dylatacyjnej oraz szybkości oscylacji. Gdy człon lepkościowy zaczyna być dominujący (przy niższych częstotliwościach), szerokość histerezy wzrasta. Natomiast, przy wyższych wartościach częstotliwości wzrasta udział członu sprężystego, co odzwierciedla zwężona szerokość histerezy^(143,186,188).

Podsumowując, przedstawiane kryteria oceny histerezy napięcia powierzchniowego (HAn , SI) oraz kryteria reologiczne powierzchni (ε_d , μ_d i φ) umożliwiają ilościowe porównanie wpływu zdeponowanych cząstek lub kropeł aerozolowych na surfaktant płucny. Ocena zależności pomiędzy φ a SI (równanie 5.15.) pokazuje, że zmiany tych parametrów są związane z HAn (równanie 5.14.) oraz kształtem pętli histerezy. Jednocześnie, SI jest zależny od maksymalnego zakresu zmian napięcia powierzchniowego i wykazuje większą czułość na zmiany ε_d niż od μ_d przy umiarkowanych szybkościach odkształcania GLI. Ogólne powiązania pomiędzy ilościowymi parametrami oceny histerezy $\sigma(A)$ pozwoliły na opracowanie schematu (Rys. 5.8.), opublikowanego we współautorskiej pracy⁽¹⁴⁶⁾ ułatwiającego dyskusję wpływu zdeponowanego aerozolu na podstawie wyznaczonych tendencji zmian wartości.



Rys. 5.8. Teoretyczna analiza zależności między różnymi parametrami liczbowymi opisującymi histerezę σ - A w układzie MPS i ich wpływem na kształt i wielkość histerezy⁽¹⁴⁶⁾

6. Charakterystyka procesu nebulizacji

6.1. Podstawy procesu

Proces atomizacji cieczy (w tym nebulizacja leków) prowadzi do jej rozproszenia (fragmentacji), w wyniku którego powstają krople zawieszone w fazie gazowej. Atomizacja jest wynikiem działania zewnętrznych sił niszczących przeciwstawiających się siłom kohezji oraz siłom lepkościowym, które zapewniają stabilizację struktury cieczy. Dopiero przekroczenie warunków granicznych wywołuje proces rozpadu. W tym momencie zaburzenia wywołane w cieczy zyskują dominację nad siłami utrzymującymi jej ciągłość. Produkt pierwotnej atomizacji zazwyczaj jest labilny i ulega zmianom na skutek oddziaływań wzajemnych pomiędzy kroplami oraz kropli z przeszkodami (atomizacja wtórna)⁽¹⁸⁹⁾. W przypadku procesów nebulizacji stosowanych w medycynie, rozpad cieczy jest powodowany przez siły aerodynamiczne lub fale ultradźwiękowe.

6.1.1. Fizykochemia zjawisk na powierzchni kropli

Elementy płynu powstające w wyniku jej rozpadu (tj. krople) przybierają kształt kulisty, minimalizujący energię swobodną nowopowstałej powierzchni ciecz-gaz⁽¹⁹⁰⁾. Cząsteczki płynu znajdujące się na granicy styku dwóch faz (powierzchni międzyfazowej) są silniej wciągane do wnętrza fazy ciekłej niż molekuly z jej głębi ku powierzchni, co umożliwia utworzenie stabilnej struktury kropli. Ta nierównowaga oddziaływań przejawia się w postaci napięcia powierzchniowego. Ewentualne zmiany w wielkości powierzchni - jej kompresja lub ekspansja mogą nastąpić w wyniku, odpowiednio, spadku lub wzrostu temperatury oraz pod działaniem różnych sił⁽¹⁴⁰⁾.

Kropla poruszająca się w ośrodku gazowym jest poddawana działaniu naprężeń ścinających na granicy styku obu faz: ciekłej i gazowej. Kulisty obiekt może ulegać odkształceniu np. spłaszczeniu na skutek działania sił oporu lub przyspieszeniu. Wszystkie te czynniki mogą zmieniać ruch (tor oraz prędkość) kropli. Przykładowo, deformacja kształtu, objawiającego się wzrostem obszaru „czołowego” powoduje wzrost współczynnika oporu, co przekłada się na zmianę toru poruszania się i prędkości⁽¹⁹¹⁾. Udział sił działających na ciecz może zostać opisany za pomocą bezwymiarowych liczb: Reynoldsa (Re) wyrażającej stosunek sił bezwładnościowych do sił lepkości (6.1.), Webera (We), która określa znaczenie bezwładności cieczy w porównaniu do sił napięcia powierzchniowego (6.2.) oraz Ohnesorge’a (Oh) będącej ich kombinacją, w której nie występuje prędkość cieczy (6.3.):

$$Re = \frac{\rho u d_d}{\mu} \quad (6.1.)$$

$$We = \frac{\rho u^2 d_d}{\sigma} \quad (6.2.)$$

$$Oh = \frac{\sqrt{We}}{Re} = \frac{\mu}{\sqrt{\rho \sigma d_d}} \quad (6.3.)$$

gdzie ρ oznacza gęstość cieczy, u prędkość kropli, μ lepkość dynamiczną gazu, σ napięcie powierzchniowe, a d_d średnicę kropli.

Aerozol ewoluuje podczas przepływu i dokładne przewidywanie jego dynamiki jest trudne. W bardzo rozcieńczonych aerozolach można założyć, że każda kropla stanowi odizolowane indywiduum. Jednakże w mgłach o dużym stężeniu, odległości między kroplami są małe i łatwiej w obliczeniach potraktować grupę elementów zawieszonych jako pseudofazę. Opis ruchu oraz sił aerodynamicznych można ująć za pomocą, odpowiednio, II prawa dynamiki Newtona oraz ujęciu Langrange'a-Eulera uwzględniającego siły oporu działające na krople. Jeśli obliczenie sił działających na styku obu faz odbywa się poprzez rozwiązanie rozkładu naprężeń to możliwa jest ocena oddziaływania wzajemnego układu kropla-medium gazowe⁽¹⁹¹⁾. Na podstawie przeprowadzonych symulacji⁽¹⁹²⁾ stwierdzono, że przy niskich wartościach liczby Re fazy gazowej, kropla zachowuje się jak ziarno ciała stałego, jednak wraz ze wzrostem Re wzrastają oddziaływania na kroplę, co prowadzi do powstania wewnętrznej cyrkulacji cieczy (wiry Hilla). Na przebieg zjawisk występujących w głębi kropli kluczowy wpływ ma lepkość cieczy.

W skupisku kropeł zawieszonych w gazie, może dochodzić do kolizji pomiędzy nimi. Najczęściej obserwowanym zjawiskiem są zderzenia o charakterze binarnym, tzn. zderzenia pary kropeł. Interakcje takie mogą mieć charakter stabilny prowadzący do powstania nowego obiektu (koalescencja), którego objętość jest sumą dwóch zderzających się kropeł lub niestabilny, w którym powstają dwie krople o objętościach równych albo mniejszym niż pierwotne (rozpad)^(191,193). Częstość zachodzenia koalescencji lub rozpadów wzrasta wraz ze wzrostem zawartości kropeł o większej średnicy oraz ze wzrostem natężenia strumienia przepływu gazu zawierającego krople. Efekty kolizji mają niewielki wpływ na prędkość nowopowstałego elementu^(193,194). Należy także podkreślić rolę właściwości fizykochemicznych cieczy na przebieg ewolucji kropeł aerozolu. Obecność surfaktantu, czyli czynnika wykazującego aktywność powierzchniową, usztywnia powierzchnię kropli, a przez co spowalnia możliwość zajścia koalescencji. Jednocześnie, wzrost zawartości surfaktantu (do osiągnięcia krytycznego stężenia micelizacji) powoduje spadek napięcia powierzchniowego, co prowadzi do zmniejszenia sił przeciwdziałających deformacji czy rozpadowi kropli. Konsekwencją jest zwiększenie częstości fragmentacji, w wyniku której aerozol przeobraża się w układ zawierający krople o mniejszych rozmiarach, a więc i większej sumarycznej powierzchni międzyfazowej^(194,195).

W zbiorze kropeł zawieszonych w fazie gazowej dochodzi do wymiany ciepła oraz masy. Dużą rolę odgrywa tutaj proces parowania cieczy, którego wpływ na właściwości pojedynczej kropli opisuje prawo D^2 (parowania)⁽¹⁹⁶⁾. W stężonych mgłach wpływ na parowanie jednej kropli mają sąsiadujące elementy zawieszone, a wpływ wzmacnia się wraz ze zmniejszeniem się odległości między obiektami^(197,198). W stężonych aerozolach dominującym mechanizmem transportu ciepła i masy podczas odparowania jest dyfuzja, natomiast w układach rozcieńczonych parowanie zachodzi na skutek głównie z udziałem konwekcji wymuszonej lub naturalnej⁽¹⁹⁹⁾. Konsekwencją parowania jest oczywiste zmniejszenie wielkości średnicy kropeł. Natomiast jeżeli aerozol ulegnie zmieszaniu z powietrzem o wysokiej wilgotności w sytuacji, gdy krople mają temperaturę poniżej punktu rosy, to dochodzi do kondensacji (skraplania) pary wodnej w wyniku, której rośnie objętość kropli. W przypadku kropeł o małych średnicach proces parowania zachodzi intensywniej ze względu na podwyższoną prężność pary przy powierzchni międzyfazowej⁽²⁰⁰⁾.

6.1.2. Podział nebulizatorów ze względu na zasadę działania i ich charakterystyka

Medyczne urządzenia inhalacyjne działające na zasadzie generacji aerozolu z farmaceutyków w postaci ciekłej oraz stałej (sproszkowanej) zostały zaklasyfikowane do sześciu grup, do których należą atomizery donosowe, atomizery doustne, inhalatory proszkowe DPI (z ang. *dry powder inhalers*), nebulizatory, dawkujące inhalatory ciśnieniowe pMDI (z ang. *pressurized metered dose inhalers*) oraz inhalatory nowej generacji. Wśród nebulizatorów, wyróżnia się nebulizatory pneumatyczne (JN – z ang. *jet nebulizers*) oraz ultradźwiękowe, w tym klasyczne (UN – z ang. *ultrasonic nebulizers*) i siateczkowe o pracy ciągłej (VMN – z ang. *vibrating mesh nebulizers*)⁽²⁰¹⁾.

Nebulizatory medyczne to urządzenia służące do rozpylania ciekłych farmaceutyków lub preparatów medycznych wspomagających leczenie. W wyniku fragmentacji cieczy powstaje mgła zawierająca drobne krople z zakresu typowo 0,1-10 μm . Stosowane są różne metody rozpylania wykorzystujące kilka mechanizmów atomizacji cieczy. Fragmentacja cieczy zachodząca dzięki energii sprężonego powietrza jest zastosowana w nebulizatorach pneumatycznych zaś energia drgań ultradźwiękowych o różnych częstotliwościach jest wykorzystywana w nebulizatorach ultradźwiękowych klasycznych (2-3 MHz) oraz siateczkowych (100-200 kHz)^(191,202).

Nebulizatory są w większości urządzeniami charakteryzującymi się pracą ciągłą jednak istnieją również modele, których praca jest skorelowana z oddechem pacjenta⁽²⁰³⁾. Nieprzerywany proces atomizacji ułatwia korzystanie z wziewnej drogi podawania leków zwłaszcza osobom z zaburzeniami oddechowymi, a także dzieciom. Specyfika działania

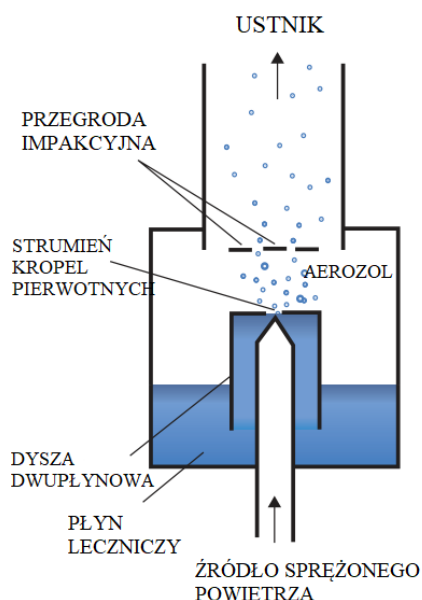
nebulizatorów wymaga jednak znaczącego wydłużenia czasu przyjmowania leków w stosunku do innych inhalatorów, a także prowadzi do strat farmaceutyków, występujących zarówno w momencie wydechu, jak i związanych ze znaczną objętością rezydualną (tj. objętością cieczy, która nie może ulec atomizacji i pozostaje w komorze nebulizatora). Dodatkowo, wymienione cechy nebulizatorów rzutują również na ograniczoną powtarzalność dawki dostarczonej podczas inhalacji⁽²⁰²⁾. Dużą zaletą stosowania nebulizatorów jest natomiast ogromna różnorodność leków, które można użyć w większości przypadków z dowolnym typem nebulizatora. Należy przy tym zaznaczyć, że nie istnieją jeszcze odpowiednie regulacje określające optymalną kombinację systemu lek-medyczny atomizator⁽⁶⁾. Oznacza to, że pacjenci używają różnych nebulizatorów do rozpylania takich samych farmaceutyków.

Wszystkie nebulizatory są wyposażone w głowicę (komorę), w której zachodzi proces atomizacji. Powstały aerozol zostaje następnie wprowadzony do jamy ustnej poprzez ustnik i/lub maseczkę, do tchawicy poprzez system przewodów i łączników, ale także może być podany donosowo⁽²⁰⁴⁾. Istotnym czynnikiem mającym wpływ na przebieg procesu atomizacji we wszystkich typach nebulizatorów są właściwości fizykochemiczne rozpylanej cieczy. Zagadnienie to było, ale także w dalszym ciągu jest przedmiotem licznych badań przedstawionych w podrozdziale 6.2.2, jak i w części doświadczalnej niniejszej rozprawy.

6.1.2.1. *Nebulizatory pneumatyczne*

Atomizacja sprężonym powietrzem jest podstawą działania nebulizatorów pneumatycznych, a siłą napędową procesu jest różnica ciśnień wytwarzana w naczyniu nebulizacyjnym. Historycznie (od lat 30. XX w.), jest to najdłużej wykorzystywana technika wśród komercyjnych urządzeń tego typu. Nebulizatory pneumatyczne (JN) składają się z głowicy wyposażonej w dyszę dwupłynową Venturiego podłączoną za pomocą przewodu ciśnieniowego do sprężarki elektrycznej dostarczającej sprężone powietrze (Rys. 6.1.). Aerozol jest generowany w głowicy, gdzie warstewka płynnego leku kontaktuje się ze strumieniem gazu o dużej prędkości. Sprężone powietrze wprowadzane jest do głowicy nebulizatora przez stożkową dyszę po czym kontaktuje się z płynem leczniczym zasysanym do przestrzeni wokół dyszy. Tuż po opuszczeniu dyszy następuje raptowne rozprężenie powietrza, co generuje wystąpienie lokalnego podciśnienia (efekt Venturiego). W wyniku fragmentacji cieczy powstaje polidispersyjny aerozol pierwotny. Proces ten jest konsekwencją ścinania cieczy prowadzącego do wytworzenia cienkich warstw, które są niestabilne hydrodynamicznie i rozpadają się na krople o zróżnicowanej wielkości. Krople te zostają porwane przez przepływający gaz^(71,191,202,205) i trafiają na wbudowaną i umieszczoną nad wlotem sprężonego gazu wewnętrzną przegrodę impakcyjną. Zderzające się z nią duże krople są rozbijane o jej

powierzchnię, w wyniku czego powstają mniejsze krople, a część cieczy ścieka na dno pojemnika. Powstający aerozol wtórny ulega dalszej separacji w wyniku uderzeń o ścianki nebulizatora lub depozycji w ustniku. Większość cieczy jednak recyrkułuje tj. ulega wielokrotnemu rozpraszaniu i zwracaniu do naczynia. W efekcie, z głowicy może wydostać się tylko chmura o odpowiedniej ilości drobnych kropeł (aerozol wtórny), która przez ustnik jest wprowadzana do jamy ustnej pacjenta^(202,206–208).



Rys. 6.1. Schemat budowy i zasady działania nebulizatorów pneumatycznych⁽²⁰⁶⁾

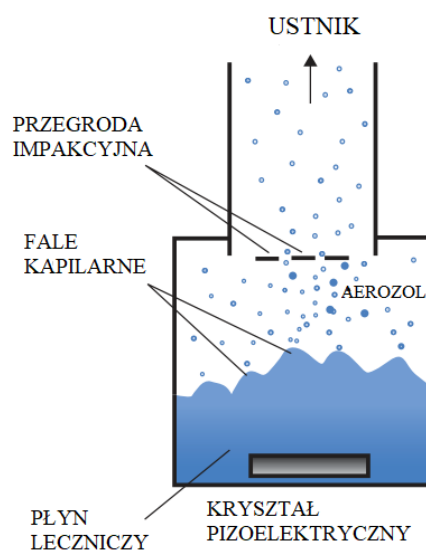
6.1.2.2. Nebulizatory ultradźwiękowe

6.1.2.2.1. Klasyczne nebulizatory ultradźwiękowe

W celu eliminacji wad, które niesie za sobą atomizacja sprężonym powietrzem (m.in. schładzanie się aerozolu oraz hałas wynikający z pracy sprężarki) na początku lat 50. XX w. opracowano technikę rozpraszania cieczy bazującą na drganiach o wysokiej częstotliwości. Zastosowane fale ultradźwiękowe stanowią lokalne zaburzenia ciśnienia, które ulegają propagacji w ośrodku ciekłym. Rozprzestrzenianie się fali, obserwowane jest w postaci oscylacyjnego cyklu kompresji-ekspansji powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz. Nebulizatory wykorzystujące ten mechanizm atomizacji nazwano nebulizatorami ultradźwiękowymi (UN, Rys. 6.2.). Ze względu na zasadę działania można wyróżnić kilka rodzajów mechanizmów: najstarsze - wywołujące fale ciśnieniowe (20 kHz - 10 MHz, Rys. 6.2.), stosujące powierzchniowe fale akustyczne (rzędu MHz-GHz Rys. 6.3.) oraz relatywnie nowe - przetłaczające ciecz przez wibrującą membranę (VMN - patrz podrozdział 6.1.2.2.2)^(201,202,206).

We wszystkich typach urządzeń elementem roboczym jest kryształ piezoelektryczny będący źródłem drgań. Zmienne pole elektryczne przykładane jest do przetwornika piezoelektrycznego przekształcającego sygnał elektryczny na okresowe drgania mechaniczne.

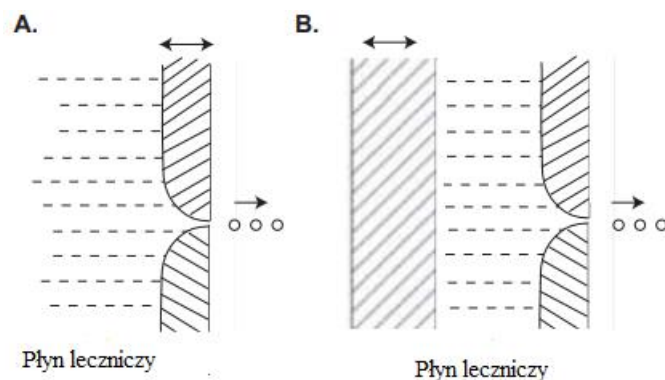
W klasycznych UN powstają oscylacyjne zaburzenia ciśnienia (fale ciśnienia), które po dotarciu do powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz są przekształcane na fale kapilarne⁽²⁰⁶⁾. Następuje destabilizacja powierzchni międzyfazowej, czemu przeciwdziałają naprężenia stabilizujące (kapilarne). W krytycznym momencie drgań, fale kapilarne ulegają dezintegracji (teoria Wooda i Loomisa, 1927 r., pogłębiona przez Soellnera, 1936 r.) poprzez powstawanie wibrujących pęcherzyków kawitacyjnych, które odrywają się od fazy ciągłej. Prowadzi to do fragmentacji ośrodka cieczowego i powstania chmury aerozolowej porywanej przez przepływ powietrza (pochodzącego z dodatkowego źródła)⁽²⁰⁹⁾. Także, w tej konstrukcji występuje przegroda impakcyjna, na której duże krople ulegają rozbiciu lub osadzeniu i w konsekwencji zawróceniu do cieczy. Podczas procesu nebulizacji prowadzonej w urządzeniach ultradźwiękowych dochodzi do powolnego podgrzania cieczy, co powoduje, że ten typ nebulizatora nie jest odpowiedni do stosowania termolabilnych substancji. UN nie nadaje się także do atomizacji cieczy lepkich oraz zawiesin, gdzie może dochodzić do preferencyjnej emisji cieczy w stosunku do emisji zawieszonych cząstek^(55,201,210).



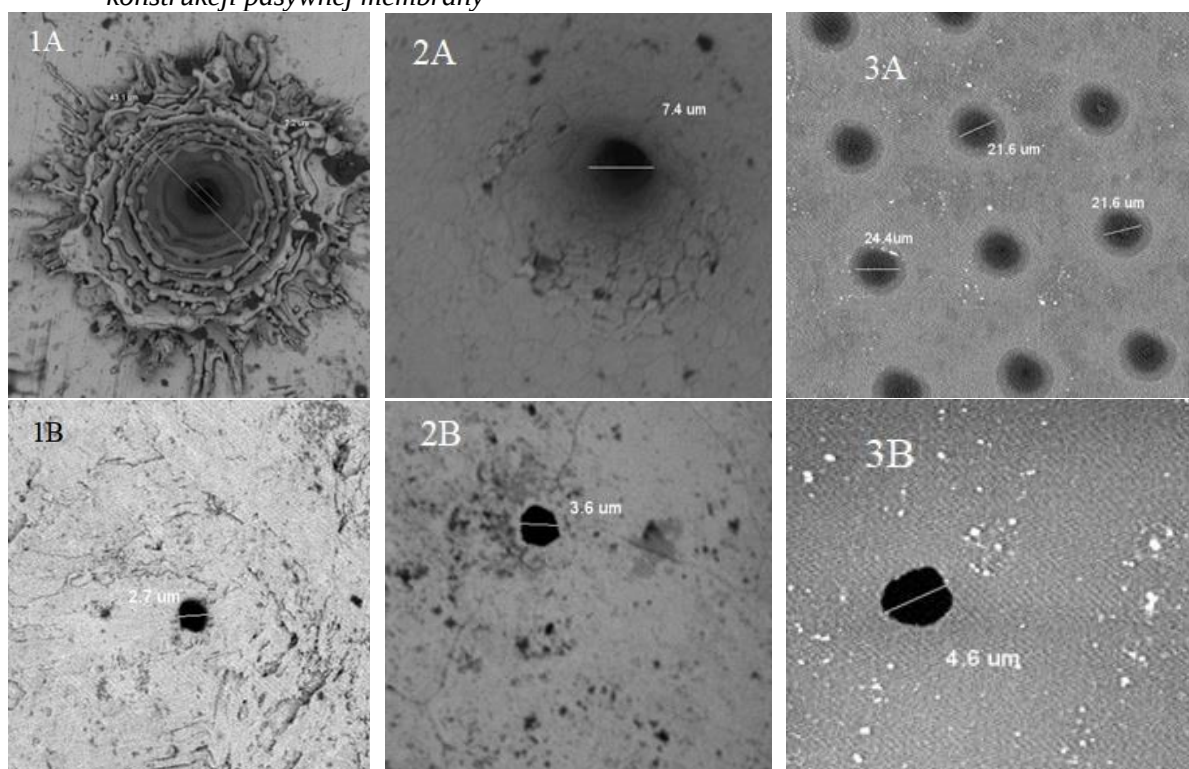
Rys. 6.2. Schemat budowy i zasady działania klasycznych nebulizatorów ultradźwiękowych⁽²⁰⁶⁾

6.1.2.2.2. Nebulizatory siateczkowe

Wśród technik stosowanych w aerozoloterapii rosnącym zainteresowaniem (od ok. 2010 r.) cieszą się nebulizatory siateczkowe (konstrukcje pasywne i aktywne - Rys. 6.3.)⁽²¹¹⁾. Atomizacja cieczy zachodzi w wyniku drgań o częstotliwości 100-200 kHz. W porównaniu z nebulizatorami pneumatycznymi i klasycznymi ultradźwiękowymi proces odbywa się przy licznych naprężeniach ścinających oraz bez recyrkulacji cieczy. Ze względu na produkcję aerozolu o zawężonym rozkładzie wielkości kropeł nie są wymagane przegrody impakcyjne do eliminacji większych kropeł. Ewentualna depozycja może nastąpić jedynie w ustniku⁽²¹²⁾.



Rys. 6.3. Zasada działania urządzeń siateczkowych (A.) o konstrukcji aktywnej membrany i (B.) o konstrukcji pasywnej membrany⁽²¹²⁾



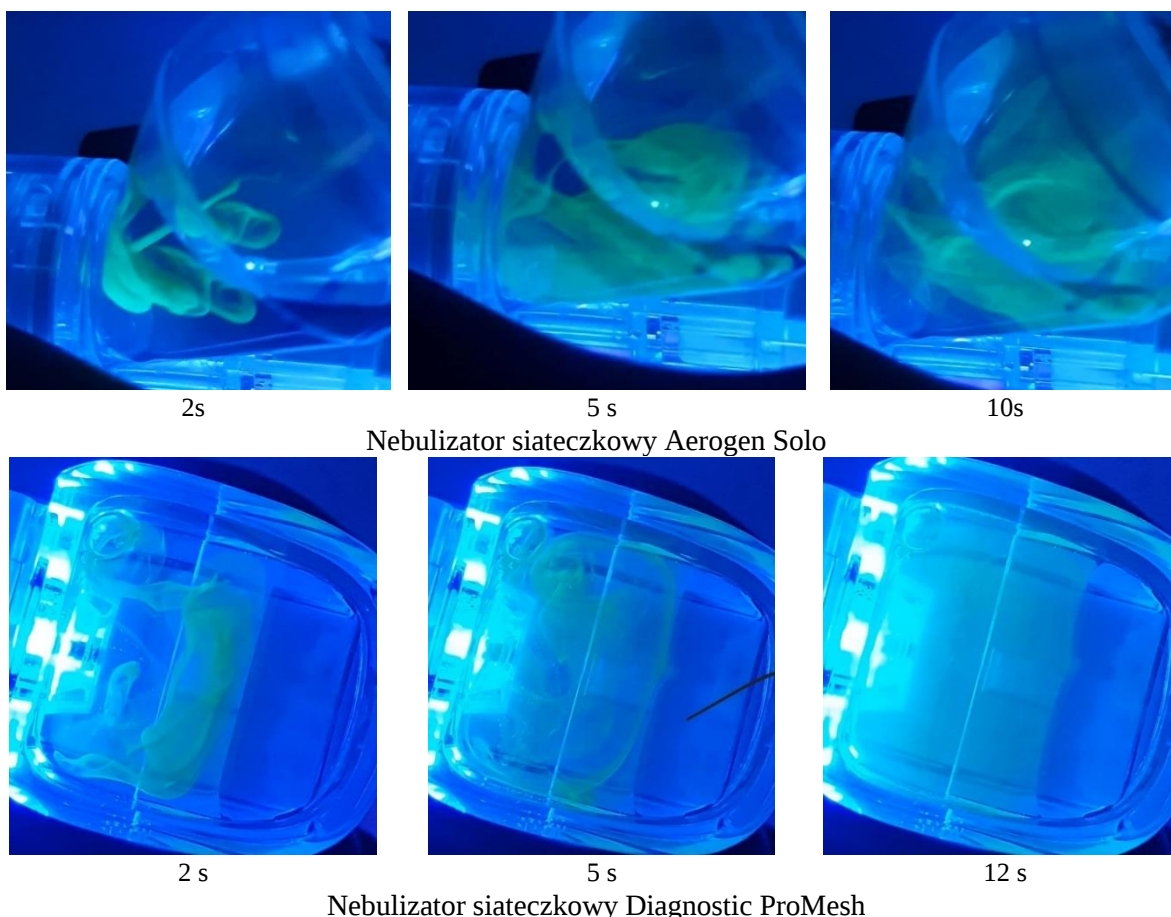
Rys. 6.4. Zdjęcia porów membran przykładowych nebulizatorów siateczkowych. A – otwór od strony komory nebulizatora; B – otwór od strony ustnika. Zdjęcia wykonane przez dr inż. Michała Wojaśńskiego (WIChiP PW).

Kluczowym elementem jest perforowana membrana (siateczka) wykonana z materiału o odpowiedniej wytrzymałości oraz sprężystości (metalowa lub polimerowa). Sztywność siateczki jest istotnym aspektem, gdyż przeciwdziała pojawieniu się oscylacji o różnej amplitudzie, co mogłoby skutkować fluktuacjami wydajności masowej procesu atomizacji. Zwilżalność materiału siateczki, również jest istotnym parametrem. Membrana może zawierać od kilkuset do kilku tysięcy równomiernie rozłożonych i precyzyjnie wykonanych otworów o jednakowej średnicy (Rys. 6.4. 3A), co teoretycznie zapewnia zbliżony do monodispersyjnego rozkład wielkości uwalnianych kropli. Wg teorii Rayleigha (1878 r.) rozmiar kropli jest w przybliżeniu dwa razy większy od rozmiaru otworu membrany. Otwory

wykonane metodą galwaniczną lub laserową mają kształt stożkowy (Rys. 6.4 1A-3B), co zapewnia przyspieszenie przepływu oraz zmniejszenie strat płynu^(191,211).

Konstrukcja aktywna opiera się na wykorzystaniu wibrującej perforowanej membrany, która wprowadzana jest w oscylacje przez drgający z dużą częstotliwością kryształ piezoelektryczny umieszczony w bezpośrednim sąsiedztwie membrany. Membrana stykająca się z płynem w tym przypadku ma konstrukcję kopułkową, co ułatwia porywanie płynu. Jest to proces bardzo efektywny, gdyż generowany aerozol jest emitowany z dużą wydajnością. Z kolei pasywna konstrukcja opiera się na oscylacyjnych wymuszeniach przepływu cieczy przez nieruchomą perforowaną płytkę. Siłą napędową jest tutaj różnica ciśnień generowana przez przetwornik piezoelektryczny znajdujący się w pewnej odległości od membrany o płaskim kształcie i przekazujący jej drgania za pośrednictwem cieczy^(212,213).

W fazie spoczynkowej membrana jest praktycznie nieprzepuszczalna względem płynu znajdującego się w komorze. Natomiast w fazie aktywnej, siatka wygina się w kierunku komory zaciągając ciecz i jednocześnie przepychając ją przez pory. Następnie, w fazie, w której membrana cofa się gwałtownie w stronę ustnika (drgania o częstotliwości 100 kHz) następuje oderwanie fragmentów cieczy, które tworzą najkorzystniejszy pod względem energetycznym obiekt – kulistą kroplę^(49,191). W wyniku oscylacji liniowej membrany w osiach góra-dół lub lewo-prawo dochodzi nie tylko do przepychania cieczy na zewnątrz komory, ale także do zaciągania powietrza, które w postaci pęcherzyków przedostaje się do cieczy, jednocześnie indukując jej cyrkulację o niewielkiej intensywności (lokalnie w sąsiedztwie membrany może wystąpić intensywniejsze mieszanie) (Rys. 6.5).



Rys. 6.5. Porównanie jakościowe cyrkulacji cieczy w komorze nebulizacyjnej w wybranych nebulizatorach siateczkowych (badania własne) – zielonożółte obszary pokazują konwekcję trasera.

6.2. Wpływ parametrów procesowych na jakość emitowanego aerozolu

Czynniki determinujące wielkość kropeł wytwarzanych w nebulizatorach można podzielić na dwie współistniejące grupy, tzn. grupę czynników zależnych od osobniczych cech pacjenta oraz czynników wynikających z przebiegu samego procesu nebulizacji. Osobnicze cechy pacjenta dotyczą m.in. sposobu użytkowania i oddychania. Do drugiej grupy czynników należą: charakterystyka cieczy rozpylanej (właściwości fizykochemiczne: lepkość, gęstość, napięcie powierzchniowe, przewodność elektrolityczna), ciśnienie i prędkość dostarczonego gazu (dotyczy tylko JN), częstotliwość drgań (dotyczy tylko UN i VMN), materiał tworzący siatkę i wielkość jej otworów (dotyczy tylko VMN), parametry powietrza rozcieńczającego (wilgotność i temperatura), konstrukcja oraz sposób działania urządzenia atomizującego. Czynniki te można zoptymalizować za pomocą narzędzi inżynierskich^(71,214–216).

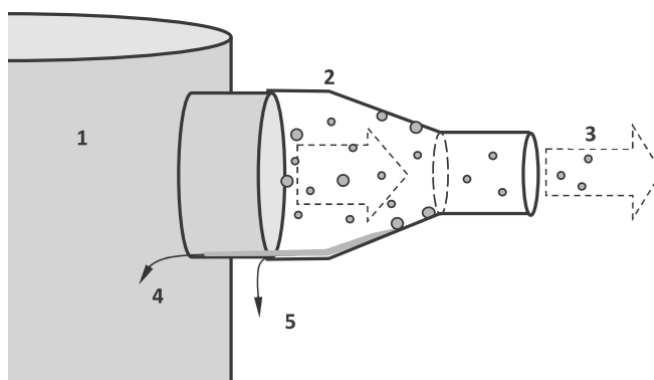
6.2.1. Wpływ konstrukcji urządzenia

Konstrukcja urządzeń medycznych atomizujących ciecz wynika z przyjętego sposobu rozpylania płynu, jednak wiele parametrów związanych z ich funkcjonowaniem można przeanalizować w celu porównania nebulizatorów oraz oceny uwalnianego aerozolu pod kątem

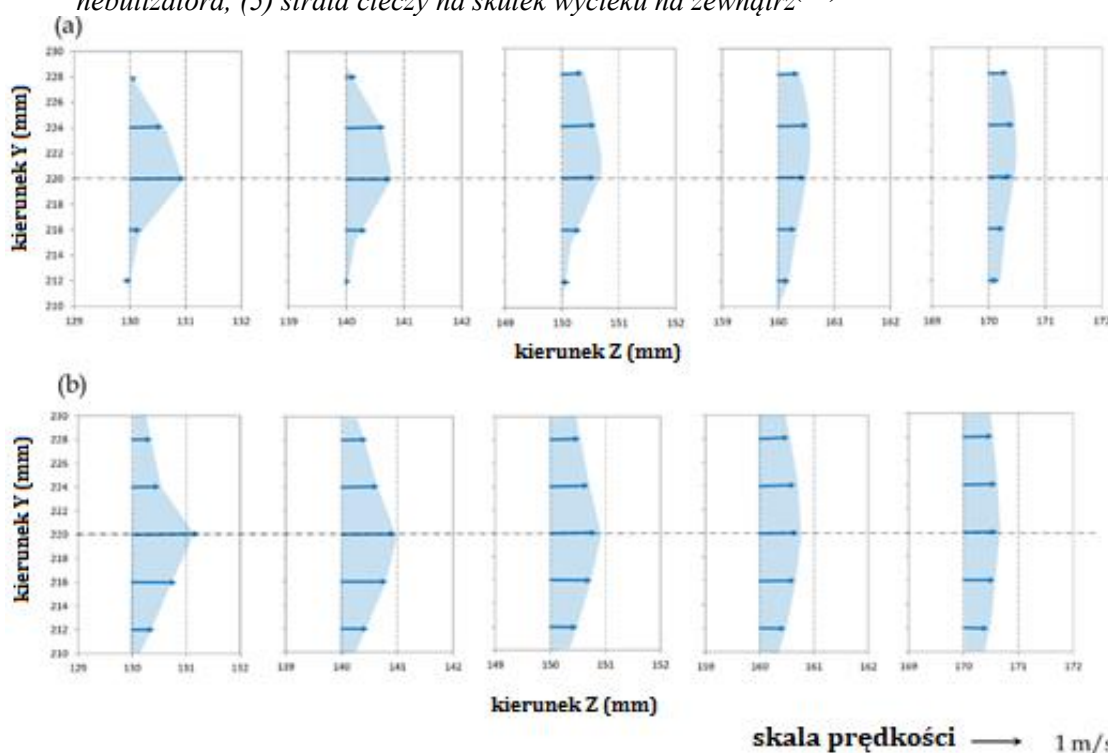
skuteczności dostarczania farmaceutyków do płuc. Jednym z nich jest prędkość i geometria strumienia mgły leczniczej^(54,217). Cechy te w znacznym stopniu wpływają na straty leku podczas inhalacji. Zbyt duża prędkość zwiększa prawdopodobieństwo depozycji kropeł już w ustniku, na maseczce lub w okolicach ust pacjenta (Rys. 6.6.). W Katedrze Inżynierii Układów Rozproszonych Politechniki Warszawskiej prowadzono badania próbujące określić zależność pomiędzy prędkością aerozolu a depozycją leku w układzie oddechowym^(218–220).

Istotną kwestią w tych rozważaniach jest wpływ profilu prędkości na dynamikę zmian (ewolucję) wielkości kropeł w chmurze aerozolowej. Badania potwierdziły, że nebulizatory pneumatyczne generują strumień mgły o większej szerokości i prędkości niż te produkowane przez nebulizatory z wibrującą membraną. Aerozol o stosunkowo niewielkiej prędkości ok. 0,5 m/s w przypadku VMN rozszerza się i zwalnia zaraz za wyjściem z naczynia nebulizacyjnego. Różnice w geometrii i prędkości chmury aerozolowej pomiędzy VMN oraz JN przekładają się na możliwość pokonywania ustnika i penetracji płuc⁽²²⁰⁾. Strumienie mgły emitowanej z nebulizatorów mają kształt stożkowy, a różnice pomiędzy prędkościami kropeł w obszarze zewnętrznym i wewnętrznym chmury są obserwowane na podstawie przekrojowych profili prędkości uzyskanych w pomiarach wykonanych za pomocą dopplerowskiej anemometrii laserowej (LDA) (Rys. 6.7.). Większa prędkość kropeł w części wewnętrznej może sprzyjać ich koalescencji⁽²²¹⁾. W przypadku nebulizatorów pneumatycznych, efekty te zależą od prędkości sprężonego powietrza oraz od stosunku przepływu cieczy do przepływu gazu. Wzrost prędkości gazu, determinujący natężenie przepływu obu płynów, zmniejsza rozmiar kropeł, tak samo jak spadek stosunku przepływu cieczy do gazu⁽²¹⁴⁾. W przypadku urządzeń zasilanych sprężonym powietrzem na zmianę wielkości kropeł wpływa także odparowanie. Ciecz jest rozpraszana powietrzem o małej wilgotności, które ulega nawilżeniu (adiabaticzne odparowanie wody) skutkującemu spadkiem temperatury aerozolu. Powstająca mgła o temperaturze z zakresu 14-18°C zostaje dodatkowo zmieszana z wdychanym cieplejszym powietrzem rozcieńczającym a następnie wprowadzona do organizmu, gdzie panują warunki fizjologiczne (Rys. 6.8.)^(191,205). Atutem atomizacji sprężonym powietrzem jest znacznie większa, w porównaniu do nebulizacji przeprowadzanej w VMN, masowa wydajność emisji⁽¹⁹¹⁾. Przy większej zawartości kropeł w aerozolu ich rozmiary mogą zostać zachowane, ze względu na mniej intensywne parowanie. Natomiast aerozole cechujące się znacznie mniejszym stężeniem są bardziej podatne na zmiany rozkładu wielkości kropeł przy mieszaniu z gazem o małej wilgotności⁽²²²⁾. Dodatkowo, znaczna prędkość generowanego aerozolu wzmacnia efekt rozprzestrzeniania się rozpylonej cieczy do otoczenia oraz może stanowić źródło transmisji chorobotwórczych drobnoustrojów

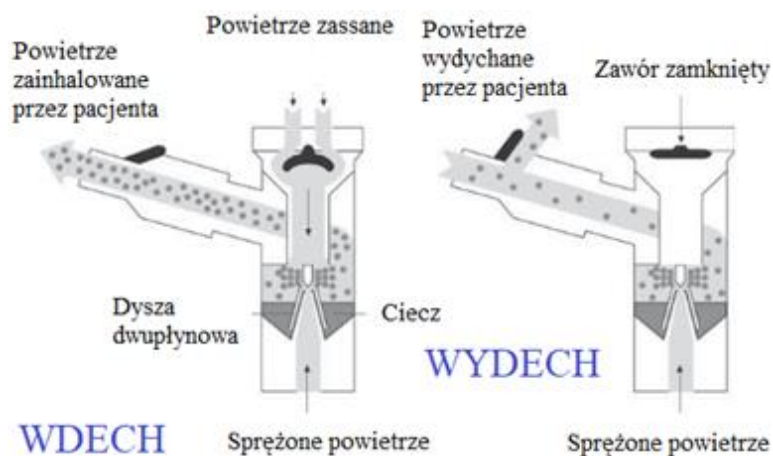
pochozących z układu oddechowego pacjenta⁽²¹⁹⁾. Możliwy przebieg transmisji aerozolu leczniczego do otoczenia odbywający się podczas wydechu został zaproponowany we współautorskiej pracy⁽²¹⁹⁾ i przedstawiony na Rys. 6.8. (aerozol osadzony w ustniku mającym kontakt ze śliną pacjenta, ścieka do naczynia i jest ponownie rozpylony, częściowo do otoczenia).



Rys. 6.6. Bezwładnościowa depozycja kropeł w ustniku nebulizatora: (1) korpus nebulizatora, (2) ustnik, (3) aerozol emitowany z ustnika, (4) odprowadzenie zdeponowanej cieczy do komory nebulizatora, (5) strata cieczy na skutek wycieku na zewnątrz⁽²¹⁹⁾



Rys. 6.7. Profile szybkości kropeł chmury aerozolowej wyemitowane przez (a) nebulizator pneumatyczny (Pari LC SPRINT) oraz (b) siateczkowy (Intec Twister Mesh) (badania własne)⁽²²⁰⁾



Rys. 6.8. Przebieg działania nebulizatora pneumatycznego wyposażonego w zawory zwrotne (zastawki) podczas cyklu oddechowego⁽²⁰²⁾

Wszystkie medyczne urządzenia nebulizujące prowadzą do nawilżenia gazu. Natomiast zmiany temperatury atomizowanego roztworu są zależne od konstrukcji urządzenia. W nebulizatorze ultradźwiękowym (Mist-O₂-Gen) stwierdzono podgrzanie cieczy w wyniku dostarczonej energii drgań (ultradźwięki). Do podobnych wniosków doszli także Steckel i Eskandar⁽²²³⁾. Badali oni na przykładzie nebulizatora pneumatycznego (Pari Boy) i ultradźwiękowego (Multisonic) efekty rozpylania preparatu awiskuminy rozpuszczonej w soli fizjologicznej. Zaobserwowano istotny spadek temperatury (o ok. 8°C) w przypadku JN oraz znaczący wzrost (o ok. 21°C) w przypadku UN. Wyniki te zostały potwierdzone oraz rozszerzone o badania nad VMN (AeroNeb Lab, MicroNeb oraz e-Flow Rapid) przez Sosnowskiego i Żołądkowicz⁽²²⁴⁾. Autorzy ci stwierdzili, że podczas atomizacji z użyciem wybranych VMN dochodzi do jedynie nieznacznego wzrostu temperatury emitowanej cieczy, co powinno sprzyjać stabilności fizykochemicznej rozpraszanych farmaceutyków.

Kolejny czynnik, który może wpływać na efektywność depozycji wdychanych kropeł w płucach jest związany ze sposobem użytkowania nebulizatora, w tym jego orientacji względem jamy ustnej pacjenta. Analogicznie do wyników otrzymanych dla inhalatorów proszkowych, w przypadku trzymania ustnika nebulizatora pod pewnym kątem w stosunku do ust może dojść do skierowania strumienia mgły na język i zauważalnej depozycji leku w tej części jamy ustnej lub na podniebieniu i tylnej ścianie gardła^(225–227).

Konstrukcja i sposób działania nebulizatora determinuje również w pewnym stopniu obszar jego zastosowania, tzn. przydatność do rozpylania określonych rodzajów leków. Jak już wspomniano, podczas pracy nebulizatora ultradźwiękowego dochodzi do podgrzania cieczy atomizowanej, co stawia pod znakiem zapytania podawanie leków termolabilnych tj. zawierających białka, enzymy oraz antybiotyki. Konstrukcja nebulizatorów ultradźwiękowych (klasycznych oraz siateczkowych) również uniemożliwia stosowanie płynów o lepkości

znacznie wyższej niż lepkość wody. Nebulizatory siateczkowe mogą mieć ograniczone zastosowanie w przypadku leków zawieszinowych lub preparatów zawierających duże molekuly jak np. hialuronian sodu ze względu na ryzyko zatykania porów membrany. Z kolei, nebulizator pneumatyczny może okazać się nieodpowiedni w zastosowaniu do niektórych leków, mogących ulec dezaktywacji na skutek naprężeń ścinających występujących (1) podczas fragmentacji cieczy w dyszy dwupłynowej, (2) przy zderzeniu z przegrodą impakcyjną, lub (3) w wyniku recyrkulacji atomizowanego płynu^(6,20,201,228). Naprężenia ścinające w przypadku płynów nieniuonowskich mogą powodować wydłużenie czasu przebywania cieczy w naczyniu, czy też zmieniać ich lepkość^(228,229).

Wartość objętości rezydualnej (RV) tj. objętości cieczy, która nie może zostać rozpylona, zależy głównie od konstrukcji urządzenia. Objętość rezydualna zwykle mieści się w zakresie od 1 do 3 cm³ (JN) lub do 0,5 cm³ (VMN). W przypadku urządzeń pneumatycznych RV zależy od kształtu naczynia i wysokości dyszy oraz, w pewnym zakresie, od parametrów procesu atomizacji. Stwierdzono, że RV maleje wraz ze wzrostem strumienia objętościowego sprężonego gazu oraz rośnie gdy zmniejsza się początkowa objętość cieczy wprowadzonej do pojemnika⁽²³⁰⁾. RV można zminimalizować poprzez zastosowanie stożkowego kształtu naczynia (głowicy), zmniejszeniu powierzchni wewnętrznej nebulizatora oraz poprawę zwilżalności jego ścianek^(214,215).

W przypadku VMN, prowadzi się badania nad wpływem materiału tworzącego membranę w nebulizatorach siateczkowych na jakość aerozolu⁽²³¹⁾. W tym celu testowano dwa rozwiązania konstrukcyjne: membranę ze stali chromoniklowej oraz membranę ze stopu pallad-nikiel. Zauważono, że w wyniku kontaktu metalowej powierzchni z roztworami elektrolitów powstaje, zgodnie z teorią Gouya-Chapmana, podwójna warstwa elektryczna, która jest zależna od stężenia i rodzaju elektrolitu oraz właściwości materiału membrany. Zbadano także wpływ wybranych pokryć membran m.in. glinem, miedzią, złotem oraz polimerem ksylilenowym. W tym przypadku najmniejsze krople uzyskano stosując powłokę polimerową, co może być jednak powiązane także ze zwężeniem średnic otworów membrany, których wielkość od strony ustnika (przykładowe na Rys. 6.4.) mają istotny wpływ na wielkość uwalnianych kropeł⁽²¹⁶⁾.

6.2.2. Wpływ właściwości fizykochemicznych cieczy

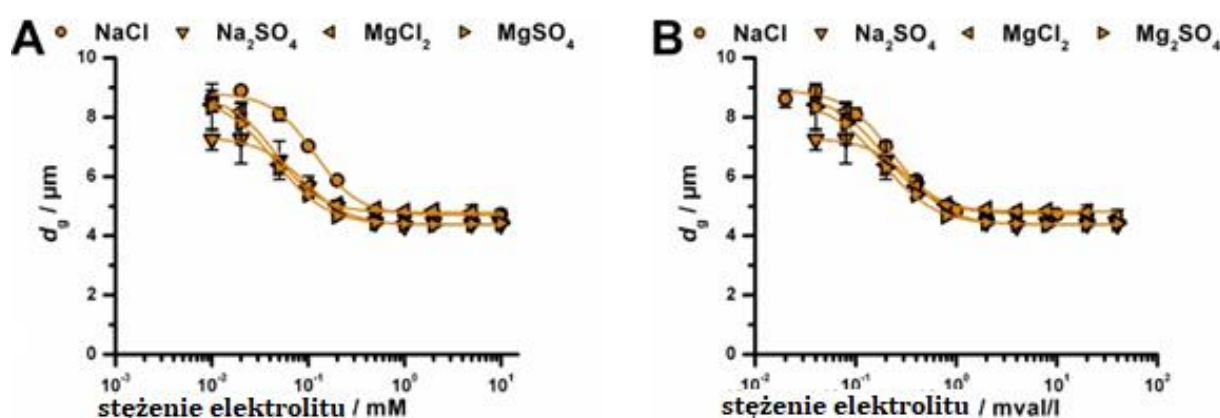
Oprócz konstrukcji urządzenia atomizującego, na właściwości aerozolu wpływają także cechy fizykochemiczne cieczy. Wydaje się praktycznie niemożliwa analiza jednego z tych czynników bez uwzględniania roli drugiego. Dlatego analiza wpływu właściwości fizykochemicznych cieczy zostanie omówiona dla konkretnych typów, a czasem modeli nebulizatorów. W literaturze zwraca się uwagę na trzy właściwości fizykochemiczne cieczy,

mogące wpływać na jakość aerozolu leczniczego: przewodność elektrolityczną, lepkość oraz napięcie powierzchniowe. Wpływ wymienionych parametrów trudno przewidzieć, gdyż rozkład wielkości kropeł uzyskiwany na wyjściu z nebulizatora jest wynikiem działania wielu czynników. Kolejną trudność powoduje zmienność właściwości roztworu w trakcie pracy urządzenia m.in. w wyniku zatężenia na skutek odparowania rozpuszczalnika lub rozdziału (i nierównomiernej emisji) zawiesiny, a także wspomnianych zmian temperatury cieczy wynikającej ze sposobu działania nebulizatora^(206,232).

Przewodność elektrolityczna

Wpływ obecności jonów elektrolitów na jakość aerozolu należy analizować dwutorowo. Po pierwsze, zmiana przewodności elektrolitycznej na skutek obecności leków oraz substancji pomocniczych wpływa na wielkość kropeł uwalnianych z nebulizatorów. Niektóre substancje aktywne np. siarczan salbutamolu, kromoglikan sodowy, czy bromek ipratropiowy występują w postaci dysocjujących soli. W ich przypadku zaobserwowano zmniejszenie wielkości kropeł wraz ze wzrostem stężenia. Wyznaczona zależność miała przebieg sigmoidalny^(231,233). Po drugie, dodatek mocnych elektrolitów wpływa na ładunek powierzchniowy pozostałych składników formułacji leku, a przez to w konsekwencji zmianie ulegają m.in. wartości lepkości i napięcia powierzchniowego. W badaniach⁽²³⁴⁾ poruszono problematykę zależności pomiędzy jakością aerozoli uwalnianych z nebulizatorów siateczkowych (na przykładzie Omron oraz Aeroneb Pro) a właściwościami cieczy wynikającymi z obecności NaCl. Stwierdzono zmniejszanie się wielkości kropeł, a przez to wzrost udziału frakcji kropeł drobnych (FPF) wraz ze wzrostem stężenia mocnego elektrolitu. Jednocześnie, wykazano, że szerokość rozkładu wielkości kropeł wzrastała wraz ze wzrostem stężenia chlorku sodu na czas nebulizacji i wydajność emisji. Nie zauważono wpływu wynikającego z obecności jonów soli. Tłumaczono to wzrostem przewodności elektrolitycznej, prowadzącej do zmniejszenia adhezji roztworu na elementach nebulizatora, w tym porach membrany, a jednocześnie do obniżania ładunku na powierzchni kropeł. Dzięki temu obecność NaCl zwiększa powtarzalność emisji i poprawia parametry aerozolu^(235,236). Prowadząc badania nad urządzeniem AERx⁽²³⁶⁾, cechującym się podobną zasadą działania, co VMN (układ perforowanych dysz, atomizujących ciecz), potwierdzono podobną stabilizację i poprawę właściwości aerozolu inhalacyjnego dzięki NaCl. Drugim wytłumaczeniem obserwowanych zależności jest powiązanie ich występowania z gromadzeniem się anionów chlorkowych przy powierzchni gaz-ciecz oraz kationów sodowych w głębi objętości kropli. Zależność taka została jednak zaobserwowana jedynie dla bardzo stężonych roztworów (6M NaCl)⁽²³⁷⁾.

Poprawę właściwości emitowanego aerozolu w obecności jonów soli potwierdzono w badaniach jakości aerozolu uwalnianego z nebulizatorów pneumatycznych i siateczkowych (na przykładzie: Sidestream i Aeroneb Pro) w zależności od zawartości soli halogenkowych⁽²³⁸⁾. Tutaj również wykazano, że wydajność emisji, udział frakcji kropel drobnych rośnie wraz ze wzrostem stężenia jonów. Stwierdzono silniejszy wpływ przewodności elektrolitycznej na działanie nebulizatora VMN niż JN. W przypadku JN powiązano to z wpływem jonów na napięcie powierzchniowe, które zmienia wielkość kropel, a w przypadku VMN – z powstaniem różnicy potencjałów elektrycznych indukowanej w wyniku przepływu cieczy przez perforowaną membranę (pory). Wpływ na atomizację w VMN ma różnica potencjałów elektrycznych, wynikająca z formowania się podwójnej warstwy elektrycznej przy membranie. Niskie stężenia jonów nie pozwalają na utworzenie warstwy ładunków wpływającej na bezpośredni kontakt cieczy z membraną. Fragmentacja cieczy jest więc w tym przypadku utrudniona, co sprzyja powstawaniu większych kropel. Dopiero przy wyższych stężeniach jonów następuje kompensacja różnicy potencjałów na powierzchni membrany, co skutkuje generacją mniejszych kropel. Aniony jodkowe charakteryzowały się największym stężeniem na powierzchni międzyfazowej ciecz-membrana, a fluorki dużo mniejszym. W dostępnych źródłach przeanalizowano również różnice pomiędzy elektrolitami mocnymi (NaCl) a słabymi (octan sodu) i ich wpływ na wielkość kropel uzyskiwanych w VMN (Aeroneb Pro i eFlow rapid). Spadek rozmiarów kropel, wynikających ze wzrostu przewodności był wyraźniejszy w przypadku mocniejszego elektrolitu⁽⁵⁶⁾.



Rys. 6.9. Średnia średnica kropel (d_g) aerozoli emitowanych przez nebulizator VMN eFlow® rapid przy rozpylaniu wodnych roztworów NaCl, Na_2SO_4 , MgCl_2 i Mg_2SO_4 w funkcji ich stężenia (A) oraz stężenia elektrolitu w przeliczeniu na wartościowości stechiometryczne (B)⁽²³¹⁾

W pracy⁽²³¹⁾ badano wpływ rodzaju elektrolitu na charakterystykę aerozolu uwalnianego z nebulizatora siateczkowego (eFlow rapid). Potwierdzono wpływ elektrolitów na zmniejszenie średnic kropel. Zależność ta pokazuje, że uzyskanie takiego samego obniżenia rozmiarów kropel wymaga zastosowania mniejszych stężeń takich soli jak Na_2SO_4 , MgCl_2 czy Mg_2SO_4

niż NaCl (Rys. 6.9). Autorzy podając wyjaśnienie uzyskanych wyników podkreślili znaczenie zjawiska koalescencji, które może dodatkowo wpływać na wielkość kropeł uwalnianych z nebulizatora. Ponieważ stężenie i rozkład ładunku w populacji kropeł aerozolu mają znaczący wpływ na przebieg koalescencji, stąd podwyższona zawartość elektrolitu może jej przeciwdziałać (poprzez elektrostatyczne odpychanie)⁽²³⁷⁾. Praca Beck-Broichsittera⁽²³¹⁾ pokazała także wpływ typu rozpuszczalnika (wodnego lub organicznego - N,N-dimetyloformamidu) na przebieg procesu atomizacji w nebulizatorach siateczkowych. Porównano przebieg zmian wielkości kropli wraz ze wzrostem stężenia elektrolitu (chlorek litu), który był zastosowany jako dodatek do rozpylanych roztworów. Znacznie większe krople uzyskano w przypadku rozpuszczalnika organicznego, a zmiany te wynikały głównie z różnic w takich właściwościach fizykochemicznych jak: lepkość i napięcie powierzchniowe.

Lepkość dynamiczna

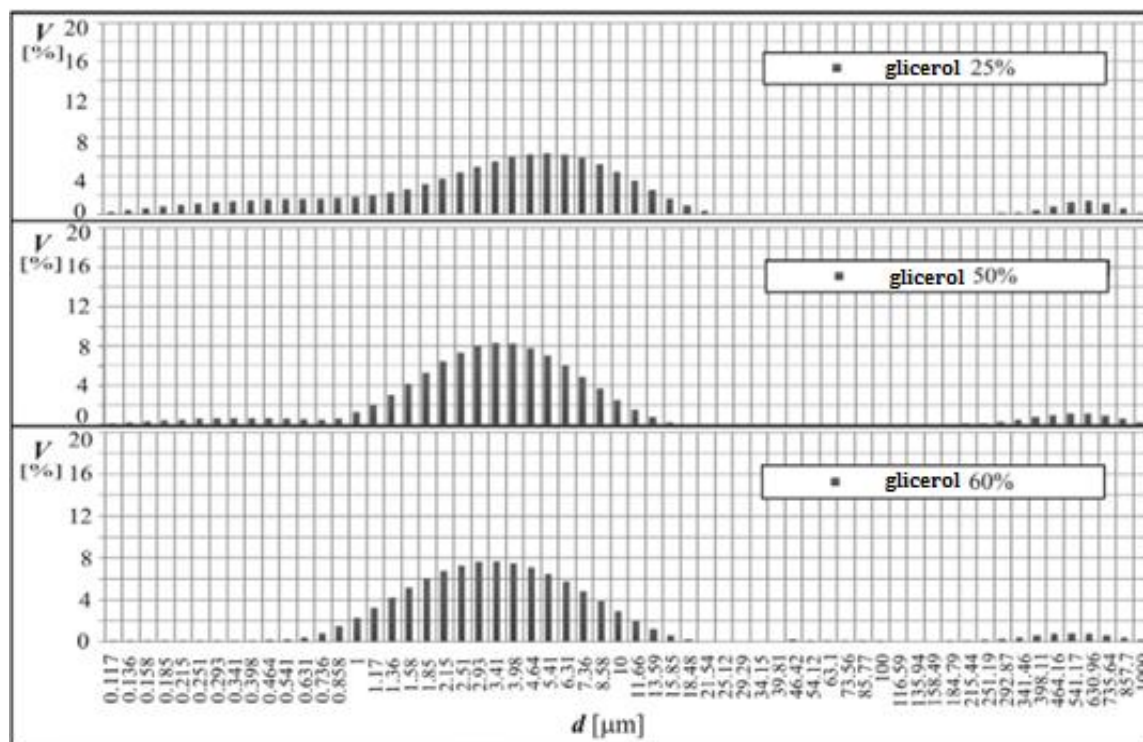
W wielu przypadkach wzrost stężenia substancji rozpuszczonej powoduje wzrost lepkości dynamicznej, co sprawia, że rośnie energia potrzebna do fragmentacji cieczy. Skutkuje to obniżeniem wydajności nebulizacji. Natomiast wpływ lepkości na rozkład wielkości kropeł jest zależny od typu nebulizatora. Należy również pamiętać, że lepkość dynamiczna jest cechą zależną od temperatury, która się zmienia w różny sposób w trakcie przebiegu procesu nebulizacji w nebulizatorach pneumatycznych i w nebulizatorach ultradźwiękowych, wpływając tym samym na emisję aerozolu.

W pracy⁽⁵⁵⁾ na przykładzie glicerolu i glikolu propylenowego stwierdzono, że wraz ze wzrostem lepkości cieczy średnica odpowiadająca medianie masowego rozkładu emitowanych kropeł malała w przypadku testowanych nebulizatorów pneumatycznych (Pari LC, Sidestream i Cirrus), a wzrastała przy użyciu ultradźwiękowych (Medix Electronic i Easimist). Z kolei w pracy⁽¹⁹⁰⁾ zastosowano substancję modyfikującą lepkość, ale niezmieniającą napięcia powierzchniowego – sacharozę. Zaobserwowano tutaj inną zależność, co tłumaczono konstrukcją urządzenia. Nebulizatory pneumatyczne (Pari LC oraz Medix A II) ogólnie cechowały się emisją kropeł mniejszych niż nebulizator ultradźwiękowy, ale o większym stopniu polidispersyjności. Średnice kropeł generowanych w JN malały wraz ze wzrostem lepkości. Ten efekt obserwowano aż do wartości lepkości 6 cP (tj. ok. 6 mPas), po przekroczeniu której następował wzrost średnic kropeł. Natomiast w UN (Medix Electronic) odnotowano wzrost rozmiarów uwalnianych kropeł postępujący wraz ze wzrostem lepkości cieczy rozpylanej. Dla cieczy o lepkości powyżej 6 cP nie można było wyemitować aerozolu.

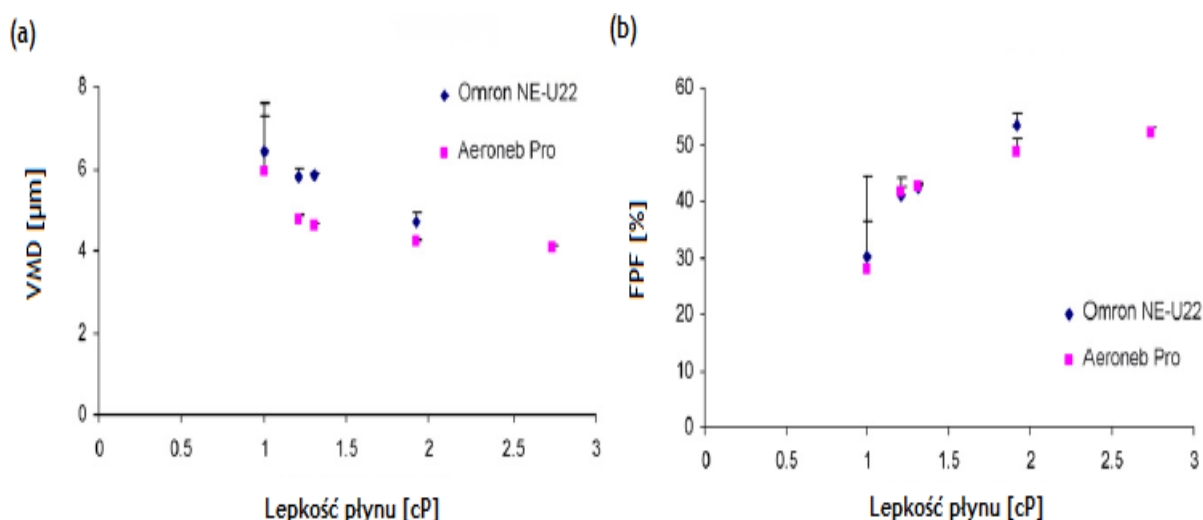
Obserwowane w obu pracach tendencje nie znalazły potwierdzenia w badaniach⁽²³⁹⁾. Zauważono tutaj, że nebulizatory pneumatyczne generują chmury aerozolowe o coraz

większych średnicach kropeł i wzrastającej szerokości rozkładu wraz ze wzrostem lepkości dynamicznej. Z kolei, nebulizatory ultradźwiękowe w podobnych warunkach emitują chmury aerozolowe o coraz mniejszych średnicach kropeł. Badania nad wpływem właściwości reologicznych płynów niutonowskich (Rys. 6.10) i nieniuonowskich (ze szczególnym uwzględnieniem cieczy dylatancyjnych) na emisję aerozolu w nebulizatorze ultradźwiękowym kontynuowano w pracy⁽⁵⁷⁾. Również w tym przypadku zauważono silną zależność pomiędzy właściwościami reologicznymi a wielkością emitowanych kropeł.

Roztwory sacharozy stanowiły również model w badaniach⁽²⁴⁰⁾, natomiast gliceryny w pracy⁽⁵⁶⁾. W obydwu przypadkach analizowano wpływ lepkości cieczy na proces atomizacji prowadzony w nebulizatorach siateczkowych (Aeroneb Pro i eFlow rapid). Wykazano tutaj, że rozmiar kropeł zmniejsza się wraz ze wzrostem lepkości dynamicznej. Podobne wnioski nad wpływem lepkości na charakterystykę aerozolu uwalnianego z nebulizatorów VMN przedstawiono w pracy⁽²³⁴⁾. W trakcie atomizacji wodnych roztworów glicerolu badaniu poddano nebulizatory o konstrukcji pasywnej, jak i aktywnej (odpowiednio: Omron MicroAir NE-U22 i Aeroneb Pro). Również w tym przypadku odnotowano wzrost udziału frakcji kropeł drobnych wraz ze wzrostem lepkości cieczy (Rys. 6.11b). Zauważono również, że istnieje graniczna wartość lepkości, po przekroczeniu której urządzenia nie rozpylają cieczy. Odnotowana w tym przypadku wartość jest niższa niż ta określona przez McCalliona i Patela w przypadku nebulizatorów ultradźwiękowych⁽¹⁹⁰⁾.



Rys. 6.10. Rozkłady objętościowe wielkości kropeł dla atomizacji wodnych roztworów glicerolu⁽²³⁹⁾



Rys. 6.11 Zależność (a) VMD (b) FPF od lepkości roztworów wodnych glicerolu (0, 5, 10, 20 i 30% v/v) aerozolu generowanego za pomocą nebulizatorów OmronMicroAir NE-U22 i Aeroneb Pro⁽²³⁴⁾

Napięcie powierzchniowe

Obecność w rozpylanej cieczy substancji wykazujących aktywność powierzchniową jest przyczyną obniżenia napięcia powierzchniowego definiowanego względem czystej wody. Molekuły surfaktantu gromadzą się na granicy faz powietrze-rozpylana ciecz, a w przypadku zawiesin, także na granicy międzyfazowej ciecz-ciało stałe (API). Po utworzeniu kropli są one obecne na jej powierzchni. Powyżej pewnego stężenia zwanego krytycznym stężeniem micelizacji, gdy dochodzi do nasycenia powierzchni międzyfazowej, nadmiar molekuł związku powierzchniowo czynnego tworzy skupiska wewnątrz cieczy o charakterystycznej budowie i orientacji cząsteczek, zwane micelami⁽²⁴¹⁾.

Napięcie powierzchniowe będące miarą energii potrzebnej do zwiększenia powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz w procesie atomizacji, zależy od temperatury. Jak stwierdzono wcześniej, podczas atomizacji cieczy prowadzonej w nebulizatorach pneumatycznych dochodzi do obniżenia temperatury, w przypadku nebulizatorów ultradźwiękowych dochodzi do jej podwyższenia, a nebulizatory pracujące w oparciu o technologię wibrującej membrany powodują tylko małe zmiany temperatury rozpylanej cieczy⁽²²⁴⁾. Ewentualne zmiany temperatury towarzyszące procesowi nebulizacji mogą więc, wpływać na wielkość napięcia powierzchniowego. Innym ważnym czynnikiem, który należy wziąć pod uwagę, są dynamiczne warunki panujące we wnętrzu komory nebulizatora, które uniemożliwiają uzyskanie równowagowych wartości napięcia powierzchniowego cieczy zawierającej związek powierzchniowo czynny. Stąd, ocena bezpośredniego wpływu napięcia powierzchniowego na charakterystykę aerozolu jest trudna. Związek pomiędzy napięciem powierzchniowym a właściwościami chmury aerozolowej był analizowany m.in. w pomiarach z laurylosiarczanem sodu, Tweenem 20 i Tweenem 80 w nebulizatorach pneumatycznych (Pari

LC, Sidestream i Cirrus) oraz ultradźwiękowym (Medix Electronic) przez McCallion i wsp.⁽²⁴²⁾. Badacze ci zauważyli, że krople emitowane z nebulizatora pneumatycznego Pari LC są tym większe, im niższym napięciem powierzchniowym cechuje się ciecz rozpylana. Z kolei, w przypadku urządzeń Cirrus i Sidestream średnice kropeł początkowo rosły, a następnie malały ze wzrostem σ . Najmniejszymi rozmiarami kropeł cechował się aerozol wyemitowany przez rozpylenie wody (największe napięcie powierzchniowe). We wcześniejszej pracy zespół McCallion i wsp.⁽⁵⁵⁾ wykazał dominującą rolę lepkości nad napięciem powierzchniowym jako czynników wpływających na rozmiar emitowanych kropeł.

Ocenę wpływu obniżonego napięcia powierzchniowego na wielkość kropeł uwalnianych z atomizerów ultradźwiękowych przedstawili Rajan i Pandit⁽²⁴³⁾. Na przykładzie użycia laurylosiarczanu sodu, pokazano złożoność zależności napięcia powierzchniowego i lepkości jako czynników wpływających na efekt końcowy procesu atomizacji cieczy. Otrzymane wyniki pokazały, że spadkowi napięcia powierzchniowego, aż do osiągnięcia krytycznego stężenia micelizacji towarzyszy zmniejszenie rozmiarów kropeł, a po przekroczeniu wartości tego stężenia dominującą właściwością determinującą wielkość kropeł staje się lepkość dynamiczna. Spadek lepkości powodował obniżenie wartości średnic kropeł aerozolu. Analizę związku pomiędzy napięciem powierzchniowym a wielkością kropeł uwalnianych z nebulizatora siateczkowego o konstrukcji pasywnej (Omron MicroAir) oraz aktywnej (Aeroneb Pro) przeprowadził także zespół Ghazanfariego⁽²³⁴⁾. W tym przypadku zauważono wzrost wydajności, a więc i skrócenie czasu nebulizacji, przy obniżonym napięciu powierzchniowym w obecności etanolu niezależnie od zasady działania nebulizatora (konstrukcji). Przy niskich wartościach lepkości dynamicznej to siły napięcia powierzchniowego zaczynają być dominujące dla we wzroście wielkości kropeł, a tym samym wzrostu mediany rozkładu objętościowego oraz spadku udziału frakcji kropeł drobnych. Wzrost wydajności nebulizacji postępujący wraz ze spadkiem wartości napięcia powierzchniowego zaobserwowano także w innych pracach np. Coatesa i wsp.⁽²⁴⁴⁾.

Właściwości fizykochemiczne takie jak napięcie powierzchniowe i lepkość dynamiczna ulegają zmianom podczas trwania procesu nebulizacji (ze względu na zmianę temperatury i stężenia roztworu czy zawiesiny). W konsekwencji, utrudnione jest określenie prostych zależności między jedną właściwością a charakterystyką aerozolu bez uwzględnienia drugiej. Generalnie wzrost wartości napięcia powierzchniowego i lepkości dynamicznej zawsze zwiększa zapotrzebowanie na energię, która prowadzi do rozpadu cieczy⁽²⁴⁵⁾. Zgodnie z teorią atomizacji, wraz ze wzrostem napięcia powierzchniowego, lepkości oraz przewodność elektrolitycznej przewidywany jest wzrost średnic uwalnianych kropeł. Natomiast, jak

pokazano w tym podrozdziale oczekiwane tendencje nie są spełnione w nebulizatorach medycznych. Fakt ten może wynikać z tego, że w przypadku nebulizatorów, z wyjątkiem VMN, nebulizator opuszcza aerozol wtórny.

Inne właściwości cieczy rozpylanej

Analizując inne czynniki wpływające na cechy aerozolu, pochodzące z właściwości cieczy, należy rozważyć również rozpuszczalność substancji leczniczej (API), a więc różnice pomiędzy procesami atomizacji roztworów i zawiesin. W pracy⁽²⁴⁶⁾ porównano przebieg procesu atomizacji zawiesin biodegradowalnych nanocząstek polimerowych w nebulizatorze pneumatycznym (Pari LC Star) i urządzeniach ultradźwiękowych (Pulmosonic i Omron U1). Analiza atomizacji układów zdyspergowanych, jak podkreślają autorzy, jest złożonym procesem, który w porównaniu do rozpylania roztworów jest mniej wydajny i jednocześnie ograniczony przez małą liczbę urządzeń, w których można go przeprowadzić. Badacze nie stwierdzili znacznego wpływu nanocząstek o małych średnicach na rozmiary emitowanych kropeł, jednakże zaobserwowali wpływ sposobu działania nebulizatora pneumatycznego na zmianę właściwości cieczy rozpylanej. Podczas pracy urządzenia doszło do częściowego odparowania rozpuszczalnika, a następnie do wzmożonej agregacji cząstek. Z kolei, praca⁽²¹⁰⁾ koncentrowała się wokół analizy procesu atomizacji mikrosfer lateksowych przy użyciu JN, UN i VMN. Atomizacji poddano zawiesiny różniące się wielkością cząstek zawieszonych. Wydajność emisji zawiesin była niezależna od wielkości mikrosfer w przypadku JN, a w przypadku UN i VMN wzrastała wraz ze wzrostem średnic cząstek zawieszonych. Analiza rozpylonej frakcji aerozolu ujawniła, że w przypadku UN nie doszło do emisji mikrosfer, a w VMN doszło ich deagregacji, a następnie samorzutnej agregacji.

6.2.3. Wpływ warunków otoczenia

Zanim krople z farmaceutykiem rozproszone w fazie gazowej dotrą do płuc pacjenta podlegają działaniu czynników zewnętrznych, zależących m.in. od temperatury oraz wilgotności powietrza otaczającego, w których wykonywana jest inhalacja. Aerozol wytworzony w nebulizatorze kontaktuje się z otoczeniem w ustniku, w momencie zaciągania przez pacjenta dodatkowej porcji powietrza rozcieńczającego. Następnie, rozcieńczony aerozol jest wprowadzany do środowiska dróg oddechowych, w których panuje wyższa temperatura (fizjologiczna) i wilgotność odpowiadająca warunkom nasycenia.

W zależności od wartości parametrów otoczenia, wielkość kropeł może ulegać zmianie w wyniku odparowania, kondensacji pary lub koalescencji przy kontakcie z powietrzem zaciąganim przy wdechu. Jak wspomniano wcześniej, zewnętrzna warstwa okalająca główny strumień aerozolu cechuje się mniejszą prędkością. Zaciągane powietrze z otoczenia kontaktuje

się ze strumieniem i zachodzi intensywna wymiana masy, co potwierdzono m.in. w analizie matematycznej i modelowaniu komputerowym^(218,221). Na skutek parowania dochodzi do zmniejszenia rozmiarów średnic kropeł, co przekłada się na zmniejszenie mediany aerodynamicznego rozkładu masowego (MMAD) (patrz podrozdział 6.3.4). Duże prędkości powietrza rozcieńczającego wpływają jednak także na skrócenie czasu przebywania aerozolu w ustniku, co może zmniejszać możliwość spadku MMAD (krótki czas przelotu aerozolu w ustniku powoduje tylko częściowe odparowanie kropli i zmniejszeniu ich średnic). W pewnych warunkach może dojść do całkowitego odparowania najdrobniejszych kropeł, co spowoduje wzrost MMAD⁽²¹⁸⁾ (Tab. 6.1.). Po opuszczeniu ustnika krople są wprowadzane do układu oddechowego tj. środowiska o podwyższonej temperaturze i wilgotności⁽⁵⁴⁾.

Również Phipps i Gonda⁽²⁴⁷⁾ badali wpływ warunków otoczenia na jakość aerozolu. Zauważyli oni, że różnica temperatur między wyemitowanym aerozolem z nebulizatorów pneumatycznych (Cadema i Up-Draft) a środowiskiem przyczynia się do wzrostu stężenia farmaceutyku w kroplach mgły za co odpowiada odparowanie. Z kolei w nebulizatorze ultradźwiękowym (Mist-O₂-Gen) nie odnotowano widocznego wpływu różnicy temperatur na stężenie leku w wyemitowanej mgle. Najprawdopodobniej wynika to z faktu, że aerozol generowany w urządzeniach ultradźwiękowych cechuje się większą wydajnością i większymi rozmiarami kropeł. Sprawia to, że podczas kontaktu aerozolu z powietrzem rozcieńczającym odparowanie wody z kropeł w małym stopniu wpływa na stężenie leku rozpraszanego.

Tab. 6.1. Zmiana średnicy kropli o początkowej średnicy 7 μm na wylocie z ustnika nebulizatora przy zadanym czasie przebywania aerozolu w ustniku⁽²¹⁸⁾

Temperatura powietrza rozcieńczającego (K)	Wilgotność względna powietrza rozcieńczającego		
	0%	20%	40%
	Średnica kropli (μm)		
288	5,52	5,88	6,20
298	4,63	5,27	5,82
308	3,77	4,65	5,45

6.3. Wymagania dotyczące systemu lek-nebulizator

Ocena produktów inhalacyjnych jest ważnym etapem zarówno podczas projektowania nowych nebulizatorów, rozwoju dotychczasowych konstrukcji, czy w procesie kontroli jakości. Ocenie podlegają takie wielkości jak: wydajność masowa emisji z nebulizatora, objętość rezydualna oraz rozkład wielkości kropeł. Ma to na celu sprawdzenie poprawności działania systemu lek-nebulizator oraz powtarzalności dawki dostarczonej. Zasady oceny tych parametrów oraz właściwości aerozolu inhalacyjnego są znormalizowane, a wytyczne zostały opublikowane w Farmakopei Europejskiej⁽²⁴⁸⁾ oraz ujęte w normie PN EN-13544-1.

6.3.1. Wybrane aspekty oceny poprawności działania systemu lek-nebulizator

W zakresie badań nebulizatorów normy przewidują wykazanie analiz dotyczących dawki emitowanej (dawki dostarczonej), tzw. dawki wziewalnej oraz udziału frakcji kropel drobnych. W tym przypadku sformułowanie „dawka” odnosi się do masy substancji aktywnej z pominięciem substancji pomocniczych⁽²⁴⁸⁾. Ma to istotne konsekwencje w przypadku ciekłych dyspersji, gdzie podczas rozpylania może dojść do sytuacji, w której mikrocząstki API nie będą obecne równomiernie w każdej kropli rozpylanej mgły. Ze względu na polidispersyjność aerozoli leczniczych oraz na średnicę cząstek API, w nebulizatorze mogą powstać bardzo małe krople (submikronowe) pozbawione substancji aktywnej leku⁽²⁴⁹⁾.

Kolejnym istotnym aspektem jest ograniczenie weryfikacji poprawności działania systemu lek-nebulizator do badań rozpylania cieczy modelowych zawierających jedynie mocne elektrolity tj. NaCl oraz NaF (wg normy ISO)⁽²⁵⁰⁾. Takie uproszczenie omija możliwość sprawdzenia wpływu właściwości fizykochemicznych na wydajność aerozolu i rozkład wielkości kropel emitowanych z urządzenia medycznego. Jest to szczególnie istotne w przypadku farmaceutyków w postaci zawiesin cząstek API, których formuła zawiera związki aktywne powierzchniowo.

Następnym zagadnieniem dotyczącym systemu lek-nebulizator jest kwestia farmaceutyków, które zostały dopuszczone do użytku na podstawie badania ich emisji z konkretnego typu nebulizatora. Dotyczy to głównie produktów farmaceutycznych, które są na rynku od minimum 15 lat. Jak wspomniano w podrozdziale 6.1.2.2, z początkiem XXI w. na rynek zostały wprowadzone nowe typy nebulizatorów m.in. nebulizatory z wibrującą membraną (pierwszy Omron w 1993 r.). Jeszcze 10 lat temu, nebulizatory pneumatyczne były nadal dominującymi na rynku sprzedażowym (ok. 73%). Stąd dopuszczone do użytku leki były rozwijane i badane z myślą o zastosowaniu w układzie z JN. Taka tendencja mogła wynikać z powolnego wzrostu udziału urządzeń nowej generacji w sprzedaży oraz preferencji użytkowników. Obecnie, obserwuje się ogromny wzrost popularności VMN wśród pacjentów. Branża farmaceutyczna odpowiada na zmiany dotychczasowej tendencji, co wiąże się również ze zmianami preferencji w badaniach systemu farmaceutyk-nebulizator. Leki inhalacyjne do nebulizacji, nad których rozwojem obecnie toczą się badania, są przygotowywane także do stosowania z VMN, co potwierdza wzrost udziału rejestracji badań klinicznych z nebulizatorami typu VMN⁽²¹¹⁾. Jednakże leki już dopuszczone do sprzedaży na podstawie weryfikacji z JN, mogą nie być dostosowane do nowych urządzeń. Przykładowo budesonid (obecny w sprzedaży z końcem lat 90-tych) został dopuszczony na podstawie badań z Pari-LC-Jet Plus Nebulizer oraz z kompresorem Pari Master i wg zaleceń FDA należy go stosować

jedynie z JN⁽²⁵¹⁾. Kolejnym istotnym zagadnieniem dotyczącym zarówno poprawności działania systemu lek-nebulizator, jak i powtarzalności dawki dostarczonej jest powiązanie danych otrzymanych z badań laboratoryjnych z efektami klinicznymi, tzw. porównanie *in vitro/in vivo* (IVVC)⁽¹²¹⁾. W tym obszarze porusza się stosowanie pewnych uproszczeń przy badaniach laboratoryjnych, co zostało szczegółowo wyjaśnione w podrozdziale 6.3.3 w ocenie dawki dostarczonej do płuc. Uproszczenia wynikające z kalkulacji zdeponowanej masy API wynikają z pomijania m.in. czynników zależnych od pacjenta tj. sposobu użytkowania (oddychania) oraz różnic w morfologii płuc⁽²¹¹⁾.

6.3.2. Wymagania stawiane aerozolom terapeutycznym

Dużą wagę przykładą się również do oceny powtarzalności dawki, co oznacza, że (i) podczas użytkowania nebulizatora przy postępującym zużyciu sprzętu zagwarantowane są te same parametry powstawania aerozolu oraz (ii) urządzenia medyczne między sobą nie wykazują różnic (brak zmian pomiędzy partiami produktu)⁽²⁴⁸⁾. Weryfikacja tych parametrów jest możliwa dzięki przyjęciu określonych założeń dotyczących jakości aerozolu i tym samym zastosowania kryteriów oceny parametrów chmury aerozolowej. Metodyka wyznaczania oraz szersza definicja tych parametrów została opisana w podrozdziale 6.3.4.

Przyjęto, że farmaceutyki podawane w formie aerozolu drogą inhalacyjną powinny cechować się wysoką homogenicznością, co oznacza, że emitowane krople charakteryzują się tą samą wielkością, jednakową zawartością API i identycznymi właściwościami fizykochemicznymi⁽²⁵²⁾. W zależności od przeznaczenia terapii inhalacyjnej prowadzonej za pomocą nebulizatorów, farmaceutyk powinien deponować się w różnych rejonach układu oddechowego. Większość terapii nebulizacyjnych dotyczy depozycji na powierzchni obwodowych dróg oddechowych, w tym obszarze pęcherzyków płucnych. W tym przypadku istotne jest, aby aerozol zawierał jak najwięcej objętościowo kropel o średnicy poniżej 5 μm (maksymalizacja udziału frakcji kropel drobnych)^(230,253). Jednakże, nebulizacja może być stosowana również do leczenia zapalenia krtani. Wówczas krople leku powinny deponować się w górnych drogach oddechowych, więc aerozol powinien charakteryzować się wysokim udziałem kropel o średnicy 6-8 μm ⁽²⁵⁴⁾. Następnym istotnym parametrem oceny nebulizatora jest wydajność emisji aerozolu. Przyjmuje się, że powinna ona być stała w kolejnych nebulizacjach, aby zachować jednorodność dostarczanej dawki API oraz możliwie jak największa, aby maksymalnie skrócić czas trwania nebulizacji.

6.3.3. Techniki pomiarowe stosowane w ocenie jakości aerozoli inhalacyjnych emitowanych z nebulizatorów

Ta część pracy zostanie poświęcona analizie dedykowanych metod oceny wielkości kropeł uwalnianych z nebulizatorów, a także założeń uproszczających, które rzutują na przewidywaną dawkę zdeponowaną w płucach. Istnieje kilka technik pozwalających na określanie rozkładu wielkości kropeł, przy czym do najczęściej używanych zaliczają się te wykorzystujące siły bezwładnościowe (impaktory) oraz metody optyczne (dyfraktometr laserowy). W przypadku nebulizatorów, do oceny wielkości kropeł wziewnych Farmakopea rekomenduje użycie jednostopniowego impaktora szklanego, wielopoziomowego impaktora cieczowego, impaktora kaskadowego Andersena oraz siedmiostopniowego impaktora nowej generacji (NGI). Na potrzeby niniejszej pracy zostaną omówione tylko wybrane techniki. Działanie urządzenia kaskadowego opiera się na wykorzystaniu różnic w bezwładności cząstek aerozolowych (w przypadku nebulizacji: kropeł), które można powiązać z ich masą oraz rozmiarami. Aparat ma budowę wielostopniową, przy czym jego konfiguracja może być zarówno pozioma, jak i pionowa. Aerosol wprowadzany jest na każdy stopień poprzez zespół otworów, których liczba, jak i średnica (określająca sumaryczny przekrój) zmniejsza się z każdym kolejnym. Na każdym ze stopni następuje gwałtowna zmiana kierunku przepływu i wydzielenie kropeł o wystarczającej bezwładności na specjalnych płytkach (impaktor Andersena) lub w kuwetach (impaktor NGI). Mniejsze unoszą się wraz ze strumieniem i opływają płytki przedzielające stopnie^(21,248). Ze względu na fakt, że strumień wprowadzanego aerozolu ulega stopniowemu przyspieszeniu podczas przepływu przez otwory kolejnych poziomów na kolejnych stopniach wydzielane są krople o coraz mniejszych rozmiarach. Analizę ilościową wydzielonych kropeł przeprowadza się za pomocą chromatografii cieczowej po odmyciu stopni odmierzonymi porcjami rozpuszczalnika.

Badania aerozolu przeprowadza się w warunkach przepływu ustalonego, przyjmując wartość uśrednioną strumienia objętościowego odpowiadającą średniemu przepływowi oddechowemu osoby dorosłej⁽²⁴⁸⁾. W rzeczywistym cyklu oddechowym obserwuje się zmienny przepływ powietrza, charakteryzujący się w przybliżeniu sinusoidalnym przebiegiem. W rzeczywistości więc zmienny charakter przepływu ma znaczenie dla miejsca depozycji kropeł. Nawet odpowiednio małe krople zainhalowane pod koniec fazy wdechu mogą nie osadzić się w płucach, ze względu na małą głębokość penetracji i krótki czas przebywania w układzie oddechowym. Z drugiej strony, warunki nieustalone wpływają na rozkład wielkości kropeł w chmurze aerozolowej m.in. poprzez zmienne warunki odparowania^(51,75,98). Jak już wspomniano, wpływają na to warunki otoczenia (wilgotność powietrza i temperatura) (patrz

podrozdział 6.2.3). Efekty te nie zostały uwzględnione w standardowych metodach pomiarowych aerozoli medycznych.

Wybierając technikę pomiaru wielkości kropeł aerozolowych należy wziąć pod uwagę ograniczenia każdej metody. Urządzenia optyczne (dyfraktometry laserowe) umożliwiają przeprowadzenie szybkiego pomiaru dynamicznego w czasie i rejestrację kropeł tuż na wyjściu z ustnika nebulizatora (podrozdział 9.2.3)⁽²¹⁷⁾. Należy jednak pamiętać, że ta technika nie pozwala na wykrycie API, a jedynie na wyznaczenie średnic kropeł. W kontekście leków w postaci homogenicznych roztworów ma to pomijalne znaczenie, natomiast w przypadku zawiesin lub nadmiernego odparowania cieczy, będącego konsekwencją sposobu działania nebulizatora, może dojść do błędu w obliczaniu dawki zdeponowanej. Z kolei impaktory kaskadowe, przy użyciu odpowiedniej techniki analitycznej, pozwalają scharakteryzować aerozol leczniczy w funkcji średnicy aerodynamicznej kropeł z uwzględnieniem masy API. Dlatego technika ta jest zalecana w Farmakopei Europejskiej. Zastosowanie impaktorów w przypadku badania aerozoli, w których fazę zdyspergowaną tworzy ciecz może jednak nadal wiązać się z błędami, wynikającymi z odparowania rozpuszczalnika, higroskopijności, czy zastosowania przepływu ustalonego. W przypadku impaktorów czas przebywania w warunkach narażających krople na odparowanie jest wydłużony, co może mieć szczególne znaczenie w kontekście analizy wielkości kropeł^(21,248). Dodatkowo, jeżeli wymuszone natężenie przepływu przez impaktor jest wyższe niż to generowane przez nebulizator, następuje ekspozycja kropeł na powietrze rozcieńczające o parametrach zależnych od otoczenia. W efekcie może doprowadzić to do spadku wielkości kropeł w wyniku ich odparowania podczas przepływu przez impaktor. W celu uniknięcia tego zjawiska, schładza się impaktor do 5°C lub stosuje impaktory działające przy niewielkich natężeniach przepływu aerozolu^(255–257). Alternatywą jest zastosowanie optycznych metod wymiarowania, takich jak dopplerowska interferometria fazowa lub dyfrakcja laserowa⁽²⁵⁸⁾.

6.3.4. Kryteria ilościowe oceny aerozolu leczniczego emitowanego z nebulizatorów

Aerozole emitowane z nebulizatorów charakteryzują się polidispersyjnością, co oznacza, że powstające krople różnią się między sobą wielkościami⁽⁷¹⁾. Do oceny dyspersyjności mgieł służą parametry, które bazują na wartościach średnich obliczanych z funkcji rozkładu wielkości średnic kropeł (Rys. 6.12). Przez funkcję rozkładu, określaną mianem gęstości rozkładu wielkości kropeł $f(d_d)$, należy rozumieć liczbę zliczeń kropeł cechujących się wybraną wielkością d_d w odniesieniu do różniczkowej szerokości zakresu rozmiarów, do którego zaszeregowana jest dana kropla. Po scałkowaniu w granicach od 0 do średnicy d_n otrzymuje się funkcję rozkładu skumulowanego (dystrybuantę rozkładu) $F(d_d)$, obrazującą

prawdopodobieństwo, że zmienna d_d występuje z prawdopodobieństwem mniejszym niż dana wartość $\chi^{(21,259)}$. W praktyce, w przypadku aerozoli inhalacyjnych, $f(d_d)$ jest najczęściej przybliżana rozkładem logarytmiczno-normalnym⁽¹⁾.

Obie, funkcje $f(d_d)$ i $F(d_d)$ mogą stanowić rozkłady liczbowe – przedstawione względem liczby zliczeń lub zostać obliczona względem innych parametrów np. masy kropli m_d – rozkłady masowe, czy objętości kropli V_d – rozkłady objętościowe. W przypadku aerozoli leczniczych, najczęściej stosuje się rozkłady masowe, gdyż w ten sposób łatwiej jest określić wartość dawki dostarczonej leku. W związku z nieliniową zależnością objętości, a przez to masy ($m_d = \rho V_d$), od d_d ($V_d = \frac{4}{3}\pi d_d^3$), rozkłady masowe charakteryzują się większym udziałem dużych kropeł^(21,230,253). Uzyskane rozkłady wielkości można charakteryzować przez pewne uśrednione wartości, które są określane mianem parametrów oceny jakościowej i ilościowej aerozolu terapeutycznego⁽²⁶⁰⁾:

- i. Pierwszym z nich jest średnica aerodynamiczna cząstki odpowiadająca medianie rozkładu masowego (**MMAD**) (w przybliżeniu równa **Dv(50)** - medianie rozkładu objętościowego), odpowiadająca średnicy, dla której dystrybuenta wynosi 0,5 i dzieli całkowitą masę aerozolu na połowy (Rys. 6.12.). Stąd MMAD nie reprezentuje wymiaru konkretnej kropli, ale służy do opisu populacji wyemitowanych kropeł^(230,253).
- ii. Drugim istotnym parametrem wyszczególnionym m.in. w Farmakopei⁽²⁴⁸⁾ jest **FPF** – udział cząstek drobnych. W przypadku nebulizacji, służy do określenia masy kropeł należących do frakcji wziewnej, czyli charakteryzującej się wielkościami umożliwiającymi depozycję w dolnych drogach oddechowych (tj. poniżej 5 μm).
- iii. Do oceny polidispersyjności układów aerozolowych stosuje się geometryczne odchylenie standardowe (**GSD**), definiowane jako zależność:

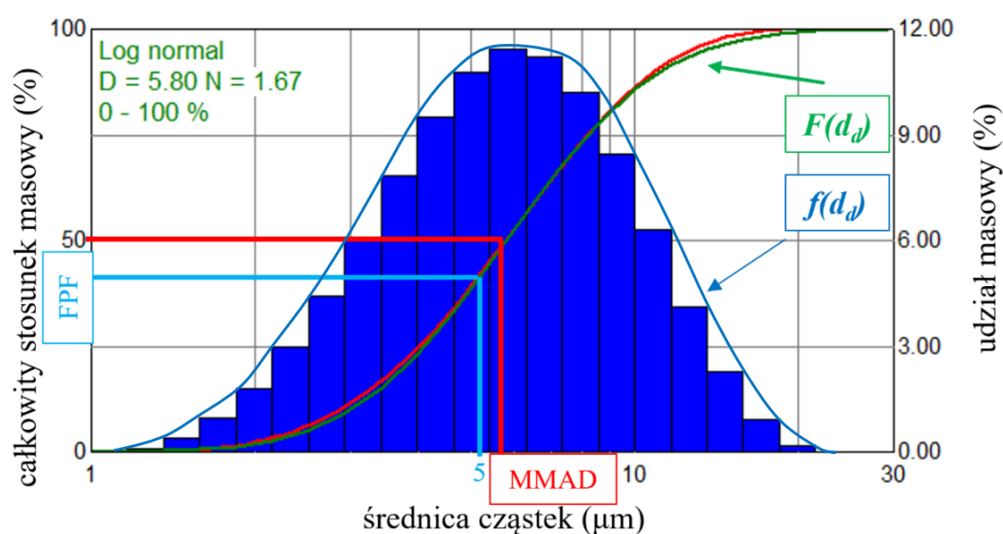
$$GSD = \sqrt{\frac{d_{84,1}}{d_{15,9}}} \quad (6.4.)$$

opartą na wielkościach średnic aerodynamicznych (wielkość umowna odnosząca się do średnicy kuli mającej w określonym ośrodku gazowym taką samą prędkość opadania lub taki sam współczynnik dyfuzji co badana cząstka, przy czym przyjęto jej gęstość 1 g/cm³) odpowiadających wartościom dystrybuenty odpowiednio 0,841 oraz 0,159. Parametr ten można postrzegać jako miarę szerokości rozkładu. Przyjmuje się, że chmura aerozolowa jest monodispersyjna, gdy wartość GSD nie przekracza 1,22⁽²⁶¹⁾. Drugim parametrem statystycznym odzwierciedlającym rozpiętość rozkładu jest SPAN, definiowanym zależnością:

$$SPAN = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (6.5.)$$

gdzie d_{90} , d_{50} i d_{10} są to wartości średnic aerodynamicznych odpowiadających odpowiednim wartościom dystrybuanty 0,9; 0,5 oraz 0,1^(21,260).

Oprócz parametrów bezpośrednio opartych na analizie rozkładów wielkości kropeł w chmurze aerozolowej, nebulizatory można charakteryzować innymi parametrami m.in., takimi jak: wydajność masowa emisji aerozolu, stabilność właściwości aerozolowych, czy wartość objętości rezydualnej (RV).



Rys. 6.12. Przykłady funkcji: gęstości rozkładu wielkości kropeł $f(d_d)$ oraz dystrybuanty rozkładu wielkości kropeł $F(d_d)$

7. Charakterystyka produktów leczniczych i wyrobów medycznych stosowanych w nebulizacji

7.1. Informacje podstawowe

Zgodnie z Prawem Farmaceutycznym wyróżnia się dwa pojęcia odnoszące się do preparatów rozpylanych w nebulizatorach tj. (i) produkty lecznicze (leki), które według definicji prawnej stanowią substancje lub połączenie substancji przeznaczonych do leczenia chorób u ludzi lub zapobiegania tym chorobom oraz (ii) wyroby medyczne, za które uznaje się „narzędzia, przyrządy, urządzenia, oprogramowania, materiały lub inne artykuły, stosowane samodzielnie lub w połączeniu, (...), których zasadnicze zamierzone działanie w ciele lub na ciele ludzkim nie jest osiągnięte w wyniku zastosowania środków farmakologicznych, immunologicznych lub metabolicznych, lecz których działanie może być wspomagane takimi środkami”. Przykładami wyrobów medycznych przeznaczonych do atomizacji w nebulizatorach są *Nebudose* – roztwór inhalacyjny z hialuronianem sodu oraz *Ectodose* – roztwór z ektoiną do inhalacji.

Produkty lecznicze oraz wyroby medyczne przeznaczone do atomizacji w nebulizatorach mogą przybierać postać zarówno roztworów, jak i zawiesin. W każdym z przypadków, oprócz szerokiego zakresu wymogów, którym podlegają wszystkie substancje pomocnicze, związanych m.in. z bezpieczeństwem i zdrowiem pacjenta, z czystością składników, brakiem interakcji z API oraz z walorami organoleptycznymi, są one dodatkowo obarczone dodatkowymi specyficznymi obostrzeniami⁽²⁴⁸⁾. Produkty lecznicze podlegają ocenie jednorodności dawki (jednostek) i masy produktu, jednolitości zawartości oraz właściwości aerodynamicznych, opisanych w podrozdziale 6.3. Przyjmuje się, że preparat leczniczy bez względu na postać powinien cechować się pH od 3 do 10, z tym, że w przypadku farmaceutyków o szybkim działaniu najbardziej pożądanym zakresem pH jest zakres od 7 do 7,5, ze względu na przyspieszoną szybkość wchłaniania. Farmaceutyki są zazwyczaj przechowywane w jednorazowych opakowaniach (ampułkach) lub opakowaniach wielorazowego użytku, które również podlegają znormalizowanym restrykcjom. Kolejną istotną cechą jest zachowanie izotoniczności preparatu. Produkty hipotoniczne są wchłaniane szybciej i wykazują działanie nawilżające, z kolei hipertoniczne sprzyjają odwodnieniu błon śluzowych, ale ulegają powolnej absorpcji.

W inhalacji stosowane są często leki w postaci mieszanek (synergiczne) zawierające minimum dwie substancje aktywne. Ich działanie powinno być skoordynowane i kompatybilnie uzupełniane⁽²⁵²⁾.

7.2. Charakterystyka i podział leków używanych w nebulizacji

Wśród produktów stosowanych w nebulizacji, których przykłady zamieszczono w tabeli 7.1., można wyróżnić leki o lokalnym, jednorowym działaniu oraz leki złożone, których zadaniem jest synergiczne działanie⁽⁴⁹⁾. W przypadku leków o działaniu lokalnym ich pożądanym miejscem depozycji są oskrzela oraz oskrzeliki, natomiast wśród leków o działaniu ogólnoustrojowym dąży się do jak największej dawki zdeponowanej w obrębie pęcherzyków płucnych, gdzie mogą przedostać się do krwioobiegu.

Kolejnym trendem obserwowanym na rynku farmaceutycznym jest obecność leków innowacyjnych oraz generycznych. W realiach polskiego rynku farmaceutycznego już od 2009 r. 85% rynku leków stanowią produkty odtwórcze⁽⁶¹⁾. Leki odtwórcze są to produkty, których formuła bazuje na lekach referencyjnych przez co posiadają m.in. tożsamą kompozycję jakościową i ilościową API, charakteryzują się niezmienną formą (postacią leku), muszą cechować się biorównoważnością potwierdzoną badaniami tj. ten sam stopień i szybkość wchłaniania oraz bezpieczeństwo (wg definicji Europejskiej Agencji Leków⁽²⁶²⁾). Jedyna różnica pomiędzy lekami może wynikać z zastosowania innych substancji pomocniczych lub innych stężeń tych substancji^(61,263). Biorównoważność można ocenić na podstawie (i) badań skuteczności klinicznej tzn. sprawdzających czy produkt wykazuje u pacjentów identyczny mierzony efekt kliniczny, (ii) badań sprawdzających czy lek odtwórczy posiada taką samą farmakokinetkę, co referencyjny mierzony profilem stężenia API we krwi pacjenta oraz (iii) badania *in vitro* uwalniania substancji leczniczej (farmakodynamiczne) w celu sprawdzenia czy generyk charakteryzuje się tożsamymi właściwościami fizykochemicznymi, które przesądzą o uwalnianiu API⁽²⁶²⁾. Typowym testem wymaganym do rejestracji nowego leku generycznego są badania identycznej farmakokinetyki (badania równoważności terapeutycznej), jednakże, ze względu na specyfikę działania leków wziewnych (ich charakter miejscowy) testy te nie mają zasadności (śladowa absorpcja do krwioobiegu). W takim przypadku stosuje się porównawcze badania kliniczne i/lub farmakodynamiczne, polegające na zbadaniu wielkości dawki API i czasu, po którym substancja aktywna jest dostępna w miejscu docelowym leczenia (wg zaleceń FDA⁽²⁶⁴⁾).

Substancje pomocnicze, których rolę opisano szerzej w podrozdziale 7.3, mogą w istotny sposób wpływać na biodostępność API. Przykładowo, związki aktywne powierzchniowo zwiększają przepuszczalność błon biologicznych, a to może powodować występowanie różnic pomiędzy lekiem odtwórczym i innowacyjnym. Weryfikacja ewentualnych różnic podlega odpowiednim regulacjom. W przypadku aerozoloterapii, gdzie substancje pomocnicze mogą

zmieniać właściwości fizykochemiczne formulacji i tym samym wpływać na jakość aerozolu (podrozdział 6.2.2), weryfikacja tego aspektu wydaje się być szczególnie istotna.

Analiza składu przykładowych leków inhalacyjnych

Leki stosowane w nebulizacji (Tab. 7.1.) to typowe płyny niutonowskie o lepkości zbliżonej do lepkości czystej wody i występujące w dwóch formach ciekłych: roztworów np. Ventolin i Atrovent lub zawiesin przygotowanych do inhalacji np. Pulmicort oraz Flixotide. Ogólnie, roztwory do inhalacji zawierają dobrze rozpuszczalne w środowisku wodnym substancje aktywne oraz substancje pomocnicze, które mają zapewnić właściwą izotoniczność leku np. chlorek sodu oraz przedłużony czas przechowywania (tj. wykazujące właściwości konserwujące) np. chlorek benzalkoniowy. Natomiast w przypadku układów dyspersyjnych mamy do czynienia z API w postaci trudno lub nierozpuszczalnej substancji w wodzie. W związku z tym, w samej formulacji obok substancji pomocniczych, które są obecne w roztworach leków, muszą się znaleźć także takie, które będą przeciwdziałać agregacji cząstek API – najczęściej surfaktanty, przykładowo Tween 80. Substancje pomocnicze wykazują się szeregiem cech fizykochemicznych, które zostały poddane dalszej analizie w tej pracy (podrozdział 7.3), jako czynniki decydujące o właściwościach całej formulacji^(249,265).

Tab. 7.1. Skład wybranych leków stosowanych w nebulizacji*

Nazwa komercyjna leku	Grupa leków	Postać	Dawka	Skład
Leki inhalacyjne - roztwory				
Mucosolvan inhalacje (Sanofi-Aventis, Francja)	mukolityk	płyn do inhalacji z nebulizatora	7,5 mg/ml	• <u>substancja aktywna</u>: chlorowodorek ambroksolu • <u>substancje pomocnicze</u>: chlorek sodu, wodorofosforan sodu, kwas cytrynowy jednowodny, chlorek benzalkoniowy, woda oczyszczona
Ventolin (lek oryginalny, GlaxoSmithKline, Wielka Brytania)	β_2 -adrenomimetyk	płyn do inhalacji z nebulizatora	1 mg/ml (0,1%); 2 mg/ml (0,2%);	• <u>substancja aktywna</u>: siarczan salbutamolu • <u>substancje pomocnicze</u>: chlorek sodu, kwas siarkowy 10%, woda oczyszczona
Steri-Neb Salamol (lek generyczny, Teva Pharmaceuticals, Izrael)	β_2 -adrenomimetyk	płyn do inhalacji z nebulizatora	1 mg/ml (0,1%); 2 mg/ml (0,2%);	• <u>substancja aktywna</u>: siarczan salbutamolu • <u>substancje pomocnicze</u>: sodu chlorek, kwas siarkowy rozcieńczony (pH= 3,8-4,2), woda do wstrzykiwań
Atrovent (lek oryginalny, Boehringer Ingelheim International, Niemcy)	po pochodna atropiny	roztwór do nebulizacji	250 µg/ml	• <u>substancja aktywna</u>: bromku ipratropium • <u>substancje pomocnicze</u>: benzalkoniowy chlorek, chlorek sodu, edetynian disodu dwuwodny, kwas solny 1 mol (do ustalenia pH), woda oczyszczona
STERI-NEB IPRATROPIUM (lek generyczny, Teva Pharmaceuticals, Izrael)	po pochodna atropiny	roztwór do nebulizacji	250 µg/ml	• <u>substancja aktywna</u>: bromku ipratropium • <u>substancje pomocnicze</u>: chlorek sodu, kwas solny rozcieńczony (1 mol/l), woda do wstrzykiwań

Nazwa komercyjna leku	Grupa leków	Postać	Dawka	Skład
Leki inhalacyjne - zawiesiny				
Flixotide (lek oryginalny, GlaxoSmithKline, Wielka Brytania)	syntetyczny fluorowany kortykosteroid	zawiesina do nebulizacji	1 mg/ml (2 mg/2 ml), 250 µg/ml (500 µg/2 ml)	• <u>substancja aktywna</u>: propionian flutykazonu (mikronizowany) • <u>substancje pomocnicze</u>: polisorbata 20, laurynian sorbitanu, diwodorofosforan sodu dwuwodny, fosforan disodu bezwodny, chlorek sodu, woda do wstrzykiwań
Flutixon NEB (lek generyczny, Adamed, Polska)	syntetyczny fluorowany kortykosteroid	zawiesina do nebulizacji	1 mg/ml (2 mg/2 ml), 250 µg/ml (500 µg/2 ml)	• <u>substancja aktywna</u>: propionian flutykazonu • <u>substancje pomocnicze</u>: polisorbata 20, laurynian sorbitanu, diwodorofosforan sodu dwuwodny, fosforan sodu dwuzasadowy bezwodny, chlorek sodu, woda do wstrzykiwań
Pulmicort (lek oryginalny, AstraZeneca, Szwecja)	glikokortykosteroid	zawiesina do nebulizacji	0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml	• <u>substancja aktywna</u>: budezonid • <u>substancje pomocnicze</u>: chlorek sodu, cytrynian sodu, edetynian disodu, polisorbata 80, kwas cytrynowy bezwodny, woda oczyszczona
Benodil (lek generyczny, Polpharma, Polska)	glikokortykosteroid	zawiesina do nebulizacji	0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml	• <u>substancja aktywna</u>: budezonid • <u>substancje pomocnicze</u>: chlorek sodu, cytrynian sodu, edetynian disodu, polisorbata 80, kwas cytrynowy bezwodny, woda oczyszczona
Budixon NEB (lek generyczny, Adamed, Polska)	glikokortykosteroid	zawiesina do nebulizacji	0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml	• <u>substancja aktywna</u>: budezonid • <u>substancje pomocnicze</u>: chlorek sodu, cytrynian sodu, edetynian disodu, polisorbata 80, kwas cytrynowy bezwodny, woda oczyszczona

Nazwa komercyjna leku	Grupa leków	Postać	Dawka	Skład
Leki inhalacyjne - zawiesiny				
Nebbud (lek generyczny, Teva Pharmaceuticals, Izrael)	glikokortykosteroid	zawiesina do nebulizacji	0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml	• <u>substancja czynna</u>: budezonid • <u>substancje pomocnicze</u>: chlorek sodu, cytrynian sodu, edetynian disodu dwuwodny, polisorbat 80, kwas cytrynowy jednowodny, woda oczyszczona
BDS N (lek generyczny, GENETIC S.P.A., Włochy)	glikokortykosteroid	zawiesina do nebulizacji	0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml	• <u>substancja czynna</u>: budezonid • <u>substancje pomocnicze</u>: chlorek sodu, cytrynian sodu, edetynian disodu, polisorbat 80, kwas cytrynowy bezwodny, woda oczyszczona
Leki inhalacyjne - zawiesiny				
Berodual (Boehringer Ingelheim International, Niemcy)	lek synergiczny β -mimetyk- pochodna atropiny	roztwór do nebulizacji	(0,5 mg + 0,25 mg)/1 ml	• <u>substancja czynna</u>: 0,5 mg bromowodoru fenoterolu 0,25 mg bromku ipratropium jednowodnego • <u>substancje pomocnicze</u>: benzalkoniowy chlorek, edetynian disodu, chlorek sodu, kwas solny stężony (do ustalenia pH), woda oczyszczona
Iprixon Neb (Adamed, Polska)	lek synergiczny pochodna atropiny- β_2 -adreno-mimetyk	roztwór do nebulizacji	(0,5 mg + 2,5 mg)/2,5 ml	• <u>substancja czynna</u>: 0,5 mg bromku ipratropium jednowodnego i 2,5 mg siarczanu salbutamolu • <u>substancje pomocnicze</u>: chlorek sodu, kwas solny 1 N (do korekty pH), woda do wstrzykiwań

*Informacje w tabeli zostały stworzone na podstawie ulotek dołączonych do leków

7.3. Substancje pomocnicze w produktach inhalacyjnych podawanych z nebulizatorów

Substancje pomocnicze w lekach pełnią istotną rolę: od pośredniczenia w procesie produkcji produktu leczniczego, poprzez poprawę jego stabilności, jako nośnik API, a także rolę wspomagającą działanie farmakologiczne (m.in. poprawa biodostępności) i kontrolowanego uwalniania substancji aktywnej w pożądanym miejscu depozycji. Wg definicji zamieszczonej przez IPEC (z ang. *International Pharmaceutical Excipients Council*) - międzynarodową organizację działającą na rzecz jakości i bezpieczeństwa substancji pomocniczych, substancje te określa się jako inne niż API, które zostały zweryfikowane pod względem bezpieczeństwa i celowo umieszczone w formułacji leku⁽²⁶⁶⁾. Należą do nich substancje reaktywne, które mogą oddziaływać z API, wywołując w ten sposób zaplanowane, pożądane skutki lub mają działanie negatywne, które należy zweryfikować na poziomie projektowania formułacji. Zastosowanie substancji pomocniczych jest regulowane wg przepisów krajowych np. Farmakopea Polska oraz międzynarodowych promowanych przez np. Amerykańską Agencję Leków i Żywności (z ang. *Food and Drug Administration*) czy Europejską Agencję Leków (z ang. *European Medicines Agency*), a wprowadzenie do użytku nowej substancji również podlega regulacjom. Dobór składników formułacji podyktowany jest przez wiele kryteriów związanych m.in. z bezpieczeństwem, normą nałożoną na jakość produktu np. zwiększeniem stabilności API, regulacją szybkości wchłaniania i uwalniania API, czy uzyskaniem trwałej postaci leku oraz walorami estetycznymi^(267,268).

Grupa substancji pomocniczych w lekach inhalacyjnych stosowanych w aerzoloterapii jest bardzo liczna i należą do niej nie tylko substancje pochodzenia naturalnego np. dekstroza, ale również substancje syntetyczne np. Polisorbat 20, chlorek benzalkoniowy. Zastosowane dodatki pełnią zróżnicowane role m.in. stabilizujące formułację lub API, regulujące, konserwujące czy pośredniczą w transporcie wewnątrz organizmu^(269,270). W tabeli 7.2. przedstawiono szereg funkcji na przykładach substancji pomocniczych stosowanych w produktach leczniczych podawanych w formie aerzolu do układu oddechowego. Substancje pomocnicze stanowiąc do 99% całkowitej masy produktu leczniczego⁽⁶⁰⁾ mogą szczególnie w przypadku leków w postaci ciekłej, wpływać w istotny sposób na właściwości fizykochemiczne roztworów lub zawiesin. W przypadku nebulizacji i powstawania aerzolu leczniczego zmiana tych właściwości ma wpływ na efektywność terapii, co zostało szczegółowo opisane w podrozdziale 6.2.2. W tabeli 7.2. wskazano, że właściwości reologiczne, napięcie powierzchniowe oraz przewodność elektrolityczna jest modyfikowana, jednakże należy odnotować, że zakres wpływu zależy od użytych stężeń.

Tab. 7.2. Rola wybranych substancji pomocniczych w lekach inhalacyjnych stosowanych w aerozoloterapii wraz z przykładami i analizą^(269,270)

Typ substancji pomocniczej	Rola substancji pomocniczej w leku	Przykłady stosowanych substancji	Modyfikowana właściwość fizykochemiczna w wodnych
Regulator izotoniczności	zapewnienie izotonii fizjologicznej	chlorek sodu	przewodność elektrolityczna, napięcie powierzchniowe (w
		dekstroza	przewodność elektrolityczna, lepkość (w mniejszym stopniu)
Środek konserwujący (konserwant)	zachowanie sterylności	chlorek benzalkoniowy (BAC)	napięcie powierzchniowe
		etanol	napięcie powierzchniowe,
		glikol propylenowy	lepkość
Regulator pH	zwiększenie stabilności składników leku oraz zapewnienie fizjologicznej wartości pH	wodorotlenek sodu, kwas chlorowodorowy, kwas siarkowy	przewodność elektrolityczna
Regulator kwasowości	zapewnienie stabilności składników leku oraz walorów smakowych	wodorofosforan sodu, kwas cytrynowy	przewodność elektrolityczna
Substancja buforowa	zapewnienie odpowiedniej pojemności buforowej przy wybranej wartości pH	cytrynian sodu, fosforan sodu, wodorofosforan sodu	przewodność elektrolityczna
Nośnik substancji aktywnej	transport substancji aktywnej i zapewnienie kontrolowanego uwalniania w miejscu pożądanego depozycji	laktoza, glukoza	lepkość
Stabilizator	substancja powierzchniowo czynna, przeciwdziałanie agregacji substancji aktywnej i zwiększenie stabilności zawiesin	Polisorbat 20 (Tween 20), Polisorbat 80 (Tween 80), laurynian sorbitanu	napięcie powierzchniowe
Współrozpuszczalnik (z ang. <i>cosolvent</i>)	zwiększenie rozpuszczalności	etanol	napięcie powierzchniowe, lepkość
		glikol propylenowy	lepkość

Tab. 7.2. Rola wybranych substancji pomocniczych w lekach inhalacyjnych stosowanych w aerozoloterapii wraz z przykładami i analizą^(269,270)

Typ substancji pomocniczej	Rola substancji pomocniczej w leku	Przykłady stosowanych	Modyfikowana właściwość fizykochemiczna w wodnych roztworach
Środek nawilżający (humektant)	zapewnienie odpowiedniego nawilżenia formulacji leku	gliceryna	lepkość, napięcie powierzchniowe (w mniejszym stopniu)
Przeciwutleniacz (antyoksydant)	zapobieganie utlenieniu i dezaktywacji substancji aktywnej, wydłużenie	siarczany (IV), kwas cytrynowy	przewodność elektrolityczna
Środek chelatujący (stabilizator)	zwiększenie stabilności i zapobieganie dezaktywacji substancji aktywnej, wydłużenie przydatności	wersenian disodowy (EDTA Na ₂)	przewodność elektrolityczna
Zagęstnik**	zwiększenie lepkości i stabilności zawiesin	karboksymetyloceluloza sodowa (NaCMC)	lepkość

*Zakres zmian właściwości zależy od zastosowanego stężenia.

**Stosowane w lekach donosowych

7.4. Substancje pochodzenia naturalnego o potencjalnym zastosowaniu w nebulizacji

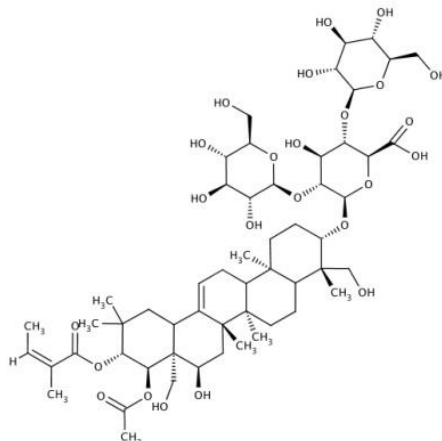
Jak wskazano w podrozdziale 7.3 zastosowanie w formulacji obejmującej lek inhalacyjny nowych substancji pomocniczych podlega regulacjom oraz wieloletnim badaniom m.in. na modelach zwierzęcych oraz klinicznym w celu oszacowania bezpieczeństwa użycia substancji np. biosurfaktantów⁽²⁷⁰⁾. Alternatywnym rozwiązaniem jest użycie sprawdzonych i od dawna wykorzystywanych w przemyśle spożywczym czy kosmetycznym substancji np. polisacharydów pochodzenia naturalnego i przebadanie ich pod kątem możliwego zastosowania w aerozoloterapii. Związki takie są bardzo często kwalifikowane jako generalnie uznawane za bezpieczne: GRAS (z ang. *generally recognised as safe*). Droga ta również wymaga oceny toksyczności, jednakże potencjalna aplikacyjność wspomnianej grupy substancji jest obiecująca.

Obecnie, w formulacjach leczniczych stosuje się substancje wykazujące aktywność powierzchniową pochodzenia syntetycznego, wśród nich znajdują się związki z grupy polisorbatów (np. Tween 20 i Tween 80) czy chlorek benzalkoniowy. Substancje te zostały dopuszczone do zastosowań w produktach spożywczych i farmaceutycznych przez organy odpowiedzialne tj. Agencja Żywnienia i Leków (FDA), Europejska Agencja Leków (EMA) oraz IPEC (z ang. *International Pharmaceutical Excipients Council*), z uwzględnieniem zalecanych stężeń i dawek toksycznych. Pomimo rekomendacji wielu międzynarodowych organizacji, istnieje kilka wątpliwości odnośnie zastosowań tych substancji w lekach inhalacyjnych. Toksyczność substancji pomocniczych jest traktowana jako drugorzędna sprawa w porównaniu do bezpieczeństwa substancji aktywnej. Zauważono, że substancje dodatkowe w formulacji, stanowiące często ponad 80% postaci leku, mogą być rzeczywistym źródłem wewnętrznej niepożądanego reakcji organizmu⁽²⁷¹⁾. Istnieje coraz więcej doniesień o alergicznych odczynach na skutek przyjęcia syntetycznych związków powierzchniowoczynnych^(272–274). Z drugiej strony wprowadzanie tych substancji drogą wziewną łączy się z potencjalnym oddziaływaniem na płyny płucne. Przebieg takich interakcji może być niekorzystny poprzez zmianę fizykochemicznych właściwości m.in. surfaktantu płucnego. Obecnie, stosowanie substancji pomocniczych opiera się na historycznych danych, stąd wciąż pożądanymi badaniami są takie, które dokonują oceny interakcji i potencjalnej toksyczności komponentów leków^(271,275). Dlatego też poszukuje się wciąż potencjalnych zamienników syntetycznych surfaktantów. W ramach niniejszej pracy, na przykładzie L-leucyny, escyny oraz lecytyny sojowej zweryfikowano tezę dotyczącą potencjalnego wykorzystania naturalnych zamienników syntetycznych surfaktantów.

7.4.1. Biosurfaktanty w roli potencjalnych stabilizatorów układów dyspersyjnych

Dzięki swoim właściwościom modyfikującym napięcie powierzchniowe biosurfaktanty jako potencjalne substancje pomocnicze, mogą zastąpić obecnie używane emulgatory oraz stabilizatory emulsji. Ich zadanie opierałoby się na wytworzeniu w obecności związku aktywnego powierzchniowo układów dyspersyjnych umożliwiających wprowadzenie jednej lub kilku wzajemnie niemieszających się lub reagujących ze sobą substancji aktywnych. Układy takie są stosowane w lekach wziewnych w postaci zawiesin sterydów: budezonidu lub flutykazonu. Ogromną zaletą biosurfaktantów jest to, że niewielki ilościowo dodatek może wywołać pożądany efekt i ustabilizować dyspersję substancji aktywnej⁽²⁹⁾. API w postaci nierozpuszczalnych cząstek mają tendencję do sedymentacji i adhezji do powierzchni opakowania (ampułki). Użycie biosurfaktantu, który charakteryzuje się antyadhezyjnymi właściwościami, wynikającymi z właściwości powierzchniowo czynnych, jest obiecującym punktem na korzyść zastosowania modyfikatorów pochodzenia naturalnego.

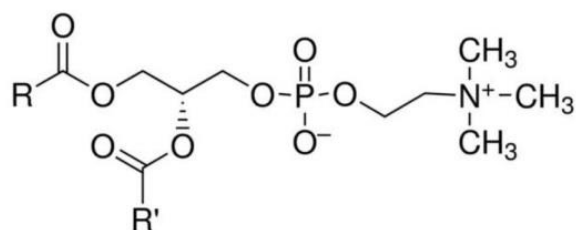
Istotne z punktu widzenia terapii oraz przechowywania produktu farmaceutycznego są naturalne właściwości konserwujące biosurfaktantów – wykazują one działanie bakteriobójcze, przeciwwirusowe oraz antygrzybiczne. Biosurfaktanty lipopeptydowe np. surfaktyna lub wiskozyna charakteryzują się cechami przeciwdrobnoustrojowymi o szerokim spektrum działania, natomiast glikolipidowe tj. ramnolipidy czy soforolipidy wykazują aktywność antywirusową i dodatkowo przeciwnowotworową^(276–279). Oprócz właściwości konserwujących, istotne są ich właściwości stabilizujące przy zmianach temperatury i pH. Można również przypuszczać, że ze względu na naturalne pochodzenie tych związków są one lepiej tolerowane przez organizm, np. L-leucyna stanowi egzogeny aminokwas.



Rys. 7.1. Wzór półstrukturalny cząsteczki escyny

Escyna jest biosurfaktantem z grupy glikozydów o pochodzeniu roślinnym. Chemicznie rozpatruje się dwa rodzaje cząsteczek escyny: α i β , które różnią się m.in. temperaturą topnienia, indeksem hemolitycznym i rozpuszczalnością w wodzie. Molekuły składają się z części

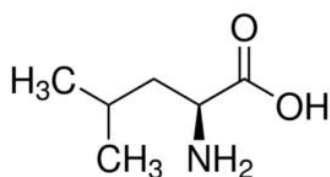
cukrowej, zbudowanej przez trzy cząsteczki cukrów prostych i z niecukrowej tzw. aglikonowej będącej pochodną triterpenową (Rys. 7.1.). Escyna stanowi mieszaninę saponin otrzymywaną z wyciągu z nasion kasztanowca wykazującą właściwości powierzchniowo czynne. Charakteryzuje się silnym działaniem antyoksydacyjnym, przeciwzapalnym i poprawiającym funkcjonowanie żył⁽²⁸⁰⁾.



Rys. 7.2. Wzór półstrukturalny cząsteczki lecytyny sojowej

Lecytyna sojowa to mieszanina glicerofosfolipidów oraz związków nefosfolipidowych pozyskiwana ze źródła roślinnego – nasion soi. Lecytyna to mieszanina związków tj. sfingozylofosfolipidów, triacylogliceroli, kwasów tłuszczowych oraz glikolipidów wykazujących aktywność powierzchniową (Rys. 7.2.). Stosowana jest w przemyśle spożywczym, kosmetycznym oraz farmaceutycznym jako stabilizator dyspersji, emulsji oraz do generacji liposomów. Lecytyna roślinna, w porównaniu do tej pochodzenia zwierzęcego, posiada więcej nienasyconych kwasów tłuszczowych, ma mniejszą zawartość choliny oraz nie zawiera cholesterolu⁽²⁸¹⁾.

L-leucyna to niejonowy aminokwas alifatyczny, egzogeny i o rozgałęzionym łańcuchu otrzymywany w wyniku hydrolizy białek. Jest to związek dobrze rozpuszczalny w wodzie, wykazujący właściwości powierzchniowoczynne. Występuje w dwóch postaciach izomerycznych i obie znalazły zastosowanie w farmacji⁽²⁸²⁾.



Rys. 7.3. Wzór półstrukturalny cząsteczki L-leucyny

7.4.2. Polisacharydowe modyfikatory lepkości

Koncepcja podawania do dróg oddechowych za pomocą nebulizatorów leków wzbogaconych o modyfikatory lepkości cechujące się specjalnymi właściwościami jest możliwa o ile zastosowane rozwiązanie konstrukcyjne urządzenia medycznego pozwalają na rozpraszanie roztworów o wyższej lepkości. Zastosowanie odpowiedniej dawki modyfikatora lepkości może być korzystne z punktu widzenia pacjenta, ze względu na optymalizację przy ich pomocy chmury aerozolowej oraz dodatkowe właściwości m.in. nawilżanie czy

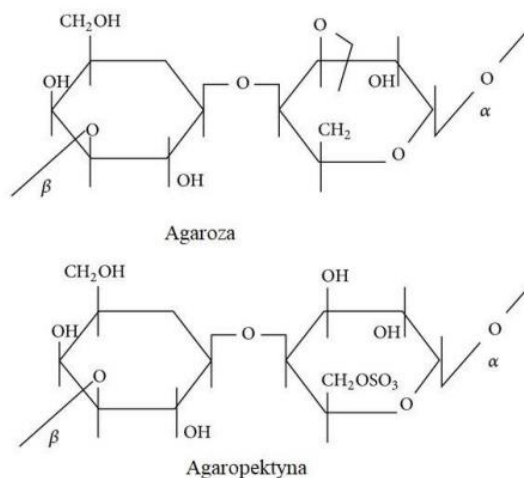
mukoadhezyjność. Fragmentacja cieczy w takim układzie wymaga zewnętrznego wkładu energii, który umożliwi wytworzenie dużych naprężeń ścinających. Warunki takie występują w nebulizatorach zasilanych sprężonym powietrzem^(71,206). Są to zarazem urządzenia wciąż szeroko rozpowszechnione w szpitalach i w użytku domowym, m.in. ze względu na niezawodną konstrukcję^(71,283).

Rozważając potencjalne zastosowanie modyfikatorów lepkości jako substancji pomocniczych, należy wziąć pod uwagę możliwość uzyskania płynów o charakterze nieniutonowskim, które charakteryzują się zmienną lepkością w zależności od szybkości ścinania. Dotychczasowe badania wpływu lepkości na wielkość kropeł emitowanych z nebulizatorów dotyczyły płynów niuonowskich, charakteryzujących się stałą lepkością niezależnie od przyłożonej szybkości ścinania (podrozdział 6.2.2). Właściwości płynów rozrzedzanych ścinaniem mogą mieć inny wpływ na jakość aerozolu niż płyny niuonowskie, dlatego opublikowane wcześniej wyniki badań mogą nie mieć zastosowania w tym przypadku.

W świetle przedstawionych rozważań biopolimery wydają się być szczególnie interesującą grupą spełniającą postawione wymagania. Biopolimery potencjalnie nadające się do zastosowania w aerozoloterapii, poza pewnymi warunkami związanymi z bezpieczeństwem i toksycznością, powinny posiadać również inne cechy m.in. wpływające pozytywnie na funkcjonowanie dróg oddechowych czy też umożliwiające kontrolowanie miejsca depozycji i wchłanianie leku, co w konsekwencji powinno przełożyć się na zwiększenie skuteczności leczenia. Ciekawe przykłady można znaleźć wśród polisacharydów szeroko stosowanych w przemyśle spożywczym. Z tych również powodów częścią tej pracy jest zbadanie możliwości zastosowania wybranych związków z tej grupy, tj. naturalnych polisacharydów w roli modyfikatorów lepkości w formulacjach leków przeznaczonych do leczenia wziewnego z użyciem nebulizatorów. Narzędziem służącym do realizacji tego celu będzie analiza dynamiki procesu atomizacji w nebulizatorach pneumatycznych, a w szczególności wpływu właściwości lepkosprężystych biopolimerów na ten proces.

Pierwszym z proponowanych związków, mogących spełnić powyższe zadanie jest agar (AG). Jest to znany środek stabilizujący, emulgujący i żelujący stosowanym w mikrobiologii, medycynie i przemyśle spożywczym. Został on wybrany do opisywanych badań ze względu na swój potencjał biologiczny, nietoksyczność i właściwości modyfikujące lepkość⁽²⁸⁴⁾. Agar to rozpuszczalny w wodzie (w wysokiej temperaturze) siarczanowany galaktan naturalnie występujący w różnych gatunkach wodorostów czerwonych oraz w ścianach komórkowych roślin. Jest to termoodwracalny biopolimer składającym się z dwóch polisacharydów: molekuł agarozy (araganu) charakteryzującej się liniową budową łańcucha i właściwościami żelującymi

oraz zbudowanej z rozgałęzionych łańcuchów agaropektyn, która jest pozbawiona tych właściwości (Rys. 7.4)⁽²⁸⁵⁾.

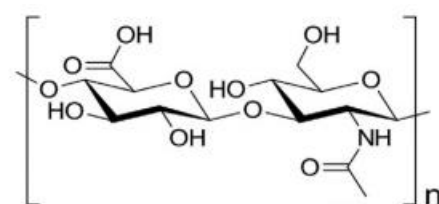


Rys. 7.4. Wzór półstrukturalny cząsteczki agaropektyny i agarazy

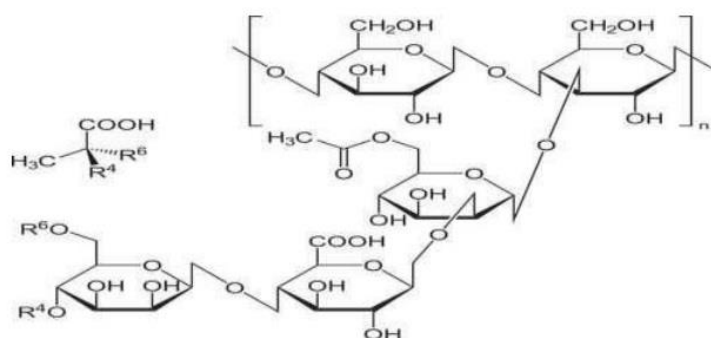
Kwas hialuronowy to nietoksyczny i nieimmunogeny naturalny polisacharyd otrzymywany w wyniku biotechnologicznego procesu opierającego się na mikrobiologicznej (prowadzonej przez bakterie) fermentacji. Stosowany jest zarówno w medycynie, farmacji jak i przemyśle kosmetycznym, zazwyczaj w postaci hialuronianu sodu (SH). Najczęstsze zastosowania obejmują wspomaganie gojenia ran (opatrunki z dodatkiem biopolimeru) czy nawilżanie skóry⁽²⁸⁶⁾. Liczne zalety SH m.in. właściwości biokompatybilne, nawilżające i reologiczne sprawiły, że jest jedną z najczęściej obecnie stosowanych biomakromolekuł w badaniach bioinżynieryjnych⁽²⁸⁷⁾. Cząsteczki tego liniowego biopolimeru (Rys. 7.5) są wszechobecne w tkankach biologicznych, w tym w tkankach człowieka. Szeroki potencjał zastosowań jest konsekwencją jego właściwości fizykochemicznych związanych z budową chemiczną samej molekuly. Składa się ona z regularnie naprzemiennych jednostek disacharydowych kwasu D-glukuronowego i N-acetylo-D-glukozaminy⁽²⁸⁸⁾. Przyjmuje się, że w warunkach fizjologicznych SH występuje w postaci nieuporządkowanej struktury charakteryzującej się pewną sztywnością⁽²⁸⁹⁾. Z kolei, na przestrzenną konformację SH przyjmowaną w roztworze wodnym może wpływać szereg czynników, m.in. siła jonowa, pH itp.⁽²⁹⁰⁾. Może to mieć wpływ na podstawowe właściwości fizykochemiczne roztworów biopolimerów, np. lepkość⁽²⁹¹⁾.

Guma ksantanowa (XG), tak jak wcześniej przedstawione biopolimery jest modyfikatorem lepkości pochodzenia naturalnego cechującym się potencjałem mukoadhezyjnym⁽²⁹²⁾. Jest powszechnie stosowana w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. XG to pozakomórkowy polisacharyd wydzielany przez mikroorganizm, a komercyjnie otrzymywany w procesie biotechnologicznym opartym na fermentacji. Makromolekuły stanowią długołańcuchową

rozgałęzioną strukturę zawierającą cukrowe elementy budulcowe (Rys. 7.6.): D-glukozę, D-mannozę i kwas D-glukuronowy w stosunku cząsteczkowym 3:3:2 oraz liczne trisacharydowe łańcuchy boczne. Do zalet XG należy zaliczyć dużą rozpuszczalność w zimnej wodzie, szybkie zwilżenie oraz pseudoplastyczność roztworów. Przedstawione właściwości zależą m.in. od siły jonowej roztworu i temperatury. Wraz ze wzrostem temperatury dochodzi do przejścia konformacyjnego struktury łańcucha XG ze sztywnego, uporządkowanego stanu do bardziej elastycznego i nieuporządkowanego. Makromolekuły XG charakteryzują się również synergicznym oddziaływaniem z galaktomannanami i glukomannanami oraz stabilnością w szerokim zakresie pH (3-10). Wykazują one dodatkowo odporność na działanie enzymów z grupy amylaz, proteaz i celulaz⁽²⁹³⁾.



Rys. 7.5. Wzór półstrukturalny cząsteczki kwasu hialuronowego



Rys. 7.6. Wzór półstrukturalny cząsteczki gumy ksantanowej

8. Metodyka badań - Materiały

8.1. Substancje modelowe

Modyfikatory przewodności roztworów

Dobór substancji modelowych odznaczających właściwościami wpływającymi na przewodność elektrolityczną roztworów opierał się na analizie składów leków inhalacyjnych stosowanych w nebulizacji, przeprowadzonym w podrozdziale 7.3. Do najpopularniejszych substancji pomocniczych w lekach wykazujących właściwości modyfikujące ten parametr należą dobrze rozpuszczalne w wodzie sole: chlorku sodu (cz.d.a., Sigma-Aldrich, USA) i cytrynian sodu (cz.d.a., P.P.H., Polska).

Modyfikatory napięcia powierzchniowego roztworów

Wybór substancji modelowych wykazujących się aktywnością powierzchniową został przeprowadzony na podstawie analizy składów zawiesin zawierających solubilizatory, a także pozostałych leków stosowanych w nebulizacji, którą przeprowadzono w podrozdziale 7.3. W badaniach zastosowano substancje pomocnicze charakteryzujące się zdolnością do obniżania napięcia powierzchniowego oraz wykazujące dobrą rozpuszczalność w wodzie: Tween 80 i chlorek benzalkoniowy (cz.d.a., Sigma-Aldrich, USA).

Modyfikatory lepkości roztworów

W wyniku analizy składu leków inhalacyjnych, przeprowadzonej w podrozdziale 7.3, zaobserwowano, że formułacje nie zawierają substancji, które w jednoznacznym stopniu odpowiadają za zmianę właściwości reologicznych tych produktów. Na potrzebę tych badań, zgodnie z tezą pracy, rozszerzono analizę o substancje, które występują w lekach inhalacyjnych używanych m.in. w proszkach do inhalacji, czy atomizerach donosowych (podrozdział 7.3, Tab. 7.2.). Na tej podstawie wybrano substancje modelowe modyfikujące lepkość roztworów i charakteryzujące się dobrą rozpuszczalnością w wodzie: gliceryna (ozn. GLY, cz.d.a., P.P.H., Polska) oraz glukoza (ozn. GLU, cz.d.a., POCH S.A., Polska).

8.2. Leki inhalacyjne

W badaniach zastosowano rzeczywiste ciecze rozpylane za pomocą nebulizatorów medycznych, tj. leki inhalacyjne oraz inne preparaty medyczne. Stanowiły one pulę próbek referencyjnych i zostały wybrane na podstawie analizy postaci ich formułacji oraz przewidywalnych cech fizykochemicznych (Tab. 7.1.). Zastosowanie gotowych produktów leczniczych nie miało na celu ich porównania, a jedynie zbadanie występujących tendencji.

Roztwory leków

Dobór płynów do inhalacji w postaci roztworów opierał się na przeprowadzonej w podrozdziale 7.2 analizie składów leków inhalacyjnych stosowanych w nebulizacji. Zastosowano następujące leki (w kolejności alfabetycznej): Atrovent (0,25 mg/ml, Boehringer Ingelheim, Niemcy), Berodual ((0,5 mg + 0,25 mg)/ml, Boehringer Ingelheim, Niemcy), Iprixon Neb ((0,5 mg + 2,5 mg)/2,5 ml, Adamed, Polska), Mucosolvan (7,5 mg/ml, Sanofi-Aventis, Francja), Ventolin (2 mg/ml, GlaxoSmithKline, Wielka Brytania) i oznaczono je losowo R1-R5.

Zawiesiny cząstek leków

Wybór płynów do inhalacji w postaci zawiesin został przeprowadzony na podstawie przeprowadzonej w podrozdziale 7.2 analizy składów sterydowych leków inhalacyjnych stosowanych w nebulizacji oraz zarówno innowacyjnych, jak i generycznych. Przebadano następujące leki (wymienione alfabetycznie): Benodil (0,25mg/ml, Polpharma, Polska), Budixon NEB (0,25 mg/ml, Adamed, Polska), Flixotide (1 mg/ml, GlaxoSmithKline, Wielka Brytania), Flutixon NEB (250 µg/ml, Adamed, Polska), Nebbud (0,25 mg/ml, Teva Pharmaceuticals, Izrael), Pulmicort (0,25 mg/ml, AstraZeneca, Szwecja) i oznaczono je losowo Z1-Z6.

8.3. Substancje pochodzenia naturalnego

Biosurfaktanty

W badaniach zastosowano roztwory wodne (w wodzie MilliQ – Merck Millipore, USA) oraz roztwory soli fizjologicznej substancji aktywnych powierzchniowo: lecytyny sojowej (ozn. Lec; Merck, USA), L-leucyny (ozn. Leu; Merck, USA) i escyny (ozn. Esc; Merck, USA).

Polisacharydowe modyfikatory lepkości

Zbadano roztwory wodne (w wodzie MilliQ – Merck Millipore, USA) oraz roztwory soli fizjologicznej polisacharydów: gumy ksantanowej (ozn. XG, Merck, USA), agaru (ozn. AG; Merck, USA) i hialuronianu sodu (ozn. SH; Merck, USA). SH stanowi mieszaninę 1:1 hialuronianu sodu o masie większej niż 1 MDa i mniejszej niż 5 kDa.

8.4. Modelowy surfaktant płucny

Badania oddziaływań aerozolu zdeponowanego w drogach oddechowych na surfaktant płucny zostały przeprowadzone z użyciem wybranych modeli surfaktantu płucnego. Wybór ten został oparty na dokładnej analizie ich składów oraz kluczowych właściwości w kontekście podobieństwa do naturalnego surfaktantu płucnego, a także przy uwzględnieniu specyfiki wybranych metod pomiarowych (przeprowadzonej w podrozdziale 5.4.5). Dlatego też, zastosowano dwa modele: (i) lipidowy (LM) – DPPC:Cholesterol (8:2)(170) oraz (ii)

wieloskładnikowy (MPS) na bazie preparatów leczniczych zawierających mieszaninę fosfolipidów oraz białek. Wykaz odczynników użytych do przygotowania tych modeli zamieszczono w tabeli 8.1.

Tab. 8.1. Wykaz odczynników użytych podczas eksperymentów z modelem lipidowym oraz modelem wieloskładnikowym (MPS)

Rodzaj modelu	Odczynnik	Rola w modelu	Czystość	Producent
MODEL LIPIDOWY	Cholesterol	frakcja lipidowa	94%	Sigma-Aldrich, USA
	DPPC	frakcja lipidowa	cz.d.a.	Lipoid GmbH, Niemcy
	Chloroform	rozpuszczalnik frakcji lipidowej	99,0 – 99,4%	Sigma–Aldrich, USA
	woda Milli-Q	subfaza	ultraczysta	System oczyszczania wody Direct-Q-3-R, Merck, USA

Rodzaj modelu	Nazwa preparatu	Stężenie fosfolipidów	Typy białek	Producent
MPS	Curosurf®*	80 mg/ml (frakcja fosfolipidów z płuc świni)	1% hydrofobowych, niskocząsteczkowych protein powierzchniowych SP-B i SP-C	Chiesi, Włochy
	Infasurf®*	35 mg/ml (ekstrakt z płuc wołowych)	0.7 mg/ml hydrofobowych, niskocząsteczkowych protein powierzchniowych SP-B i SP-C	ONY Biotech, USA

*Informacje uzyskane na podstawie danych producenta zamieszczonych w ulotkach produktów leczniczych

9. Metodyka badawcza – Metody pomiarowe i obliczeniowe

9.1. Metodyka pomiarów właściwości atomizowanych cieczy

9.1.1. Pomiary przewodności elektrolitycznej

Do charakterystyki analizowanych roztworów pod względem przewodności elektrolitycznej użyto konduktometru z wbudowaną kompensacją temperatury CPC – 411 (Elmetron, Polska). Badania przeprowadzono w temperaturze pokojowej z użyciem roztworów substancji modelowych: chlorku sodu (NaCl) i cytrynianu sodu. Zakres użytych stężeń zamieszczono w Tab. 9.1.

Tab. 9.1. Zestawienie roztworów i zawiesin substancji poddanych pomiarom kondumetrycznym.

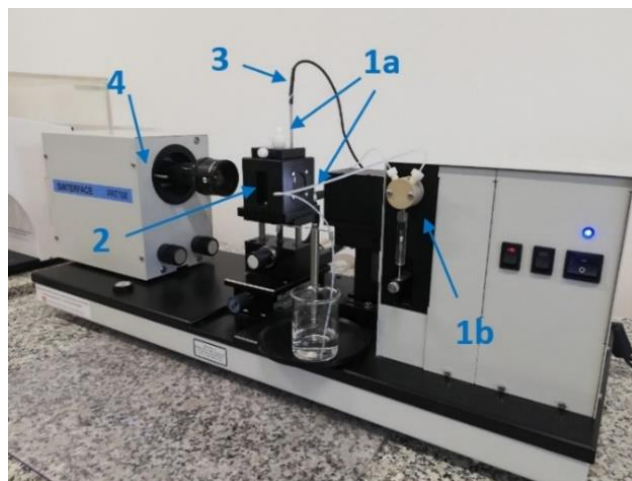
Substancje modelowe			
Substancja	Stężenie	Substancja	Stężenie
chlorek sodu (NaCl)	0,9%	cytrynian sodu (CS)	0,9%
	5%		5%
	10%		10%

9.1.2. Pomiary napięcia powierzchniowego

Charakterystykę napięcia powierzchniowego (σ) wykonano z użyciem tensjometru kroplowego PAT-1M (Sinteface, Niemcy) metodą wiszącej kropli na podstawie pomiaru równowagowego napięcia powierzchniowego (σ_e) wybranych roztworów, których listę wraz ze stosowanymi stężeniami zamieszczono w tabeli 9.2. Zasada działania opisywanego urządzenia pomiarowego opiera się na wyznaczeniu napięcia powierzchniowego na podstawie obrysu wiszącej kropli. Korelację pomiędzy kształtem kropli a σ opisuje równanie Gaussa – Laplace’a:

$$\sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta P_0 + \Delta \rho_{gl} g h_d \quad (9.1)$$

w którym $R_{1,2}$ oznaczają promienie krzywizny, ΔP_0 – różnicę ciśnień w stosunku do płaszczyzny odniesienia, $\Delta \rho_{gl}$ - różnicę gęstości pomiędzy fazą gazową i ciekłą, g to przyspieszenie ziemskie, a h_d to wysokość kropli mierzonej od płaszczyzny odniesienia⁽²⁹⁴⁾.



Rys. 9.1. Tensjometr kroplowy PAT-1M SINTERFACE

Urządzenie PAT-1M jest zaprojektowane do pomiaru dynamicznego napięcia powierzchniowego metodą wiszącej kropli (przy stałej powierzchni) lub metodą oscylującej kropli (sinusoidalne zmiany powierzchni – patrz podrozdział 10.3.3). Układ pomiarowy składa się z elementów mechanicznych tj. systemu dozującego odpowiadającego jednocześnie za utrzymanie odpowiedniej wielkości kropli, złożonego z: (i) metalowej kapilary o średnicy 1 mm, (ii) rurek chromatograficznych doprowadzających ciecz (Rys. 9.1–1a) oraz (iii) pompki tłokowej (strzykawkowej) (Rys. 9.1–1b); termostатовanej celi pomiarowej (Rys. 9.1–2); czujnika temperatury (Rys. 9.1–3) oraz elementów optycznych tj. kamery CCD z obiektywem, (Rys. 9.1 –4). Pomiar σ przy stałej powierzchni kropli prowadzono w 25°C, do momentu osiągnięcia wartości równowagowej (ok. 10 min).

Tab. 9.2. Zestawienie roztworów i zawiesin substancji poddanych charakterystyce napięcia powierzchniowego

Substancje modelowe								
Substancja			Stężenie*		Substancja		Stężenie*	
woda ultraczysta			x		sól fizjologiczna		0,9% (w/v)	
Tween 80			0,001% (v/v)		BAC		0,001% (w/v)	
			0,01% (v/v)				0,01% (w/v)	
			0,1% (v/v)				0,1% (w/v)	
Tween 80 + sól fizjologiczna			0,001% (v/v)		BAC + sól fizjologiczna		0,001% (w/v)	
			0,01% (v/v)				0,01% (w/v)	
			0,1% (v/v)				0,1% (w/v)	
Leki inhalacyjne								
Roztwory					Zawiesiny			
R1-R5					Z1-Z6			
Biosurfaktanty								
Subst.	Ozn.	Stężenie*	Subst.	Ozn.	Stężenie*	Subst.	Ozn.	Stężenie*
Escyna	Esc	0,004375% (w/v)	L-Leucyna	L-Leu	0,7% (w/v)	Lecytyna sojowa	Lec	0,025% (w/v)
		0,00875% (w/v)			0,9% (w/v)			0,03% (w/v)
		0,0175% (w/v)			1,1% (w/v)			0,05% (w/v)
		0,035% (w/v)						
Escyna + sól fizjologiczna	Esc+ 0,9% NaCl	0,004375% (w/v)	L-Leucyna + sól fizjologiczna	L-Leu+ 0,9% NaCl	0,7% (w/v)	Lecytyna sojowa + sól fizjologiczna	Lec+ 0,9% NaCl	0,025% (w/v)
		0,00875% (w/v)			0,9% (w/v)			0,03% (w/v)
		0,0175% (w/v)			1,1% (w/v)			0,05% (w/v)
		0,035% (w/v)						

*Wartość stężenia surfaktantu.

9.1.3. Pomiary właściwości reologicznych

Według zaleceń Farmakopei Europejskiej do oceny właściwości reologicznych stosuje się: viskozymetr kapilarny w przypadku jedynie płynów niutonowskich oraz reometr rotacyjny w przypadku płynów niutonowskich i nieniuonowskich⁽²⁴⁸⁾. Ze względu na rodzaj wybranych do badań roztworów i zawiesin zdecydowano się na reometr rotacyjny MRC-102 (Anton Paar, Austria). Pomiary wykonywano w termostatowanym układzie płytka-płytką ze szczeliną pomiarową 1 mm w 25°C.

Przygotowanie próbek

Badanie właściwości reologicznych przeprowadzono dla polisacharydowych modyfikatorów lepkości oraz wybranych leków inhalacyjnych. W przypadku pozostałych badanych rozcieńczonych roztworów wodnych przyjęto lepkość jak dla wody. Użyte stężenia zostały zamieszczone w tabeli 9.3. Substancje modelowe i polisacharydowe modyfikatory lepkości zostały rozpuszczone w wodzie ultraczystej, pochodzącej z systemu oczyszczania wody Direct-Q-3R (Merck, USA). Przygotowanie roztworów agaru wymagało użycia łaźni wodnej w celu podwyższenia temperatury (90-100°C) i poprawy warunków rozpuszczania.

Tab. 9.3. Zestawienie roztworów i zawiesin poddanych charakterystyce reologicznej.

Substancje modelowe								
Substancja		Stężenie		Substancja		Stężenie		
Gliceryna (GLY)		28% (v/v)		Glukoza (GLU)		30% (w/v)		
		50% (v/v)				50% (w/v)		
		62% (v/v)				80% (w/v)		
Leki inhalacyjne								
Roztwory					Zawiesiny			
R1-R5					Z1-Z6			
Polisacharydowe modyfikatory lepkości								
Subst.	Ozn.	Stężeni e*	Subst.	Ozn.	Stężenie*	Subst.	Ozn.	Stężenie*
Guma ksantanowa	XG	1,5 mg/ml	Agar	AG	1,5 mg/ml	Hialuronian sodu	SH	0,8 mg/ml
		2,0 mg/ml			2,0 mg/ml			1,5 mg/ml
		3,0 mg/ml			3,0 mg/ml			2,0 mg/ml
Guma ksantanowa + sól fizjologiczna	XG+ 0,9% NaCl	1,5 mg/ml	Agar + sól fizjologiczna	AG+ 0,9% NaCl	1,5 mg/ml	Hialuronian sodu + sól fizjologiczna	SH+ 0,9% NaCl	0,8 mg/ml
		2,0 mg/ml			2,0 mg/ml			1,5 mg/ml
		3,0 mg/ml			3,0 mg/ml			2,0 mg/ml

*Wartość stężenia biopolimeru

Charakterystyka cieczy

Wyznaczano reologiczną charakterystykę płynięcia tj. zmiany naprężenia τ w funkcji szybkości ścinania $\dot{\gamma}$. Płyny niutonowskie cechują się stałą, niezależną od przyłożonej siły wartością lepkości dynamicznej ($\mu = \text{const}$), którą można opisać przy użyciu prawa Newtona:

$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (9.2.)$$

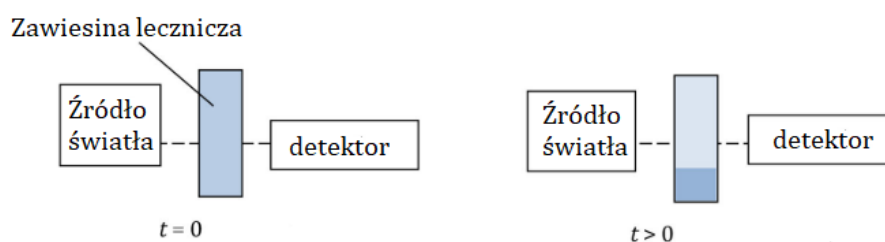
W płynach nieniutonowskich lepkość zależy od szybkości ścinania. W przeprowadzonych badaniach do opisu tych płynów zastosowano model Ostwalda-de-Waale'a (model potęgowy):

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad (9.3.)$$

gdzie k stanowi współczynnik konsystencji, a n to wskaźnik charakterystyczny płynięcia. Wartości $n < 1$ charakteryzują płyny rozrzedzane ścinaniem, a z kolei $n > 1$ cechują płyny zagęszczane ścinaniem (dylantacyjne)⁽²⁹⁵⁾. Wartość $n = 1$ oznacza płyn niutonowski.

9.1.4. Pomiary stabilności zawiesin leczniczych

Pomiary stabilności zawiesin leków Z1-Z6 wykonano metodą spektrofotometryczną (GENESYS™ 10S UV-Vis, ThermoFisherScientific, USA – Rys. 9.2) przy długości fali λ z zakresu światła widzialnego - 540 nm oraz w temperaturze 25°C. Przed przystąpieniem do pomiarów absorbancji wybrane zawiesiny leków dokładnie zamieszano, a pomiar każdej z próbek wykonano w 3 powtórzeniach. Zasada przeprowadzonych pomiarów wykorzystuje charakterystyczne właściwości optyczne układów koloidalnych, w tym fakt, że w wyniku oddziaływania z cząsteczkami fazy rozproszonej, natężenie wiązki światła zmniejsza się na skutek częściowej absorpcji oraz rozproszenia promieniowania. Rejestrację zmian absorbancji (ΔAbs), tj. wyrażanego w procentach stosunku absorbancji w danym punkcie pomiarowym do absorbancji początkowej, prowadzono w czasie 2h.



Rys. 9.2. Technika spektrofotometrycznego pomiaru stabilności mikrodyspersji leku inhalacyjnego⁽²⁴⁹⁾

9.1.5. Pomiary morfologii i wielkości cząstek substancji aktywnej

W celu oceny właściwości cząstek substancji aktywnej przeprowadzono charakterystykę zawiesin wybranych leków inhalacyjnych Z1-Z6 pod względem rozmiaru i morfologii samych cząstek fazy rozproszonej, jak i ogólnej obserwacji jakościowej próbek. Zgodnie z wymaganiami Farmakopei⁽²⁴⁸⁾, obserwacje optyczne, w tym mikroskopowe, są stosowalne w przypadku cząstek większych niż 1 μm i zalecane do cząstek niesferycznych. W pracy

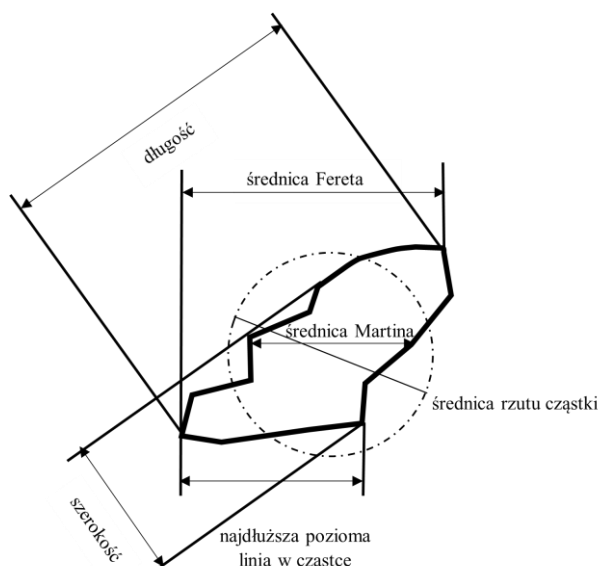
przeprowadzono obserwacje z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) TM – 1000 (HITACHI, Japonia) stosując powiększenia 5000x. Do analizy obrazów SEM wykorzystano oprogramowanie ImageJ (otwarty dostęp).

Przygotowanie próbek

Cząstki stałe API zostały wydzielone z zawiesiny przez kilkukrotne powtórzenie procedury: (i) wirowanie zawiesiny (3 min; 10000 obr/min), (ii) dekantacja cieczy klarownej z nad osadu i (iii) przepłukanie wodą ultraczystą osadu. W ten sposób otrzymany osad cząstek API został pozbawiony substancji pomocniczych, które ulegałyby krystalizacji, wpływając na wyniki obserwacji SEM. Próbkę do obserwacji przygotowano poprzez naniesienie na taśmę węglową (Agar Scientific Ltd, Wielka Brytania), a następnie napylenie 25-nm warstewki złota w napylnicy K550X (EMITECH, UK).

Charakterystyka mikroskopowa kształtu i wielkości cząstek oraz ich zbioru

Charakterystyka niesferycznych cząstek API, obok pomiaru ich wielkości, opiera się także na opisie ich kształtu, ocenie jednorodności i analizie ich skupienia. Ogólnie, cząstki uważane są za najmniejsze jednostki dyskretne, a ich kształt można określić za pomocą wyszczególnionych w Farmakopei sformułowań m.in. (i) kolumnowe (z ang. *columnar*) – długie i wąskie, (ii) płytkowe (z ang. *plate*) – płaskie o podobnych wymiarach długości i szerokości, (iii) izometryczne (z ang. *equant*) – posiadające podobne wymiary długości, szerokości i grubości, m.in. należą do nich cząstki sferyczne i sześciennie⁽²⁴⁸⁾.



Rys. 9.3. Stosowane wymiary cząstek niesferycznych w przypadku analizy obrazów dwuwymiarowych, na podstawie⁽²⁴⁸⁾

Analiza wymiarów cząstek jest zależna od ich kształtu: kuliste są definiowane przez średnicę, a te o nieregularnym kształcie określone są przez szereg wymiarów, pokazanych na rysunku 9.3. W przypadku cząstek niesferycznych kolejnym krokiem w obserwacji

mikroskopowej jest opis ich wyglądu poprzez stan krawędzi (wyróżniamy: kanciaste, zaokrąglone, gładkie, ostre lub łamane) oraz zidentyfikowanie defektów (np. okluzje lub inkluzje). Charakterystyka powierzchni odbywa się analogicznie, jak w przypadku cząstek kulistych i należy uwzględnić w obserwacjach jej popękania (z ang. *cracked surface*), które mogą być częściowe, stanowić wyrwę lub szczelinę; całkowitą gładkość (z ang. *smooth surface*) rozumianą jako brak nieregularności, chropowatości lub występow; występowanie porowatości (z ang. *porous surface*); czy chropowatości (z ang. *rough surface*) lub niewielkich wgniecień (z ang. *pitted surface*). Przy ocenie cząstek stałych należy wziąć pod uwagę, także oddziaływania występujące pomiędzy nimi, uwzględniając tendencję do łączenia się, na skutek działań sił kohezji (m.in. oddziaływania van der Waalsa). Im większy jest stopień rozdrobnienia tym występujące oddziaływania są coraz silniejsze (wynika to z kompensacji energii powierzchniowej). Gradację stopnia skupienia zgrupowań cząstek można opisać przy pomocy następujących określeń m.in.: ułożenie warstwowe (z ang. *lamellar*) - grupa cząstek poukładanych piętro na sobie, agregat (z ang. *aggregate*) – grupa przylegających elementów, aglomerat (z ang. *agglomerate*) – zbiór stopionych lub sklejonnych cząstek, czy konglomerat (z ang. *conglomerate*), gdy zbiór składa się z minimum dwóch rodzajów cząstek^(248,296).

9.2. Charakterystyka emitowanego aerozolu

9.2.1. Dobór nebulizatorów

Dobór użytych w badaniach nebulizatorów pneumatycznych został przeprowadzony w taki sposób, aby wziąć pod uwagę różnice konstrukcyjne głowicy rozpylającej oraz parametrów pracy. Natomiast wybór nebulizatorów siateczkowych uwzględniał obok parametrów wymienionych przy nebulizatorach pneumatycznych, materiał, z którego wytworzono perforowaną membranę oraz wyniki badań wstępnych, określające wielkość porów membrany. Zestawienie analizowanych parametrów technicznych wybranych modeli wraz z oznaczeniem stosowanym w niniejszej pracy zamieszczono w tabeli 9.4. Za pomocą zdjęć (Załącznik - Rys. 9.Z.1.a-9.Z.1.e) zobrazowano różnice konstrukcyjne poszczególnych nebulizatorów. Na potrzebę przeprowadzonych badań nebulizatory pneumatyczne były zasilane sprężonym powietrzem przy użyciu sprężarki Pari Boy SX (Pari GmbH, Germany).

Tab. 9.4.: Zestawienie wybranych parametrów technicznych oraz oznaczeń badanych nebulizatorów*

Nebulizatory pneumatyczne			
Model nebulizatora i nazwa producenta		Pari Boy SX (Pari GmbH, Niemcy)	Diagnostic Nano (Diagnosis, Polska)
Oznaczenie w pracy		JN-1	JN-2
Model głowicy rozpylającej		LC SPRINT	Trio Jet
Wielkość generowanych kropeł		MMD: 3,5 μm (FPF: 68%)	MMAD: 3,08 μm
Szybkość rozpylania		0,5 g/min	0,4 ml/min
Pojemność głowicy		2-8 ml	2-8 ml
Nebulizatory siateczkowe			
Model nebulizatora i nazwa producenta	Aerogen Solo (Aerogen Ltd., Irlandia) ze sterownikiem Aerogen Pro-X	IntecTwister Mesh (Intec Medical, Polska)	Diagnostic Pro-Mesh (Diagnosis, Polska)
Oznaczenie w pracy	VMN-1	VMN-2	VMN-3
Charakterystyka membrany	membrana o średnicy 5 mm wykonana z palladu i zawierająca 100 otworów	plastikowa perforowana membrana	plastikowa perforowana membrana
Wielkość generowanych kropeł	MMAD: 3,1 μm impaktor kaskadowy Andersena	MMAD: 4,8 μm	MMAD: 3,8 μm dyfrakcja laserowa
Szybkość rozpylania	0,38 ml/min	0,25 ml/min	0,25 ml/min
Pojemność głowicy	3-10 ml	2-12 ml	2-8 ml
Częstotliwość drgań membrany	128 kHz	100 kHz	113 kHz
Objętość rezydualna	> 0,1 ml przy 3 ml początkowego napełnienia cieczy	ok. 0,2 ml	brak informacji

*Informacje uzyskane na podstawie danych producenta zamieszczonych w instrukcjach

9.2.2. Pomiary w zakresie badań wydajności emisji aerozolu

Wydajność masową emisji wybranych roztworów i zawiesin (dokładną listę przedstawiono w tabeli 9.5.) zbadano metodą grawimetryczną (wagową). Przy pomiarach zastosowano wszystkie rodzaje nebulizatorów pneumatycznych: JN-1 i JN-2 oraz siateczkowych: VMN-1, VMN-2 i VMN-3. Emisje aerozolu prowadzono przez ok. 4 minuty (w przypadku leków 3 minuty) przy takiej samej objętości początkowej cieczy – 5 ml (w przypadku leków rozpylano 2 ml – objętość ampułki). Pomiary chwilowej wydajności wykonywano w 30 sekundowych (nebulizatory pneumatyczne) oraz 60-sekundowych interwałach (nebulizatory membranowe). Uśrednione wyniki z całego procesu atomizacji obrazowały średnią wydajność masową emisji aerozolu.

Tab. 9.5. Zestawienie roztworów i zawiesin substancji poddanych badaniu wydajności masowej z uwzględnieniem zastosowanych nebulizatorów

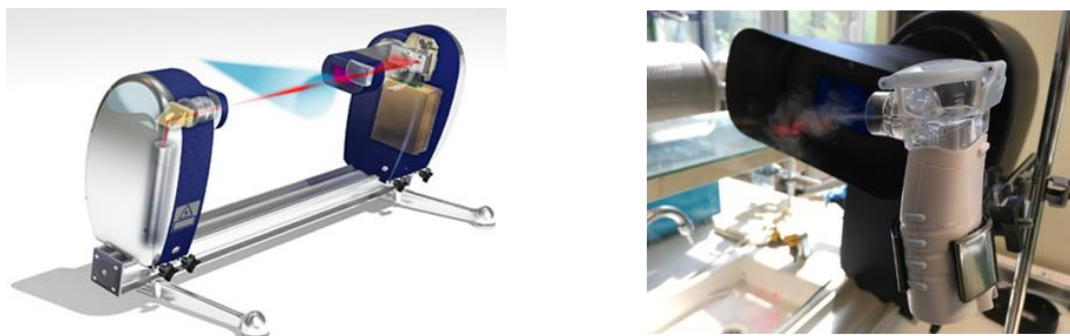
Substancje modelowe								
Próbka kontrolna		woda ultraczysta						
Substancja	Stężenie	Substancja	Stężenie	Substancja	Stężenie			
chlorek sodu	0,9%	gliceryna	28% (v/v)	Tween 80	0,001% (v/v)			
	5%		50% (v/v)		0,01% (v/v)			
	10%		62% (v/v)		0,1% (v/v)			
cytrynian sodu	0,9%	glukoza	30% (w/v)	BAC	0,001% (v/v)			
	5%		50% (w/v)		0,01% (v/v)			
	10%		80% (w/v)		0,1% (v/v)			
Leki inhalacyjne								
Roztwory			Zawiesiny					
R1-R5			Z1-Z6					
Biosurfaktanty								
Substancja	Oznaczenie	Stężenie	Substancja	Oznaczenie	Stężenie			
Escyna	Esc	0,004375% (w/v)	L-Leucyna	L-Leu	0,9% (w/v)			
		0,0175% (w/v)			1,1% (w/v)			
Escyna + sól fizjolog.	Esc + 0,9% NaCl	0,004375% (w/v)	L-Leucyna + sól fizjolog.	L-Leu + 0,9% NaCl	0,9% (w/v)			
		0,0175% (w/v)			1,1% (w/v)			
Polisacharydowe modyfikatory lepkości								
Subst.	Ozn.	Stężenie*	Subst.	Ozn.	Stężenie*	Subst.	Ozn.	Stężenie*
Guma ksantanowa	XG	0,8 mg/ml	Agar	AG	0,8 mg/ml	Hialuronian sodu	SH	0,8 mg/ml
		1,5 mg/ml			1,5 mg/ml			1,5 mg/ml
		2,0 mg/ml			2,0 mg/ml			2,0 mg/ml
		3,0 mg/ml			3,0 mg/ml			3,0 mg/ml
		4,0 mg/ml						
Guma ksantanowa + sól fizjolog.	XG+ 0,9% NaCl	0,8 mg/ml	Agar + sól fizjolog.	AG+ 0,9% NaCl	0,8 mg/ml	Hialuronian sodu + sól fizjolog.	SH+ 0,9% NaCl	0,8 mg/ml
		1,5 mg/ml			1,5 mg/ml			1,5 mg/ml
		2,0 mg/ml			2,0 mg/ml			2,0 mg/ml
		3,0 mg/ml			3,0 mg/ml			3,0 mg/ml
		4,0 mg/ml						

*Wartość stężenia odnosi się do wartości stężenia surfaktantu/polisacharydu

9.2.3. Pomiary rozkładu wielkości kropel w chmurze aerozolowej

Spośród wszystkich metod wyróżnionych w podrozdziale 6.3.3 i po uwzględnieniu ograniczeń tych technik pomiarowych zdecydowano się na wybór dyfrakcji laserowej jako metody badawczej do pomiaru rozkładu wielkości kropel w chmurze aerozolowej. Aerozolowy dyfraktometr laserowy Spraytec (Rys. 9.4, Malvern Panalytical, Wielka Brytania) umożliwia pomiar *in situ* wielkości kropel aerozolowych w trzech konfiguracjach: otwartej (z ang. *open*

bench), którą stosowano w badaniach opisanych w tej pracy, z celem inhalacyjnym oraz z celem do pomiarów ciekłych dyspersji. W wyniku pomiarów prowadzonych z użyciem opisanego instrumentu pomiarowego otrzymuje się objętościowy rozkład wielkości kropeł o maksymalnym zakresie wielkości cząstek aerozolowych 0,1–900 μm . Dokładny opis aparatury oraz podstawy teoretyczne jej działania zamieszczono w załączniku (Z.9.1).



Rys. 9.4. Dyfrakcyjny spektrometr aerozolowy Spraytec (po lewej) [Źródło: Strona producenta]. Układ pomiarowy uwalnianego aerozolu inhalacyjnego (po prawej).

Opis konfiguracji urządzenia pomiarowego oraz przebieg prowadzonych badań

Otwarty układ systemu Spraytec, który został zastosowany do realizacji celów badawczych w zakresie niniejszej pracy umożliwia prowadzenie pomiarów w przestrzeni pomiarowej zawartej pomiędzy dwoma modułami optycznymi: źródłem wiązki skolimowanej i detektorami. Opisywana konfiguracja sprawdza się w przypadku badań aerozoli o wysokim stężeniu objętościowym kropeł lub cząstek o niezerowej prędkości. Z tego też względu, układ ten jest odpowiedni do badań nebulizatorów pneumatycznych JN-1, JN-2 oraz membranowych VMN-1, VMN-2 czy VMN-3. Ustnik nebulizatora umieszczano, prostopadle do wiązki laserowej i w odległości ok. 5 cm od niej (Rys. 9.4). Specjalnie zaprojektowana procedura tzw. SOP umożliwiała prowadzenie pomiaru przez 30 s z okresem próbkowania co 1 s.

Podobnie jak w badaniach wydajności emisji, emisję aerozolu z nebulizatorów prowadzono przy takiej samej objętości początkowej cieczy – 5 ml (w przypadku leków rozpylano 2 ml – objętość ampułki). Dokładną listę atomizowanych płynów wraz z uwzględnieniem zastosowanych nebulizatorów przedstawiono w tabeli 9.6. Otrzymane w wyniku pomiarów chwilowe dane rozkładu były następnie uśredniane w całym czasie trwania pomiaru (30 s). Uśrednienia te pozwalają na wyliczenie kryteriów oceny jakościowej i ilościowej omówionych szerzej w podrozdziale 6.3.4. W niniejszych badaniach porównywano średnicę odpowiadającą medianie rozkładu objętościowego ($Dv50$) (ze względu na gęstość cieczy zbliżoną do wody można przyjąć, że jest to wartość porównywalna do MMAD); geometryczne odchylenie standardowe (GSD) i udział frakcji inhalowalnej (respirabilnej) tj. kropeł drobnych - mniejszych niż 5 μm ($\%V<5\mu\text{m}$).

Tab. 9.6. Zestawienie roztworów i zawiesin substancji poddanych badaniu rozkładów wielkości kropeł z uwzględnieniem zastosowanych nebulizatorów

Substancje modelowe								
Próbka kontrolna					Woda ultraczysta			
Substancja	Stężenie		Substancja	Stężenie		Substancja	Stężenie*	
chlorek sodu	0,9%		gliceryna	28% (v/v)		Tween 80 lub	0,001% (v/v)	
	5%			Tween 80 + sól fizjolog.	0,01% (v/v)			
	10%				0,1% (v/v)			
cytrynian sodu	0,9%		glukoza	30% (w/v)		BAC lub BAC + sól fizjolog.	0,001% (v/v)	
	5%			50% (w/v)			0,01% (v/v)	
	10%			80% (w/v)			0,1% (v/v)	
Leki inhalacyjne								
Roztwory					Zawiesiny			
R1-R5					Z1-Z6			
Biosurfaktanty								
Subst.	Ozn.	Stężenie*	Subst.	Ozn.	Stężenie *	Subst.	Ozn.	Stężenie*
Escyna	Esc	0,004375% (w/v)	L-Leucyna	L- Leu	0,7% (w/v)	Lecytyna sojowa	Lec	0,025% (w/v)
		0,00875% (w/v)			0,9% (w/v)			0,03% (w/v)
		0,0175% (w/v)			1,1% (w/v)			0,05% (w/v)
		0,035% (w/v)						
Escyna + sól fizjolog.	Esc+ 0,9% NaCl	0,004375% (w/v)	L-Leucyna + sól fizjolog.	L- Leu+ 0,9% NaCl	0,7% (w/v)	Lecytyna sojowa + sól fizjolog.	Lec+ 0,9% NaCl	0,025% (w/v)
		0,00875% (w/v)			0,9% (w/v)			0,03% (w/v)
		0,0175% (w/v)			1,1% (w/v)			0,05% (w/v)
		0,035% (w/v)						
Polisacharydowe modyfikatory lepkości								
Subst.	Ozn.	Stężenie*	Subst.	Ozn.	Stężenie*	Subst.	Ozn.	Stężenie*
Guma ksantanowa	XG	0,8 mg/ml	Agar	AG	0,8 mg/ml	Hialuronian sodu	SH	0,8 mg/ml
		1,5 mg/ml			1,5 mg/ml			1,5 mg/ml
		2,0 mg/ml			2,0 mg/ml			2,0 mg/ml
		3,0 mg/ml			3,0 mg/ml			3,0 mg/ml
		4,0 mg/ml						
Guma ksantanowa + sól fizjolog.	XG+ 0,9% NaCl	0,8 mg/ml	Agar + sól fizjolog.	AG+ 0,9% NaCl	0,8 mg/ml	Hialuronian sodu + sól fizjolog.	SH+ 0,9% NaCl	0,8 mg/ml
		1,5 mg/ml			1,5 mg/ml			1,5 mg/ml
		2,0 mg/ml			2,0 mg/ml			2,0 mg/ml
		3,0 mg/ml			3,0 mg/ml			3,0 mg/ml

*Wartość stężenia odnosi się do wartości stężenia surfaktantu/polisacharydu

9.2.4. Pomiary dynamiki procesu atomizacji

9.2.4.1. Pomiary zmian wielkości kropeł w trakcie trwania procesu atomizacji

Badanie stabilności chmury aerozolowej emitowanej z wybranych nebulizatorów pneumatycznych JN-1 i JN-2 podczas rozpylania cieczy modelowych, roztworów

zawierających modyfikatory właściwości fizykochemicznych pochodzenia naturalnego oraz zawiesin leków (dokładną listę użytych płynów zamieszczono w tabeli – Tab. 9.7.) przeprowadzono z użyciem aerozolowego dyfraktrometru laserowego Spraytec. Pomiar zmian wielkości mediany średnicy objętościowej (Dv50) oraz udział frakcji inhalowalnej (%V<5 µm) został przeprowadzony przy analogicznych ustawieniach do opisanych w podrozdziale 9.2.3 i przy zastosowaniu tej samej procedury SOP. Emisję aerozolu leczniczego z nebulizatorów prowadzono przez 3 minuty przy takiej samej objętości początkowej cieczy tj. 5 ml (w przypadku leków rozpylano 2 ml – objętość ampułki).

Tab. 9.7. Zestawienie roztworów i zawiesin substancji poddanych badaniu stabilności rozkładów wielkości kropeł chmury aerozolowej z uwzględnieniem zastosowanych nebulizatorów

Substancje modelowe								
Próbka kontrolna			Woda ultraczysta					
Substancja	Stężenie		Substancja	Stężenie				
NaCl	0,9% (w/v)		glukoza	50% (w/v)				
	5% (w/v)			80% (w/v)				
Tween 80	0,01% (v/v)		BAC	0,01% (v/v)				
	0,1% (v/v)			0,1% (v/v)				
Leki inhalacyjne								
Roztwory			Zawiesiny					
R4			Z1, Z3 i Z5					
Biosurfaktanty								
Substancja	Oznaczenie	Stężenie	Substancja	Oznaczenie	Stężenie			
Escyna	Esc	0,0175% (w/v)	L-Leucyna	L-Leu	0,9% (w/v)			
		0,035% (w/v)			1,1% (w/v)			
Polisacharydowe modyfikatory lepkości								
Subst.	Ozn.	Stężenie	Subst.	Ozn.	Stężenie	Subst.	Ozn.	Stężenie
Guma ksantanowa	XG	0,8 mg/ml	Agar	AG	1,5 mg/ml	Hialuronian sodu	SH	0,8 mg/ml
		1,5 mg/ml			2,0 mg/ml			1,5 mg/ml
		2,0 mg/ml			3,0 mg/ml			2,0 mg/ml
		3,0 mg/ml						2,0 mg/ml
		4,0 mg/ml						2,0 mg/ml
Guma ksantanowa + sól fizjolog.	XG+ 0,9% NaCl	0,8 mg/ml	Agar + sól fizjolog.	AG+ 0,9% NaCl	1,5 mg/ml	Hialuronian sodu + sól fizjolog.	SH+ 0,9% NaCl	0,8 mg/ml
		1,5 mg/ml			2,0 mg/ml			1,5 mg/ml
		2,0 mg/ml			3,0 mg/ml			2,0 mg/ml
		3,0 mg/ml						2,0 mg/ml

*Wartość stężenia odnosi się do wartości stężenia polisacharydu.

9.2.4.2. Badanie zmian właściwości reologicznych cieczy poddanej procesowi atomizacji w wybranych nebulizatorach

Badanie chmury aerozolowej emitowanej z wybranych nebulizatorów JN-1 i JN-2 przeprowadzono podczas rozpylania roztworów zawierających modyfikatory lepkości

po pochodzenia naturalnego (pełną listę użytych roztworów zamieszczono w tabeli Tab. 9.8.). Badanie właściwości reologicznych przeprowadzono za pomocą reometru rotacyjnego MCR-102 dla cieczy pozostałej w komorze nebulizatora w wybranych punktach czasowych: przed atomizacją – 0s, po 30s, po 60s i po 4-minutach procesu. Każdorazowo w komorze nebulizatora umieszczano 5 ml cieczy a następnie przeprowadzono proces atomizacji w 3 powtórzeniach. Badanie właściwości reologicznych przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w podrozdziale 9.1.3 a następnie, zgodnie z równaniem 9.3., obliczono parametry reologiczne prawa potęgowego. Na podstawie wyznaczonych wartości współczynnika konsystencji k oraz wskaźnika charakterystycznego płynięcia n , otrzymano wartości względnej zmiany tych parametrów reologicznych. Całkowity spadek lub wzrost wartości k albo n został wyznaczony jako stosunek wyliczonych wielkości w 4 minucie do wartości początkowej przed atomizacją.

Tab. 9.8. Zestawienie roztworów i zawiesin substancji poddanych badaniu stabilności rozkładów wielkości kropel chmury aerozolowej z uwzględnieniem zastosowanych nebulizatorów

Polisacharydowe modyfikatory lepkości					
Substancja	Oznaczenie	Stężenie	Substancja	Oznaczenie	Stężenie
Guma ksantanowa	XG	1,5 mg/ml	Agar	AG	1,5 mg/ml
		2,0 mg/ml			2,0 mg/ml
		3,0 mg/ml			3,0 mg/ml

9.2.4.3. *Pomiary wpływu procesu atomizacji na zmiany właściwości fizykochemiczne cieczy*

Pomiary wpływu procesu atomizacji na temperaturę cieczy rozpylanej

Badania zmian temperatury ciekłych prekursorów aerozoli podczas nebulizacji przeprowadzono z użyciem elektronicznego czujnika temperatury (Elmetron, Polska) dla cieczy modelowych, leków oraz roztworów modyfikatorów napięcia powierzchniowego i lepkości (pełną listę użytych roztworów i zawiesin zamieszczono w tabeli Tab.9.9.) z użyciem nebulizatorów JN-1, JN-2 oraz VMN-3. Każdorazowo w komorze nebulizatora umieszczano 5 ml cieczy, a następnie przeprowadzono proces atomizacji w 3 powtórzeniach. Następnie mierzono temperaturę cieczy w głowicy nebulizatora w 30-sekundowych odstępach w czasie 4 minut, a potem wyliczano ΔT jako stosunek temperatury w danym punkcie pomiarowym do temperatury początkowej, wyrażony w procentach.

Tab. 9.9. Zestawienie roztworów i zawiesin substancji poddanych badaniu zmian termodynamicznych cieczy rozpylanej podczas trwania procesu atomizacji z uwzględnieniem zastosowanych nebulizatorów

Substancje modelowe					
Substancja		Stężenie	Substancja		Stężenie
NaCl		0,9% (w/v)	glukoza		50% (w/v)
		5% (w/v)			80% (w/v)
Tween 80		0,01% (v/v)	BAC		0,01% (v/v)
		0,1% (v/v)			0,1% (v/v)
Leki inhalacyjne					
Roztwory			Zawiesiny		
R4			Z1, Z3 i Z5		
Biosurfaktanty					
Substancja	Oznaczenie	Stężenie	Substancja	Oznaczenie	Stężenie
Escyna	Esc	0,0175% (w/v)	L-Leucyna	L-Leu	0,9% (w/v)
		0,035% (w/v)			1,1% (w/v)
Polisacharydowe modyfikatory lepkości					
Substancja	Oznaczenie	Stężenie	Substancja	Oznaczenie	Stężenie
Guma ksantanowa	XG	2 mg/ml	Agar	AG	2 mg/ml
		3 mg/ml			3 mg/ml

Pomiary wpływu procesu atomizacji zawiesin na rozpad agregatów cząstek API

Ocenę zmian w strukturze agregatów cząstek leków tworzących fazę rozproszoną w zawiesinach przeznaczonych do inhalacji przeprowadzono, stosując dwie techniki:

- a) spektrofotometryczną (spektrofotometr GENESYS™ 10S UV-Vis; ThermoFisherScientific) przy długości fali 540 nm w 25°C;
- b) obserwację mikroskopową z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) TM – 1000 (HITACHI, Japonia) i przy zastosowaniu powiększenia zdjęć 2500x i 5000x, a następnie analizy zdjęć przy pomocy oprogramowania ImageJ.

A. Metoda spektrofotometryczna – przygotowanie próbek i analiza danych

Procedura pomiarowa była analogiczna do metodyki pomiarowej opisanej w podrozdziale 9.1.4. Zawiesiny Z1 i Z2 poddano atomizacji przy użyciu VMN-2 i VMN-3, którą kontynuowano do osiągnięcia objętości rezydualnej RV cieczy w komorze nebulizacyjnej. W każdym z przypadków poddano analizie spektrofotometrycznej po trzy próbki w trzech powtórzeniach: (i) próba kontrolna – zawiesina przed atomizacją, (ii) skolekcjonowany aerozol (aerozol rozpylano w zamkniętym naczyniu, w którym ulegał wykropleniu na ściankach) (iii) lek pozostały w komorze nebulizatora po osiągnięciu objętości rezydualnej. Zebrane próbki (ii) i (iii) oraz próba kontrolna zostały dokładnie wymieszane tuż przed umieszczeniem w spektrofotometrze. Rejestrację zmian absorbancji ΔAbs , tj. stosunek absorbancji do absorbancji początkowej wyrażonej w procentach, prowadzono przez 2h.

B. Obserwacje mikroskopowe – przygotowanie próbek i analiza danych

Procedurę pomiarową oraz analizę danych przeprowadzono w sposób analogiczny do metodyki pomiarowej przedstawionej w podrozdziale 9.1.5. Zawiesiny leków inhalacyjnych Z1-Z4 poddano atomizacji za pomocą nebulizatorów VMN-1 i VMN-2 aż do osiągnięcia objętości rezydualnej RV w komorze nebulizacyjnej. W każdym przypadku mierzono po dwie próbki w trzech powtórzeniach: (i) próba kontrolna – zawiesina przed atomizacją, (ii) skolekcjonowany aerozol (wykroplony po rozpyleniu). Następnie, cząstki stałe API zostały wydzielone z cieczy oraz przygotowane do obserwacji pod mikroskopem SEM wg procedury opisanej w podrozdziale 9.1.5.

9.2.4.4. Pomiar objętości rezydualnej wybranych nebulizatorów w warunkach nebulizacji roztworów i zawiesin o różnych właściwościach fizykochemicznych

Badanie wpływu właściwości fizykochemicznych wybranych roztworów i zawiesin (dokładną listę użytych cieczy zamieszczono w tabeli – Tab. 9.10.) na objętość rezydualną nebulizatorów pneumatycznych JN-1 i JN-2 oraz membranowych VMN-1, VMN-2 i VMN-3 przeprowadzono metodą grawimetryczną (waga analityczna SECURA 225D – 1CEU Sartorius, Niemcy). Po zważeniu pustej komory (głowicy) nebulizacyjnej oraz napełnieniu jej badaną cieczą prowadzono atomizację do momentu wystąpienia przerw emisji aerozolu lub nagłego całkowitego ustania procesu. Następnie ważono komorę nebulizacyjną. Objętość rezydualną wyznaczono odejmując masę pustej głowicy od masy głowicy z cieczą po nebulizacji oraz dzieląc uzyskaną wartość przez gęstość cieczy (równą w przybliżeniu gęstości wody). Z uzyskanych wyników wyliczono wartości średnie RV dla trzech powtórzeń.

Tab. 9.10. Zestawienie roztworów i zawiesin substancji poddanych badaniu zmian masy objętości rezydualnej nebulizatorów

Substancje modelowe			
Substancja	Stężenie	Substancja	Stężenie
Chlorek sodu	0,9% (w/v)	Cytrynian sodu	0,9% (w/v)
	5% (w/v)		5% (w/v)
	10% (w/v)		10% (w/v)
Gliceryna	28% (v/v)	Glukoza	30% (w/v)
	50% (v/v)		50% (w/v)
	62% (v/v)		80% (w/v)
Tween 80	0,001% (v/v)	BAC	0,001% (w/v)
	0,01% (v/v)		0,01% (w/v)
	0,1% (v/v)		0,1% (w/v)
Leki inhalacyjne			
Roztwory		Zawiesiny	
R1 i R4		Z1 i Z5	

9.3. Oddziaływanie aerozolu z surfaktantem płucnym

9.3.1. Obliczenia z zastosowaniem modelu MPPD

W celu uzyskania szacunkowej wartości stężenia aerozolu zdeponowanego na powierzchni pęcherzyków płucnych zastosowano obliczenia modelowe MPPD (podrozdział **Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.**). W niniejszej pracy założono depozycję aerozolu u dorosłego człowieka, będącego w pozycji pionowej i oddychającego spoczynkowo tylko przez usta. Obliczenia przeprowadzono przy założeniu braku *klirensu* oraz dla gęstości materiału kropeł równej 1000 kg/m^3 . Parametrami wprowadzanymi do modelu były $D_v(50)$ oraz GSD, uzyskane z analizy rozkładu wielkości kropeł. Szczegółowe dane implementowane do modelu zamieszczono w tabeli 9.11. Przy założeniu idealnej, równomiernej depozycji leku w warstwie płynu pokrywającego pęcherzyki płucne (tj. zawierającego surfaktant płucny) podczas atomizacji 2 ml (standardowa objętość ampułki) farmaceutyku, obliczono nominalny stosunek leku do cieczy pęcherzykowej, zakładając jej całkowitą objętość równą 30 ml(297). W obliczeniach uwzględniono sprawność depozycji w obszarze pęcherzyków płucnych kropeł o wielkościach wyznaczonych przy pomocy metodyki przedstawionej w podrozdziale 9.2.3. Stosunek ten wyraża objętość farmaceutyku zdeponowanego do objętości całej mieszaniny (MPS+lek). Oszacowanie stężeń pozostałych substancji rozpylonych przeprowadzono w analogiczny sposób.

Tab. 9.11. Dane zaimplementowane do modelu MPPD

MORFOMETRIA DRÓG ODDECHOWYCH	
Model morfometryczny płuc	Yeh – Schum (5 – płatowy)
Czynnościowa objętość zalegająca	3300 ml
Objętość górnych dróg oddechowych	50 ml
WŁAŚCIWOŚCI AEROZOLU	
Gęstość materiału kropeł aerozolu	1000 kg/m^3
Średnica kropeł	MMAD, dane otrzymane z pomiaru dyfraktometrem laserowym
GSD	dane otrzymane z pomiaru dyfraktometrem laserowym
WARUNKI EKSPOZYCJI UKŁADU ODDECHOWEGO NA AEROZOL	
Ekspozycja	stała
Orientacja ciała	pionowa
Częstotliwość oddychania	12 oddechów/min (oddech spoczynkowy)
Objętość oddechowa	625 ml
Udział czasu wydechu w cyklu oddechowym	0,5
Sposób oddychania	tylko przez usta
WARUNKI DEPOZYCJI AEROZOLU	
Czy obliczenia uwzględniają <i>klirens</i> płuc?	NIE - tylko depozycja

9.3.2. Pomiar interakcji z surfaktantem płucnym

9.3.2.1. Badanie interakcji wdychanych aerozoli z surfaktantem płucnym w pomiarach oscylacyjnych z wykorzystaniem lipidowego modelu surfaktantu płucnego (LM)

Przygotowanie próbek

Badanie interakcji pomiędzy zdeponowanym aerozolem i LM przeprowadzono na przykładzie leków inhalacyjnych, których pełną listę wraz z użytymi stężeniami przedstawiono w Tab. 9.12. Model LM przygotowano poprzez rozpuszczenie w stosunku molowym 8:2 w chloroformie 1,2-Dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholinę i cholesterolu (1 mg/ml) w temperaturze pokojowej oraz w warunkach intensywnego mieszania.

Tab. 9.12. Zestawienie roztworów i zawiesin substancji poddanych badaniu interakcji pomiędzy zdeponowanym aerozolem a surfaktantem płucnym na podstawie analizy powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz w obecności modelu lipidowego surfaktantu płucnego (LM) w fazie jej stałej kompresji

Substancje modelowe			
Substancja	Stężenie	Substancja	Stężenie
Tween 80	0,001% (v/v)	NaCl	0,9% (w/v)
Leki inhalacyjne			
Zawiesiny		Z1-Z4	

Wytworzenie powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz

Subfazę wodną (woda ultraczysta) utworzono w termostatowanym korycie umieszczonej na stole antywibracyjnym wagi Langmuir'a-Wilhelmy'ego model KSV NIMA (wymiar: 364 x 75 x 4mm - Biolin Scientific, Finlandia). Przygotowaną mieszaninę lipidów wkraplano za pomocą mikrostrzykawki chromatograficznej (Hamilton, USA) na subfazę wodną. Po rozprowadzeniu monowarstwy pozostawiono ją na kilka minut w celu odparowania rozpuszczalnika i równomiernego samoistnego rozłożenia molekuł DPPC i CHOL na powierzchni międzyfazowej (stan gazowy).

Pomiar ciśnienia powierzchniowego w fazie stałej kompresji GLI

W celu zbadania wpływu aerozolu leczniczego inhalowanego podczas nebulizacji wybranych leków (Tab. 9.12.) w układzie pomiarowym wagi Langmuir'a-Wilhelmy'ego, zastosowano farmaceutyki wprowadzone ilościowo do subfazy. Leki wkraplano pod powierzchnię wytworzonej monowarstwy, tak aby ich końcowe stężenie w układzie wynosiło 0,018 ml/ml (wartość przyjęta na podstawie przedstawionych w niniejszej pracy badań przeprowadzonych zgodnie z metodyką 9.3.1). Pomiar ciśnienia powierzchniowego (π) prowadzono podczas symetrycznej kompresji GLI na skutek przesuwania się barierki z prędkością 40 mm/min. Wszystkie pomiary przeprowadzono w $36,6 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Obserwacje mikroskopowe BAM

W celu wizualizacji struktur formujących się na powierzchni międzyfazowej podczas jednostajnej kompresji GLI, zastosowano mikroskopię kąta Brewster'a. Zdjęcia wykonano po wcześniej przeprowadzonej analizie wyników pomiarów ciśnienia powierzchniowego. Pozwoliło to wykonać je w warunkach odpowiadających różnym stanom monowarstwy. Szczegółowy opis aparatury pomiarowej oraz podstawy teoretyczne jej działania zamieszczono w załączniku (Z.9.2).

Analiza wyników

Na podstawie otrzymanych danych wyznaczono izotermy π -A, które posłużyły do obliczenia współczynnika ściśliwości powierzchni (c_s^{-1}). Jednocześnie wyniki wsparto oceną przeprowadzoną za pomocą obserwacji mikroskopowych BAM. Na podstawie analizy charakterystyki zmian powierzchni międzyfazowej w wyniku obecności farmaceutyków oceniono interakcje lek-surfaktant płucny.

9.3.2.2. Badanie interakcji wdychanych aerozoli z surfaktantem płucnym w pomiarach oscylacyjnych z wykorzystaniem modelu wieloskładnikowego (MPS)

Przygotowanie próbek

Badanie interakcji pomiędzy nebulizowanymi substancjami i MPS przeprowadzono dla wybranych roztworów oraz zawiesin, których pełną listę wraz z użytymi stężeniami przedstawiono w Tab. 9.13. Ze względu na ograniczenia techniczne nie było możliwe wprowadzanie do PS nebulizowanych substancji w formie aerozolu, dlatego zdecydowano się na sporządzanie mieszanin ciekłych odpowiadających składem stanowi po inhalacji. Wartość stężenia dodatku została uzyskana na podstawie wyników otrzymanych we wcześniejszych częściach pracy badawczej oraz wyliczeniom modelowym. Model MPS (Tab. 8.1.) przygotowano poprzez rozcieńczenie wodą ultraczystą preparatów Infasurf® lub Curosurf® do stężenia fosfolipidów na poziomie 5 mg/ml. Korzystano z dwóch produktów ze względu na trudności z pozyskaniem tylko jednego z nich w ilości wymaganej do przeprowadzenia wszystkich wymaganych badań. Próbkę kontrolną przygotowano przez rozcieńczenie wodą ultraczystą w stosunku objętościowym 1:1, tak aby uzyskać stężenie fosfolipidów równe 2,5 mg/ml. Z kolei próbki badawcze uzyskano przez rozcieńczenie w stosunku 1:1 roztworu surfaktantu o zawartości fosfolipidów równej 5 mg/ml roztworami lub zawiesinami leków lub substancji stosowanych do modyfikacji właściwości fizykochemicznych o stężeniu prowadzącym do uzyskania zadanej finalnej koncentracji w próbce o stężeniu (0,018 ml/ml) fosfolipidów równym 2,5 mg/ml.

Pomiar dynamiczny napięcia powierzchniowego

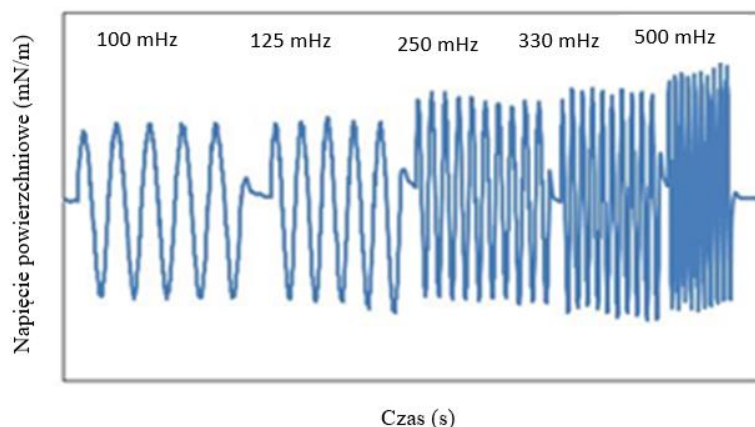
Urządzenie PAT-1M (Rys. 9.1.) umożliwia prowadzenie pomiarów dynamicznej aktywności powierzchniowej metodą wiszącej kropli (stała powierzchnia) lub metodą oscylującej kropli (sinusoidalne deformacje powierzchni) w temperaturze fizjologicznej ($36,6 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$). Badania prowadzone przy sinusoidalnych zmianach GLI pozwalają symulować dynamikę tej powierzchni w pęcherzykach płucnych podczas oddychania. Umożliwiają one charakterystykę właściwości filmu międzyfazowego wokół wartości równowagowej napięcia powierzchniowego. Każdy eksperyment składał się z dwóch etapów: (i) generowania nowej granicy faz gaz-ciecz (wiszącej kropli na końcu kapilary) i doprowadzenia GLI do stanu równowagi (szczegółowy opis zamieszczono w podrozdziale 9.1.2) oraz (ii) wywołania zaprogramowanych oscylacji kropli o zadanej amplitudzie (przyjęto 10% powierzchni początkowej) i zmiennej częstotliwości. Etap (i) umożliwia śledzenie zmian chwilowego napięcia powierzchniowego, aż do momentu osiągnięcia równowagi (przyjęto założenie, że osiągnięcie równowagi następuje maksymalnie do 10 min od uformowania kropli). W etapie (ii) (czas >10 min) przeprowadza się sinusoidalne deformacje (pulsacje) powierzchni ze zmienną częstotliwością ($f=100, 125, 250, 330$ i 500 mHz). Wartości f zostały dobrane jako odpowiadające częstości oddychania człowieka w różnych stanach aktywności fizycznej(298). Każda seria oscylacji została poprzedzona kilkusekundową przerwą, w celu przywrócenia napięcia powierzchniowego do wartości równowagowej oraz początkowej wielkości pola powierzchni kropli, A_0 (Rys. 9.6.).

Analiza wyników

Cykliczne ekspansje i kompresje GLI w obecności MPS pozwoliły na wyznaczenie histerezy napięcia powierzchniowego σ -A, a następnie ocenę wpływu substancji obecnych w nebulizowanych cieczach na surfaktant płucny w oparciu o wybrane kryteria ilościowe tj. indeksu stabilności SI , znormalizowanego pola histerezy napięcia powierzchniowego HAn oraz parametry reologiczne, w tym kąt przesunięcia fazowego φ . Rolę tych parametrów w charakterystyce histerezy σ -A i analizie interakcji pomiędzy zdeponowanym aerozolem a MPS przedstawiono w podrozdziale 5.4.5.

Tab. 9.13. Zestawienie roztworów i zawiesin substancji poddanych badaniu interakcji z surfaktantem płucnym modelu MPS i przy użyciu sinusoidalnej oscylacji tej powierzchni

Substancje modelowe								
Substancja	Stężenie		Substancja	Stężenie				
Tween 80	0,01% (w/v)		BAC	0,01% (w/v)				
	0,1% (v/v)			0,1% (v/v)				
Leki inhalacyjne								
Roztwory			Zawiesiny					
R1-R5			Z1-Z6					
Biosurfaktanty								
Substancja	Oznaczenie	Stężenie	Substancja	Oznaczenie	Stężenie			
Escyna	Esc	0,0175% (w/v)	L-Leucyna	L-Leu	0,9% (w/v)			
		0,035% (w/v)			1,1% (w/v)			
Polisacharydowe modyfikatory lepkości								
Subst.	Ozn.	Stężenie	Subst.	Ozn.	Stężenie	Subst.	Ozn.	Stężenie
Guma ksantanowa	XG	2,0 mg/ml	Agar	AG+ 0,9% NaCl	2,0 mg/ml	Hialuronian sodu	SH	2,0 mg/ml
		3,0 mg/ml			3,0 mg/ml			3,0 mg/ml
Guma ksantanowa + sól fizjolog.	XG+ 0,9% NaCl	2,0 mg/ml	Agar + sól fizjolog.	AG+ 0,9% NaCl	2,0 mg/ml	Hialuronian sodu + sól fizjolog.	SH+ 0,9% NaCl	2,0 mg/ml
		3,0 mg/ml			3,0 mg/ml			3,0 mg/ml



Rys. 9.6. Zmiana napięcia powierzchniowego podczas generowanych deformacji GLI o częstotliwościach $f = 100, 125, 250, 330$ i 500 MHz.

10. Wyniki i ich omówienie

10.1. Charakterystyka właściwości fizykochemicznych badanych cieczy

10.1.1. Właściwości fizykochemiczne roztworów substancji modelowych

W tabeli (Tab. 10.1.) zamieszczono średnie wartości parametrów fizykochemicznych badanych roztworów substancji modelowych: przewodności elektrolitycznej, równowagowego napięcia powierzchniowego oraz lepkości. Otrzymane wartości są zgodne z danymi literaturowymi i zostały wykorzystane podczas analizy wyników w dalszej części pracy. Przykładowo sól fizjologiczna w temperaturze 25 °C cechuje się podwyższoną przewodnością elektrolityczną na poziomie 12 mS/cm w stosunku do wody (0,005 mS/cm), i wyraźnie niższą niż 10% wodnego roztworu NaCl⁽²⁹⁸⁾. Roztwory substancji modyfikujących lepkość są płynami niutonskimi (Załącznik Rys. 10.Z.1). Dodatek glukozy podnosi wartość lepkości z 0,89 mPas (woda w temperaturze 25 °C) do 3,3 mPas w przypadku roztworów 50%(w/v) i 7,5 mPas przy stężeniu 80%(w/v)⁽²⁹⁹⁾.

Tab. 10.1. Właściwości fizykochemiczne wybranych substancji modelowych w temperaturze 25°C (wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe)

	Substancje modyfikujące przewodność elektrolityczną					
	chlorek sodu			cytrynian sodu		
	0,9% (w/v)	5% (w/v)	10% (w/v)	0,9% (w/v)	5% (w/v)	10% (w/v)
przewodność elektrolityczna κ (mS/cm)	12,04 $\pm$ 0,04	55,65 $\pm$ 0,21	93,10 $\pm$ 0,71	5,08 $\pm$ 0,06	19,77 $\pm$ 0,08	30,75 $\pm$ 0,07
	Substancje modyfikujące lepkość					
	gliceryna (GLY)			glukoza (GLU)		
	28% (v/v)	50% (v/v)	62% (v/v)	30% (w/v)	50% (w/v)	80% (w/v)
lepkość dynamiczna μ (mPas)	2,20 $\pm$ 0,08	6,20 $\pm$ 0,23	13,50 $\pm$ 1,01	1,98 $\pm$ 0,10	3,33 $\pm$ 0,05	7,52 $\pm$ 0,19
	Substancje modyfikujące napięcie powierzchniowe					
	Tween 80			chlorek benzalkoniowy (BAC)		
	0,001% (v/v)	0,01% (v/v)	0,1% (v/v)	0,001% (w/v)	0,01% (w/v)	0,1% (w/v)
równowagowe napięcie powierzchniowe σ_{eq} (mN/m)	51,37 $\pm$ 0,11	41,00 $\pm$ 0,08	38,91 $\pm$ 0,54	70,47 $\pm$ 0,54	64,22 $\pm$ 0,28	36,96 $\pm$ 0,46
	Tween 80+0,9% NaCl			BAC +0,9% NaCl		
	0,001% (v/v)*	0,01% (v/v)*	0,1% (v/v)*	0,001% (w/v)*	0,01% (w/v)*	0,1% (w/v)*
równowagowe napięcie powierzchniowe σ_{eq} (mN/m)	51,27 $\pm$ 0,08	39,64 $\pm$ 0,18	37,65 $\pm$ 0,37	57,47 $\pm$ 0,33	35,92 $\pm$ 0,8	32,58 $\pm$ 0,29

*Wartość odnosi się do stężenia surfaktantu

Dodatek substancji powierzchniowo czynnych modyfikuje w wyraźny sposób napięcie powierzchniowe, którego zmierzona wartość dla wody o temperaturze 25 °C wynosi 71,7 mN/m (pomiar metodą wiszącej kropli). Przykładowo, 0,01% wodny roztwór Tween 80 charakteryzuje się σ równowagowym na poziomie 41,0 mN/m, a 0,01% roztwór BAC równowagowym napięciem powierzchniowym 64,2 mN/m. Dodatek elektrolitu chlorku sodu w stężeniu 0,9% ma za zadanie zapewnić izotoniczność roztworu, co jest istotne w kontekście tematyki pracy i użyteczności badań pod kątem potencjalnych zastosowań w farmaceutykach. Aniony i kationy zdysocjowanej soli mogą oddziaływać z molekułami surfaktantów jonowych, obniżając wartości napięcia powierzchniowego w stosunku do roztworów pozbawionych elektrolitów^(300,301). W przypadku próbek zawierających surfaktant kationowy (BAC) oraz chlorek sodu widoczne jest obniżenie równowagowego napięcia powierzchniowego w całym zakresie badanych stężeń. Jednak w przypadku surfaktantu niejonowego (Polisorbat 80) z dodatkiem NaCl nie powoduje znaczących zmian w stosunku do próbek, gdzie rozpuszczalnikiem jest czysta woda.

10.1.2. Właściwości fizykochemiczne leków inhalacyjnych

W tabeli (Tab. 10.2.) zamieszczono wartości parametrów fizykochemicznych badanych leków inhalacyjnych występujących w postaci roztworów oraz zawiesin. Przebadano wybrane produkty pod kątem ich równowagowego napięcia powierzchniowego oraz lepkości dynamicznej. Leki w postaci roztworów (R1-R5) nie różnią się właściwościami reologicznymi – ich lepkość jest jedynie nieznacznie wyższa w stosunku do lepkości czystej wody w temperaturze 25°C. Wszystkie roztwory są typowymi płynami niutonowskimi (Załącznik Rys. 10.Z.2). Natomiast roztwory te cechują się zróżnicowanymi wartościami napięcia powierzchniowego. Składniki zawarte w lekach R1-R5 wykazują właściwości powierzchniowo czynne, obniżając równowagowe napięcie powierzchniowe aż do wartości 29,38 mN/m (lek R2). Największą wartością napięcia powierzchniowego charakteryzuje się lek R5. Leki te posiadają w swym składzie chlorek benzalkoniowy, który jako substancja dodatkowa (konserwant) odpowiada za obniżenie σ .

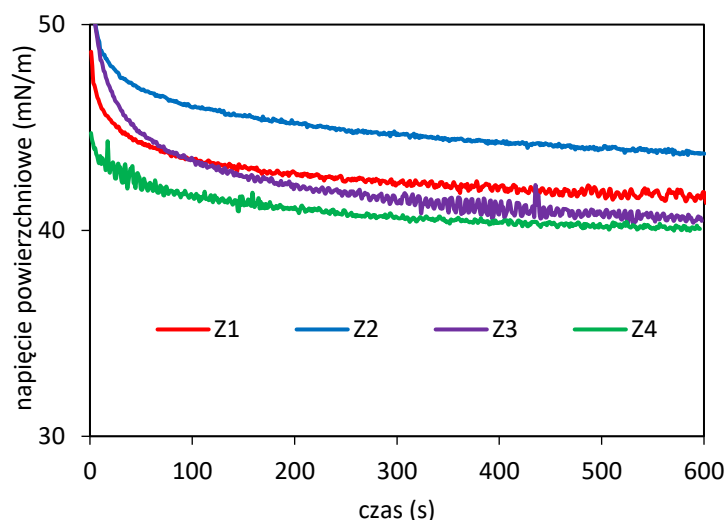
Leki w postaci zawiesin można zakwalifikować do dwóch grup pod względem lepkości. Leki Z1-Z4 cechują się lepkością pozorną równą lub zbliżoną do wartości czystej wody w 25°C. Natomiast farmaceutyki Z5-Z6 posiadają lepkość porównywalną do leków w postaci roztworu (R1-R5). Wszystkie zawiesiny, podobnie do leków w postaci roztworów to płyny niutonowskie. Leki Z1-Z6 charakteryzują się podobnymi, obniżonymi w stosunku do wartości czystej wody, wartościami napięcia powierzchniowego rzędu 39 mN/m. W lekach tych

zastosowano substancje pomocnicze będące surfaktantami tj. Tween 20 i Tween 80 i to właśnie te substancje odpowiadają za niską wartość σ .

Tab. 10.2. Właściwości fizykochemiczne wybranych leków inhalacyjnych w temperaturze 25°C (wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe)

	Roztwory leków inhalacyjnych					
	R1	R2	R3	R4	R5	
lepkość (mPas)	2,74±0,28	2,55±0,06	2,33±0,17	2,41±0,04	2,44±0,01	
równowagowe napięcie powierzchniowe (mN/m)	40,84±0,41	29,38±0,23	56,14±0,58	35,32±0,33	59,43±1,89	
	Zawiesiny leków inhalacyjnych					
	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6
lepkość (mPas)	0,87 ±0,05	0,89 ±0,08	1,17 ±0,23	0,92 ±0,07	2,25 ±0,12	2,53 ±0,20
równowagowe napięcie powierzchniowe (mN/m)	42,14 ±0,07	38,50 ±0,36	38,75 ±1,02	37,07 ±0,38	38,30 ±0,34	40,60 ±0,32

Interesująca jest również analiza różnic na podstawie właściwości fizykochemicznych pomiędzy lekiem oryginalnym a lekami generycznymi. Na przykładzie zawiesin Z1-Z4, w których produktem oryginalnym jest Z1, porównano ich dynamiczne napięcie powierzchniowe (Rys. 10.1.). Przebieg krzywych dynamicznego napięcia do osiągnięcia wartości równowagowej, σ_{eq} jest również dowodem różnic w składzie leków. Zmierzone właściwości zostały wykorzystane do analizy wyników w dalszej części pracy.

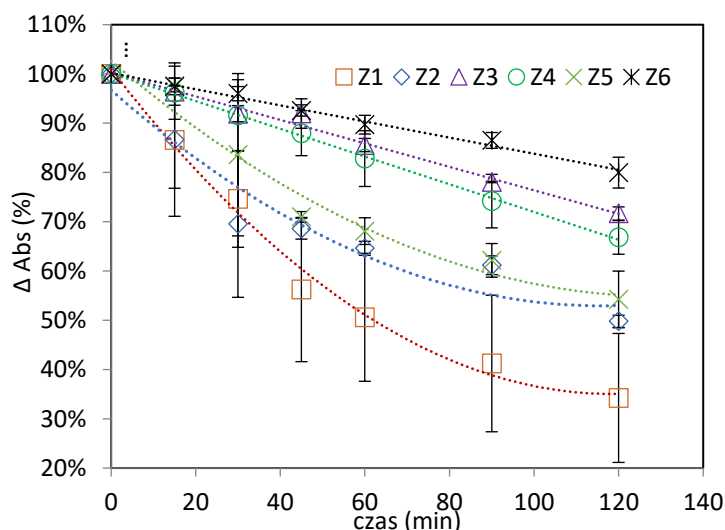


Rys. 10.1. Zmiana dynamicznego napięcia powierzchniowego przez zawiesiny leków inhalacyjnych Z1-Z4 (25 °C)

10.1.2.1. Stabilność zawiesin leczniczych

Na Rys. 10.2. pokazano zmianę wartości absorbancji zmierzonej w wybranych farmaceutykach w postaci zawiesin (Z1-Z6) w czasie 2h. Można stwierdzić, że zawiesiny tych leków cechują się dużą niestabilnością, na co wskazują zmiany względnej absorbancji. Przebieg

krzywych ma charakter nieliniowy (Z1, Z2 i Z5) lub zbliżony do liniowego (Z3, Z4 i Z6), co pokazuje, że kinetyka sedymentacji dla poszczególnych leków różni się. Porównanie przebiegu krzywych pokazuje, że zawiesina Z1 ulega szybszemu i silniejszemu sklarowaniu (ilustrowanym spadkiem średniej ΔAbs do ok. 43%) niż pozostałe zawiesiny cząstek budezonidu, w tym Z2 (do ok. 50%), Z3 (do ok. 72%), Z4 (do 67%), czy zawiesiny mikronizowanego propionianu flutykazonu, tj. Z5 (do 5%) oraz Z6 (do 80%). Otrzymane wyniki potwierdzają także że cząstki API mogą tworzyć agregaty ulegające sedymentacji. Różnice między przebiegiem procesu sedymentacji (klarowania) wynikają z właściwości formulacji składu leków tj.: wielkości cząstek leku, ich tendencji do agregacji i różnego stężenia dodatków (stabilizatorów oraz konserwantów), co różni leki o tej samej zawartości API (np. lek oryginalny i generyczny).



Rys. 10.2. Krzywe ilustrujące klarowanie się (sedymentację) zawiesin Z1-Z6, pozwalające na ocenę ich stabilności

10.1.2.2. Morfologia oraz rozmiar cząstek fazy rozproszonej zawiesin leczniczych

Z analizy zdjęć pokazanych w dalszej części pracy (Rys. 10.35 i 10.36 Z1-Z4 A – str. 158) wynika, że cząstki zawiesin leczniczych (API w tych lekach to budezonid) są niesferyczne i charakteryzują się dużą nieregularnością w kształcie. Według farmakopealnych sformułowań, cząstki API zawiesin Z1-Z4 charakteryzują się różnorodnością kształtu, ale podobnymi wymiarami w długości i szerokości. Cząstki te mają w większości zaokrąglone krawędzie, a ich powierzchnia jest stosunkowo gładka z niewielkimi chropowatościami. Z kolei wśród cząstek zawiesin Z5 i Z6 są liczne ziarna niesferyczne o strukturze płytkowej, ostrych krawędziach i chropowatej powierzchni (pokazano to dodatkowo w Załączniku Rys. 10.Z.3.). Cząstki badanych farmaceutyków charakteryzują się również szerokim rozkładem wielkości. Z analizy długości oraz szerokości (stosowanych przy opisie niesferycznych cząstek wg Rys.

9.4), wynika, że rozkłady wielkości cząstek zawiesin Z1-Z6 charakteryzują się dużą rozpiętością, w zawiesinach znajdują się zarówno cząstki bardzo małe o długości poniżej 1 μm oraz bardzo duże, o długości powyżej 5,5 μm . Zawiesiny Z1, Z2, Z5 i Z6 cechują się wysoką zawartością cząstek o rozmiarach z zakresu 1-3 μm . Można zaobserwować tu także cząstki o rozmiarach powyżej 6 μm oraz bardzo niewielkie, tj. mniejsze od 0,7 μm . Natomiast, zawiesiny Z3 i Z4 cechują się licznymi cząstkami o wymiarach z zakresu 0,5-2 μm , ale również tutaj obserwowane są znacznie większe cząstki (4 μm i powyżej). Analizując ogólny obraz wszystkich cząstek API zaobserwowano, że mają one tendencję do tworzenia agregatów. Odnotowane wielkości pojedynczych cząstek oraz ich tendencja do agregacji mogą wpływać na przebieg procesu nebulizacji, zwłaszcza w nebulizatorze z membraną (VMN), co będzie przedmiotem badań przedstawionych w podrozdziale 10.2.3.

10.1.3. Właściwości fizykochemiczne modyfikatorów lepkości pochodzenia naturalnego

Analiza zależności naprężeń stycznych od szybkości ścinania ($\tau = f(\dot{\gamma})$), wskazuje, że roztwory substancji modyfikujących lepkość to płyny nieniu-tonowskie rozrzedzane ścinaniem (Załącznik Rys. 10.Z.4 oraz Tab. 10.3.). Można to wytłumaczyć wpływem ścinania na zmianę przestrzennego ułożenia polisacharydów, a przede wszystkim ich uporządkowania i wzajemnego przenikania. Zmiany właściwości reologicznych pod wpływem ścinania porównano za pomocą wskaźników modelu potęgowego Ostwalda-de-Waale'a (równanie 9.3). Współczynnik konsystencji k rośnie a wskaźnik płynięcia n maleje wraz ze wzrostem stężenia.

Tab. 10.3. Właściwości fizykochemiczne wybranych substancji pochodzenia naturalnego modyfikujących lepkość w temperaturze 25 °C.

Substancje modyfikujące lepkość pochodzenia naturalnego														
hialuronian sodu - SH					guma ksantanowa - XG					agar - AG				
stęż. polisacharydu (mg/ml)	wskaźniki modelu potęgowego				stęż. polisacharydu (mg/ml)	wskaźniki modelu potęgowego				stęż. polisacharydu (mg/ml)	wskaźniki modelu potęgowego			
	woda		0,9%NaCl			woda		0,9%NaCl			woda		0,9%NaCl	
	k (Pas)	n (-)	k (Pas)	n (-)		k (Pas)	n (-)	k (Pas)	n (-)		k (Pas)	n (-)	k (Pas)	n (-)
0,8	0,01	0,91	0,002	0,99	1,5	0,21	0,44	0,16	0,44	1,5	0,07	0,60	0,01	0,73
1,5	0,02	0,97	0,005	0,96	2,0	0,40	0,38	0,29	0,39	2,0	0,22	0,44	0,02	0,71
2,0	0,02	0,94	0,005	0,99	3,0	0,79	0,32	0,79	0,29	3,0	1,03	0,37	0,49	0,36

Ze względu na potencjalne zastosowanie polisacharydowych modyfikatorów lepkości w formulacjach leków inhalacyjnych, sprawdzono również wpływ obecności jonów soli na parametry reologiczne. Dodatek soli w przypadku każdego roztworu obniżył wartość lepkości

pozornej w każdym punkcie krzywej płynięcia (Rys. 10.Z.4.), co znalazło wyraz również w zmianie wartości współczynników modelu potęgowego. Wartość k zmniejszyła się dla SH i dla XG. Jednakże analizując krzywe płynięcia zauważono spadek lepkości pozornej roztworów XG w obecności NaCl (Rys. 10.Z.4.). Obecność kationów sodowych i anionów chlorkowych ma także niejednoznaczny wpływ na współczynniki n i k roztworów agaru.

W przypadku hialuronianu sodu obserwowane zależności mogą wynikać z wpływu kationów sodowych na strukturę powłoki solwatacyjnej wokół molekuł SH. SH to ujemnie naładowany polisacharyd, który w roztworach wodnych wykazuje tendencję do tworzenia w sposób losowy silnie spęczniałych struktur. Oddziaływania jonów kationowych ze szkieletem molekuly SH inicjuje jednak reorganizację jej struktury, czego efektem jest zmniejszenie jej rozmiaru przestrzennego. Jest to częściowo związane z utworzeniem struktur przypominających „spinki do włosów”, których obecność powoduje przede wszystkim skracanie łańcuchów SH⁽³⁰²⁾, co może przekładać się na zmianę właściwości reologicznych.

Jak wskazują otrzymane wyniki, właściwości reologiczne XG, jako anionowego polielektrolitycznego biopolimeru⁽³⁰³⁾, są także zależne od obecności jonów w roztworze, które najprawdopodobniej wpływają na przestrzenną konformację biopolimeru. W obecności jonów soli szkielet pojedynczej molekuly ulega przegrupowaniu i częściowa elastyczność łańcucha, która wciąż jest obserwowana w roztworach bez soli, zanika, więc łańcuchy stają się sztywne^(304–306). Ostateczny wpływ na właściwości reologiczne roztworu zależy od stężenia biopolimeru i jego masy cząsteczkowej. W układach mniej stężonych, przy mniejszych szybkościach ścinania, nie obserwuje się zmian lepkości, natomiast w układach bardziej stężonych zauważalny jest wzrost lepkości⁽³⁰⁷⁾. Sztywność łańcucha XG również spowalnia dyfuzję w roztworze i może przeciwdziałać deformacjom powierzchni wywołanym przez zaburzenia zewnętrzne.

Dodatkowo, należy wziąć pod uwagę zależność właściwości reologicznych od temperatury, co może mieć znaczenie w kontekście zastosowania biopolimerów w formulacjach leczniczych. Wzrost temperatury zwiększa ruchliwość segmentów molekuł, co utrudnia powstawanie stabilnej przestrzennej struktury łańcuchów makromolekuł. Prowadzi to do zmniejszenia rzeczywistego współczynnika tarcia wewnętrznego w cieczy, co pociąga za sobą spadek lepkości pozornej. Jest on szczególnie charakterystyczny dla roztworów makromolekuł rozgałęzionych⁽³⁰⁸⁾. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że podczas atomizacji w nebulizatorach pneumatycznych może dochodzić do obniżenia temperatury atomizowanej cieczy, to efekt może być odwrotny, tzn. zmiana warunków tworzenia kropel może wynikać ze wzrostu lepkości nebulizowanej cieczy.

10.1.4. Właściwości fizykochemiczne modyfikatorów napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego

Analizując wartości równowagowego napięcia powierzchniowego substancji powierzchniowo czynnych pochodzenia naturalnego (przedstawione w Tab. 10.4.) zauważono, podobną zależność w odniesieniu do ich stężenia co w przypadku Tween 80 i BAC. Pomiary przeprowadzone metodą wiszącej kropli wskazują, że substancje te obniżają napięcie powierzchniowe z poziomu 71,7 mN/m dla wody w 25 °C oraz 70,8 mN/m dla soli fizjologicznej do nawet 45,4 mN/m, w przypadku dodatku escyny (Esc) w stężeniu 0,0175% (bez NaCl). Jest to wartość porównywalna do 0,01% Tweenu 80 i zarazem jest to najniższa wartość napięcia powierzchniowego, którą osiągnięto stosując analizowane substancje pochodzenia naturalnego. Najniższa wartość w przypadku L-leucyny (Leu) wynosiła 68,7 mN/m (co jest wartością zbliżoną do 0,01% BAC - 64,2 mN/m), a w przypadku lecytyny (Lec) - 57,6 mN/m. Tak jak w przypadku badanych surfaktantów syntetycznych, spadek napięcia powierzchniowego wraz ze wzrostem stężenia utrzymuje się do osiągnięcia tzw. krytycznego stężenia micelizacji, po którym następuje stabilizacja, ew. niewielki wzrost wartości σ . Efekt ten obserwowany jest m.in. w przypadku Esc oraz Lec rozpuszczonej w wodzie.

Tab. 10.4. Właściwości fizykochemiczne wybranych substancji pochodzenia naturalnego modyfikujących napięcie powierzchniowe w temperaturze 25 °C (wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe)

Substancje modyfikujące napięcie powierzchniowe pochodzenia naturalnego								
Escyna			L-Leucyna			Lecytyna sojowa		
stężenie*	równowagowe napięcie powierzchniowe (mN/m)		stężenie*	równowagowe napięcie powierzchniowe (mN/m)		stężenie*	równowagowe napięcie powierzchniowe (mN/m)	
	woda	0,9% NaCl		woda	0,9% NaCl		woda	0,9% NaCl
czysty rozpuszczalnik**	71,70 $\pm 0,32$	70,82 $\pm 1,03$	czysty rozpuszczalnik**	71,70 $\pm 0,32$	70,82 $\pm 1,03$	czysty rozpuszczalnik**	71,70 $\pm 0,32$	70,82 $\pm 1,03$
0,004375% (w/v)	68,50 $\pm 0,20$	55,38 $\pm 0,66$	0,7% (w/v)	70,48 $\pm 0,15$	70,52 $\pm 0,68$	0,025% (w/v)	63,12 $\pm 0,92$	65,52 $\pm 2,08$
0,00875% (w/v)	59,63 $\pm 0,40$	50,71 $\pm 0,44$	0,9% (w/v)	68,67 $\pm 0,57$	70,12 $\pm 0,12$	0,03% (w/v)	64,46 $\pm 0,01$	62,93 $\pm 1,32$
0,0175% (w/v)	45,42 $\pm 0,11$	47,35 $\pm 0,46$	1,1% (w/v)	70,72 $\pm 0,30$	69,76 $\pm 0,18$	0,05% (w/v)	57,57 $\pm 0,79$	61,33 $\pm 0,89$
0,035% (w/v)	47,69 $\pm 0,35$	47,00 $\pm 0,28$				0,3% (w/v)	60,33 $\pm 1,43$	55,36 $\pm 0,92$

*Wartość stężenia odnosi się do zawartości surfaktantu

**Wartość zmierzona metodą wiszącej kropli. Wartości mogą odbiegać od danych literaturowych ze względu na różnice w metodyce pomiarowej.

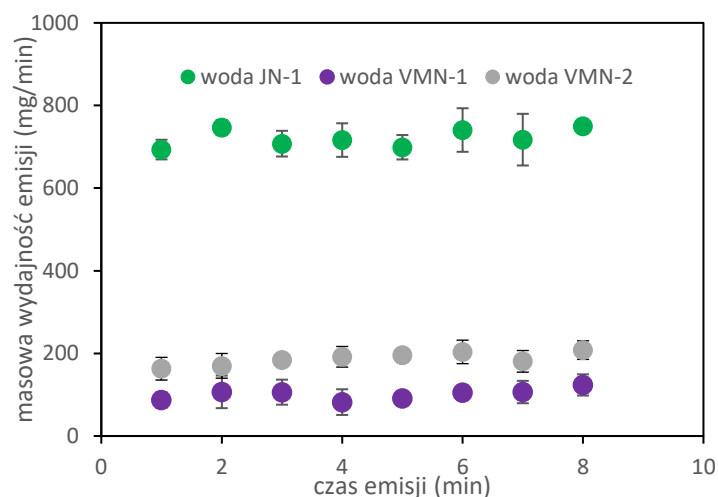
Wyniki badań przeprowadzonych w obecności chlorku sodu w stężeniu fizjologicznym wskazują, że jedynie aktywność powierzchniowa L-leucyny jest podobna jak w przypadku roztworów w wodzie. W pozostałych przypadkach tj. dla escyny lub lecytyny sojowej zaobserwowano znacząco mniejsze wartości równowagowego napięcia powierzchniowego w całym zakresie badanych stężeń. Dodatkowo, należy wziąć pod uwagę zależność napięcia powierzchniowego od temperatury, co może okazać się istotne dla potencjalnego zastosowania analizowanych związków powierzchniowo czynnych w formulacjach farmaceutyków rozpraszanych w nebulizatorach o różnych mechanizmach działania. Obniżenie temperatury cieczy rozpylanej podczas atomizacji w nebulizatorach pneumatycznych powoduje wzrost napięcia powierzchniowego, wpływając na proces powstawania kropeł (co szczegółowej omówiono w podrozdziale 0). Jednakże należy pamiętać, że atomizacja jest procesem dynamicznym, w którym nie jest osiągany stan równowagi adsorpcji związków powierzchniowo czynnych, co sprawia, że dynamiczne napięcie powierzchniowe jest wyższe niż wartość równowagowa.

10.2. Badanie procesu nebulizacji i właściwości aerozolu

10.2.1. Wpływ właściwości fizykochemicznych rozpylanych cieczy na wydajność nebulizacji

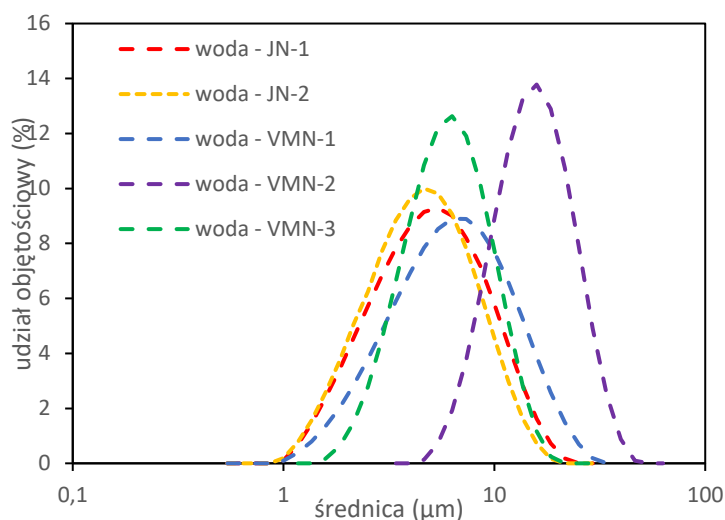
Badania wstępne prowadzone w niniejszej pracy miały na celu rozpoznanie wielkości wpływu konstrukcji nebulizatora na powstający aerozol. Zastosowanie w tym celu ultraczystej wody umożliwiło porównanie między sobą takich właściwości jak wydajność emisji czy rozkład wielkości kropeł w chmurze aerozolowej. Otrzymane wyniki stały się punktem wyjścia do danych rozważań dotyczących procesu nebulizacji w inhalatorach medycznych o różnej zasadzie działania oraz przy zastosowaniu ciekłych prekursorów o ściśle określonych właściwościach fizykochemicznych. Pozwoliły one również na wstępne rozpoznanie zdolności wybranych konstrukcji do wytwarzania aerozolu.

Analiza wyników przedstawionych na Rys. 10.3. wskazuje, że nebulizator pneumatyczny JN-1 charakteryzuje się dużo większą wydajnością masową niż nebulizatory siateczkowe (VMN-1 i VMN-2). Wydajność chwilowa emisji aerozolu z JN-1 wykazuje jednak znaczne fluktuacje. Wartość średnia wynosi tutaj ok. 721 mg/min a wahania obserwowane są w zakresie od ok. 693 mg/min do ok. 750 mg/min. Wynika to z konstrukcji nebulizatora (m.in. duża powierzchnia dla depozycji wewnątrz głowicy). Z kolei, nebulizatory siateczkowe charakteryzują się zakresem wydajności 163 – 208 mg/min (VMN-1 przy średniej ok. 186 mg/min) oraz 82 – 124 mg/min (VMN-2 przy średniej 101 mg/min). Zakres wahań wydajności jest w przypadku VMN znacznie mniejszy w porównaniu do JN.



Rys. 10.3. Chwilowa wydajność masowa emisji aerozolu z nebulizatorów: JN-1, VMN-1 i VMN-2.

Analiza wyników rozkładów objętościowych przedstawionych na Rys. 10.4 pokazuje, że dla każdego nebulizatora mają one przebiegi logarytmiczno-normalne. Aeroszol uzyskiwany z obu nebulizatorów pneumatycznych oraz siateczkowych VMN-1 i VMN-3 charakteryzuje się podobnym zakresem średnic, chociaż w przypadku VMN-3 szerokość rozkładu jest węższa. Zaobserwowana cecha jest dużą zaletą nebulizatorów siateczkowych, co omawiano szeroko w literaturze⁽⁵⁴⁾. Nebulizator VMN-2 mimo wąskiego rozkładu wielkości kropeł w porównaniu z JN, charakteryzuje się przesunięciem wielkości kropeł w kierunku większych średnic. Podsumowując, otrzymane wyniki jasno pokazują istnienie silnej zależności pomiędzy wielkością i szerokością rozkładu kropeł a konstrukcją urządzenia oraz wskazują na istnienie różnic nawet pomiędzy nebulizatorami tego samego typu.



Rys. 10.4. Rozkłady wielkości kropeł wytwarzanych w nebulizatorach pneumatycznych (modele JN-1 i JN-2) oraz siateczkowych (modele VMN-1, VMN-2 i VMN-3) podczas nebulizacji wody ultraczystej

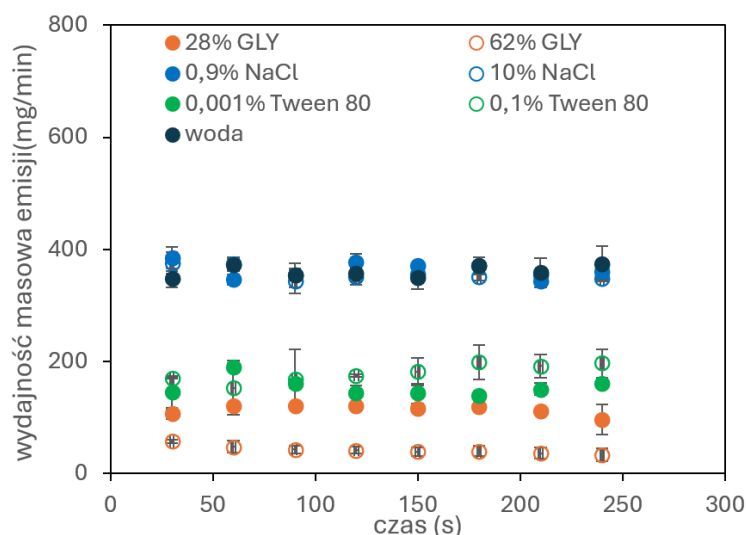
10.2.2. *Wpływ właściwości fizykochemicznych rozpylanych cieczy na charakterystykę aerozolu*

W tym podrozdziale zostanie przedstawiony wpływ przewodności elektrolitycznej, lepkości i napięcia powierzchniowego cieczy na właściwości aerozolu emitowanego z wybranych nebulizatorów pneumatycznych i siateczkowych. Otrzymane wyniki pozwolą na lepsze zrozumienie zależności przebiegu procesu nebulizacji od parametrów procesowych i umożliwiając przewidywanie przebiegu procesu dla bardziej skomplikowanych układów wieloskładnikowych, jakimi są leki inhalacyjne. Pozwoli to na wypracowanie zasad pomocnych przy projektowaniu składu cieczy przeznaczonych do terapii inhalacyjnych.

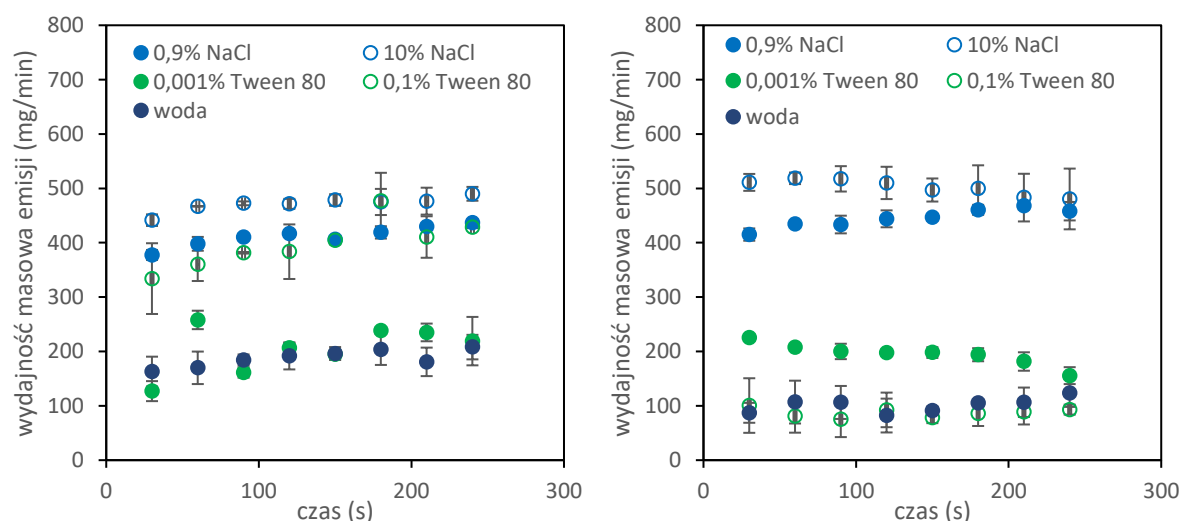
Już sama analiza porównawcza przebiegów procesów uwalniania aerozolu (zamieszczona poniżej), obok analizy doniesień literaturowych, ujawnia różnice pomiędzy stosowaniem JN i VMN. Na Rys. 10.5 oraz Rys. 10.6 przedstawiono wpływ właściwości fizykochemicznych takich jak przewodność elektrolityczna (jej wzrost w stosunku do wody ultraczystej został spowodowany dodatkiem NaCl), lepkość dynamiczna (dodatek gliceryny) oraz napięcia powierzchniowego (obecność Tweenu 80) na chwilową wydajność emisji aerozolu. W przypadku nebulizatora pneumatycznego (Rys. 10.6) zauważono obniżenie emisji w wyniku dodania substancji modyfikujących lepkość dynamiczną (GLY) oraz napięcie powierzchniowe (Tween 80). Większy wpływ ma wzrost lepkości cieczy (dzięki obecności gliceryny). Roztwory surfaktantu również obniżają wydajność emisji, ale różnice przy dwóch różnych stężeniach są nieznaczne. Obecność jonów (NaCl) nie wpłynęła w istotny sposób na wydajności masowe atomizacji. Szybkość emisji waha się w czasie i mieści się w przypadku 0,9% roztworu NaCl między 688 mg/min a 769 mg/min (95,4-106,6% wartości średniej), a dla roztworu 10% jest to zakres między 687 mg/min a 751 mg/min (96,4-105,3%). Natomiast w przypadku 62% roztworu gliceryny jest istotnie niższa: 66-95 mg/min (82,8-119%), a dla 28% roztworu gliceryny mieści się w przedziale 211-243 mg/min (92,5-106,6%). Ogólnie, w przypadku JN największy wpływ wśród badanych właściwości fizykochemicznych na wydajność emisji ma lepkość, a im roztwór jest bardziej lepki tym mniejsza jest wydajność.

W przypadku emisji aerozoli uwalnianych z nebulizatorów siateczkowych (Rys. 10.5.) zaobserwowano zależności o odwrotnym przebiegu niż w przypadku nebulizatora pneumatycznego JN-1, np. wzrostowi przewodności elektrolitycznej towarzyszy znaczący wzrost wydajności emisji. Stąd w przypadku soli fizjologicznej, wartości masowej wydajności emisji wahały się między 377,5 mg/min i 436,5 mg/min dla VMN-1 oraz 415 mg/min i 468 mg/min dla VMN-2, natomiast w przypadku 10% roztworu chlorku sodu między 441,5 mg/min i 478,5 mg/min dla VMN-1 oraz 480,5 mg/min i 517,5 mg/min dla VMN-2.

Zauważono tutaj, podobnie jak w przypadku nebulizatora pneumatycznego, stabilizujący efekt dodatku soli na wahania szybkości emisji. W odróżnieniu od nebulizatora pneumatycznego, dodatek surfaktantu (Tween 80) nie wpływa w znaczącym stopniu na tę wielkość. Uzyskane wyniki mogą świadczyć, o tym, że w przypadku nebulizatorów VMN napięcie powierzchniowe ma mniejszy wpływ na wydajność emisji aerozolu niż lepkość czy przewodność elektrolityczna. Szerszą analizę wpływu poszczególnych właściwości fizykochemicznych na emisję aerozolu przeprowadzono w podrozdziałach 10.2.2.1, 10.2.2.2 oraz 10.2.2.3.



Rys. 10.5 Chwilowa wydajność masowa emisji aerozolu powstałego w procesie atomizacji wody oraz roztworów wodnych z: gliceryny (GLY), Tweenem 80 i NaCl z JN-1

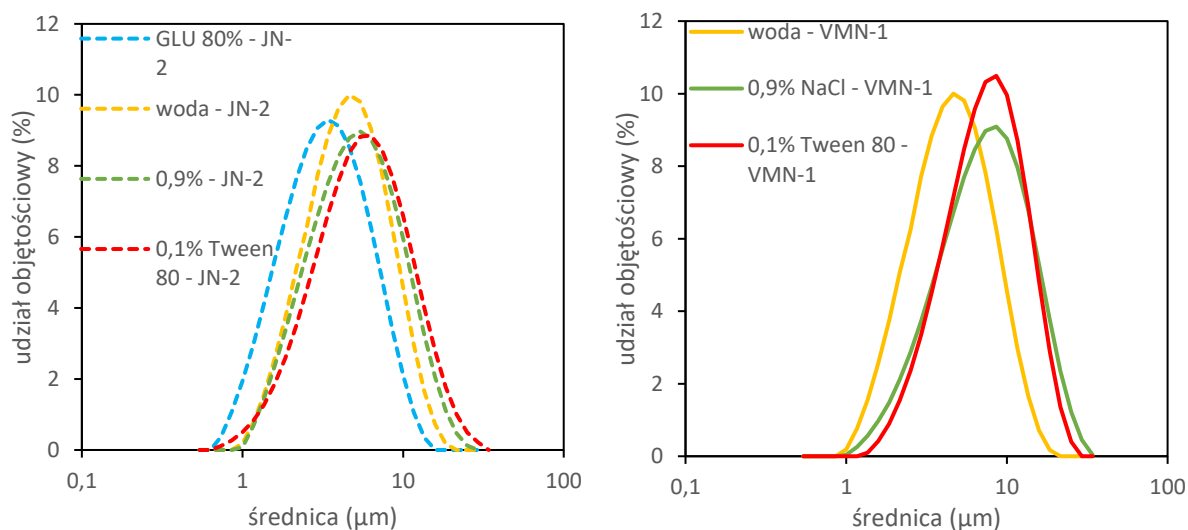


Rys. 10.6 Chwilowa wydajność masowa emisji aerozolu powstałego w procesie atomizacji wody, Tweenu 80 i NaCl w nebulizatorze membranowym VMN-1 (po lewej) i VMN-2 (po prawej)

Różnice we właściwościach fizykochemicznych cieczy uwalnianych z nebulizatorów może wpływać na skuteczność terapeutyczną inhalacji nie tylko poprzez zmiany w wydajności emisji, ale także poprzez zmianę rozkładu wielkości uwalnianych kropeł. Przebadano stosując dyfrakcję laserową z uwzględnieniem różnic wynikających z konstrukcji nebulizatorów.

Podstawę rozważań dotyczących analizy rozkładów wielkości kropeł uwalnianych podczas procesu nebulizacji cieczy o różnych właściwościach fizykochemicznych prowadzonego w inhalatorach medycznych stanowi analiza wyników uzyskanych w procesie rozpylania wody ultraczystej (omówionej w podrozdziale 10.2.1).

Na przykładzie wybranych modelowych roztworów porównano rozkłady wielkości kropeł otrzymanych przy zastosowaniu nebulizatora pneumatycznego JN-2 oraz siateczkowego VMN-2. Roztwór glukozy, ze względu na swoją lepkość, został rozproszony tylko w nebulizatorze pneumatycznym. Na rysunku 10.7 pokazano zależność pomiędzy wielkością kropeł a właściwościami fizykochemicznymi cechującymi rozpraszane roztwory. Dodatek elektrolitu (roztwór 0,9% NaCl) oraz środka powierzchniowo-czynnego (roztwór Tween 80) do czystej wody spowodował przesunięcie rozkładu wielkości kropeł w kierunku wyższych wartości średnic oraz rozszerzenie rozkładu w stosunku do wody (żółta linia), niezależnie od zastosowanego nebulizatora. Natomiast dodatek modyfikatora lepkości (roztwór glukozy – niebieska linia) w przypadku aerozolu emitowanego przy użyciu JN-2 spowodował przesunięcie średnic w kierunku mniejszych wartości. Szerszą analizę wpływu poszczególnych właściwości fizykochemicznych na rozkład wielkości kropeł przeprowadzono w podrozdziałach 10.2.2.1, 10.2.2.2 oraz 10.2.2.3.

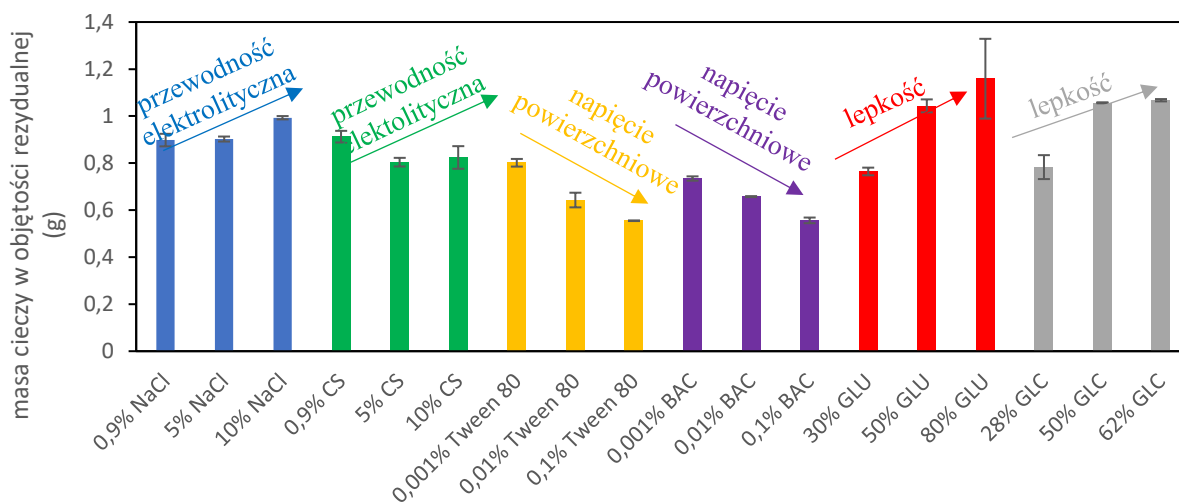


Rys. 10.7 Rozkład wielkości kropeł wytwarzanych w dwóch nebulizatorach JN-2 (po lewej) i VMN-1 (po prawej) z wody oraz roztworów wodnych 0,9% NaCl, 0,1% Tween 80 oraz glukoza 80%

Kolejną cechą nebulizatorów, na którą wyraźny wpływ mają właściwości fizykochemiczne cieczy, jest tzw. objętość rezydualna, RV. Podczas działania urządzenia, część cieczy nie ulega rozpyleniu i pozostaje w komorze nebulizatora po zakończeniu procesu atomizacji. Właśnie ta pozostałość określana jest mianem objętości rezydualnej i jest ona właściwością indywidualną

danego nebulizatora⁽³⁰⁹⁾. Cechą urządzeń pneumatycznych jest duża, w porównaniu do atomizerów siateczkowych, wartość RV.

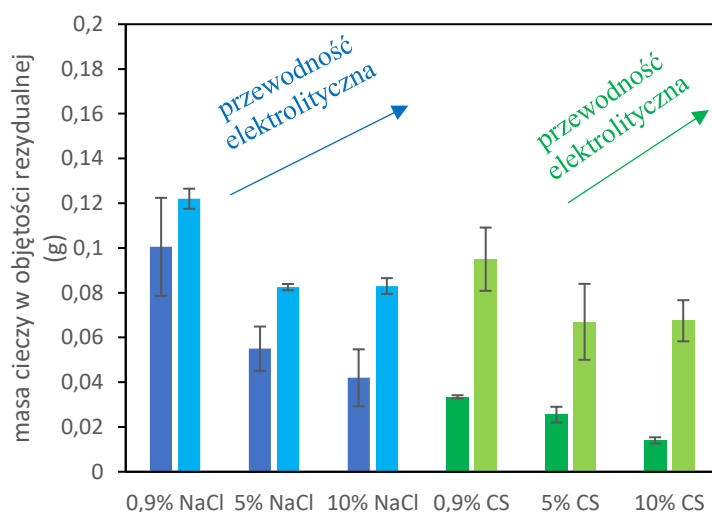
Masa cieczy w objętości rezydualnej nebulizatora pneumatycznego JN-1 (Rys. 10.8) praktycznie nie zmienia się przy wzroście przewodności elektrolitycznej rozpylanego roztworu. Niewielki wzrost masy obserwowany jest jedynie w przypadku 10% roztworu NaCl ($\kappa=93,1$ mS/cm) i może być on związany z odparowaniem próbki w obecności soli. Spadek napięcia powierzchniowego wiąże się w przypadku nebulizatora pneumatycznego z widocznym spadkiem masy objętości rezydualnej. Obniżenie σ do 38,9 mN/m w przypadku Tweenu 80 lub 37,0 mN/m w przypadku BACu powoduje spadek RV do ok. 0,56 ml, podczas gdy w przypadku soli fizjologicznej objętość pozostałej cieczy wynosi ok. 0,9 ml (przy założeniu gęstości równej gęstości wody). Może to być związane z obniżeniem wartości sił kohezji i z łatwiejszą fragmentacją cieczy, a więc większą emisją dawki i gęstszą chmurą aerozolu. Z kolei rozpylanie coraz bardziej lepkich płynów wiąże się z otrzymaniem większych wartości masy cieczy w objętości rezydualnych w nebulizatorze pneumatycznym JN-1. Im wyższa wartość lepkości tak jak w przypadku 62% gliceryny – 13,5 mPas czy 80% glukozy - 7,52 mPas tym otrzymuje się odpowiednio wyższe masy cieczy tworzącej objętość rezydualną ok. 1 ml oraz ok. 0,94 ml. Zauważona tendencja jest zgodna z tą obserwowaną przez McCallion i współ.⁽⁵⁵⁾.



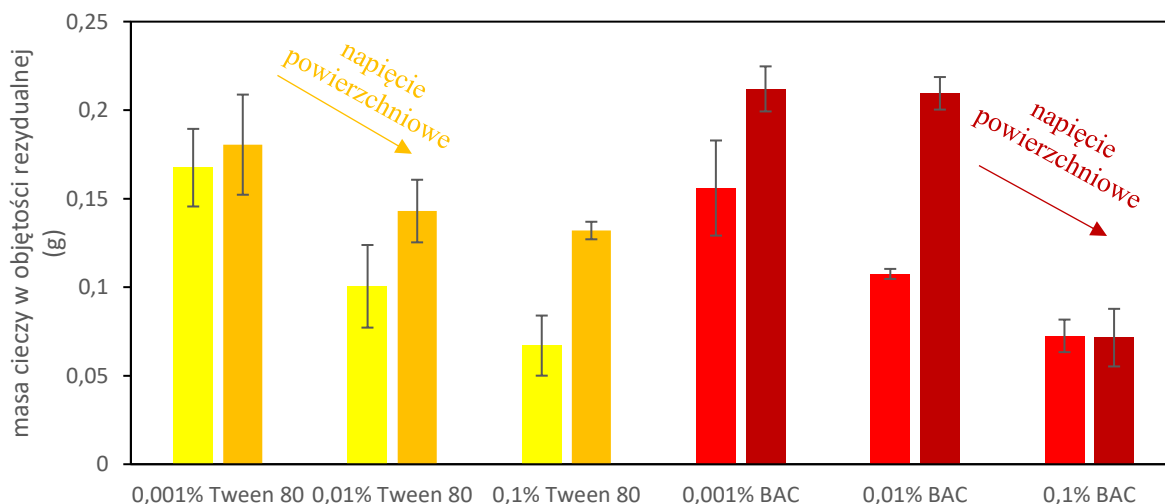
Rys. 10.8 Średnie masy cieczy w objętości rezydualnej nebulizatora JN-1 przy emisji substancji modelowych.

Nebulizatory siateczkowe charakteryzują się małą objętością rezydualną, poniżej 0,2 ml, a wartość parametru zależy od konstrukcji urządzenia. Analizując zależność od przewodności roztworów zauważono tendencję do spadku objętości rezydualnej wraz ze wzrostem zawartości elektrolitu, zarówno chlorku sodu, jak i cytrynianu sodu (Rys. 10.9). Mniejsze wartości RV otrzymywano w przypadku nebulizatora VMN-1 (poniżej 0,1 ml przy założeniu gęstości

równej gęstości wody). Z kolei VMN-2 wykazywał znaczący spadek wartości objętości rezydualnej przy wzroście stężenia od 0,9% do 5%. Natomiast podobne wielkości objętości rezydualnej odnotowano w przypadku dwóch największych stężeń elektrolitów. Z kolei, spadek napięcia powierzchniowego, podobnie jak w przypadku nebulizatora pneumatycznego, powoduje obniżenie RV (Rys. 10.10). VMN-3 spośród wszystkich testowanych nebulizatorów membranowych charakteryzuje się największymi wartościami objętości rezydualnej. Obserwuje się w nim takie same zależności dla roztworów zawierających związki powierzchniowo czynne, jak w przypadku JN. Obniżenie napięcia powierzchniowego, ułatwiając rozproszenie cieczy, prowadzi do spadku RV.



Rys. 10.9 Średnie masy cieczy w objętości rezydualnej nebulizatorów VMN-1 (ciemny niebieski i ciemny zielony) i VMN-2 (jasny niebieski i jasny zielony) przy emisji substancji modyfikujących przewodność elektrolityczną.

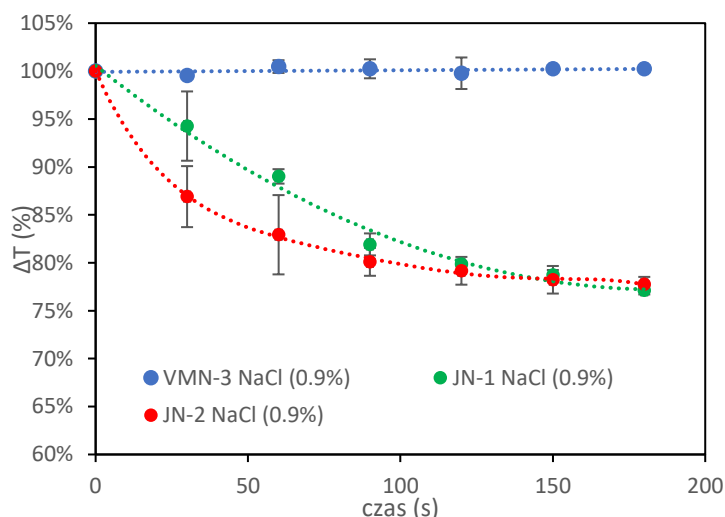


Rys. 10.10 Średnie masy cieczy w objętości rezydualnej nebulizatorów VMN-2 (żółty i czerwony) i VMN-3 (pomarańczowy i bordowy) przy emisji Tweenu 80 i BAC

Temperatura ciekłego prekursora aerozolu to kolejny parametr procesowy, na którego podstawie można wykazać różnice w charakterystyce chmur aerozolowych emitowanych w

wyniku rozpylania cieczy cechujących się ściśle wybranymi właściwościami fizykochemicznymi. Podczas atomizacji cieczy w nebulizatorach pneumatycznych dochodzi do stopniowego spadku temperatury w wyniku szybkiego rozprężania gazu i odparowania cieczy w komorze nebulizatora. Można przyjąć, że rozpylane krople odparowują adiabatycznie przez co ulegają ochłodzeniu. Krople wydzielane na elementach impakcyjnych spływają na dno naczynka i schładzają cieczy^(191,206). Natomiast w przypadku nebulizatorów siateczkowych warunki termodynamiczne są stabilne i wartości temperatury oscylują wokół początkowej wartości (Rys. 10.11- VMN-3). Krzywe względnego spadku temperatury (ΔT) w przypadku nebulizatorów pneumatycznych mają nieliniowy charakter i asymptotycznie dążą do jednej wartości – niższej niż początkowa (JN-1 i JN-2). Charakter krzywych ΔT różni się dynamiką zmian, a ich przebieg zależy od właściwości fizykochemicznych cieczy, ale w większym stopniu od konstrukcji danego JN, co pokazano na Rys. 10.11. Otrzymane wyniki w połączeniu z analizą wielkości kropel mogą posłużyć do zrozumienia zależności pomiędzy temperaturą ciekłego prekursora aerozolu a czasową zmianą rozkładu wielkości kropel. Takie podejście obrazuje również możliwe przyczyny wahań stabilności emisji aerozolu podczas trwania nebulizacji. Na Rys. 10.12 pokazano przykładowe porównanie wpływu jonów NaCl na temperaturę aerozolu i wielkość kropel uwalnianych z nebulizatorów pneumatycznych. Zaobserwowano, że wzrost zawartości silnego elektrolitu takiego jak NaCl zwiększa zakres ΔT . Jednocześnie, spadek temperatury podczas procesu wpływa nieznacznie na bieżący rozmiar kropel. Z kolei, emisja cieczy zawierających surfaktanty potwierdziła, że wraz ze spadkiem napięcia powierzchniowego powstają mniejsze krople (Rys.10.13-10.14), co wynika ze zmniejszenia sił oporu cieczy na atomizację. Można również zauważyć, że obecność substancji powierzchniowo czynnej wprowadza niewielkie zakłócenia w stabilnym uwalnianiu kropel. Te wyniki wyraźnie pokazują, że zmiana temperatury podczas trwania procesu atomizacji w nebulizatorze pneumatycznym odgrywa drugorzędną rolę w stosunku do właściwości fizykochemicznych cieczy. W czasie trwania nebulizacji dochodzi do ochłodzenia cieczy, co powoduje wzrost napięcia powierzchniowego. Zwiększa to siły kohezji i sprzyja emisji większych kropel. Tą tendencję wzrostu MMAD podczas trwania procesu zaobserwowano na Rys.10.13 i 10.14 (wykresy $Dv(50)$). Obecność surfaktantu w soli fizjologicznej prowadzi do zwiększenia wielkości kropel w stosunku do roztworu bez surfaktantach (Rys. 10.15). Jednocześnie należy pamiętać, że obserwowane zależności $Dv(50)$ dotyczą aerozolu wtórnego opuszczającego nebulizator, przez co bezpośredni wpływ σ i μ może nie być taki sam jak dla aerozolu pierwotnego. Dodatek modyfikatorów napięcia powierzchniowego wiąże się także ze znaczącym obniżeniem temperatury w czasie trwania

atomizacji w stosunku do emisji soli fizjologicznej (Tab. 10.5 i Rys. 10.15). Największa różnica T w 3. minucie pomiędzy 0,9% NaCl a 0,1% BAC wynosi 2°C, 0,1% Tween 80: 2,4°C, a 0,035% Esc: 1,2°C. Należy również podkreślić niewielką różnicę pomiędzy wartościami T w obu urządzeniach pneumatycznych: JN-1 i JN-2. Różnic tych należy upatrywać w konstrukcji samych urządzeń np. odległości między dyszą a przegrodą impakcyjną.



Rys.10.11 Względna zmiana temperatury atomizowanej cieczy w czasie trwania procesu nebulizacji soli fizjologicznej w różnych nebulizatorach.

Podczas atomizacji lepkiego płynu niutonowskiego, tj. roztworu glukozy, również zauważono zmiany temperatury cieczy rozpylanej. W przypadku rozpylania za pomocą JN-1 i JN-2 roztworów glukozy 50% i 80% odnotowano mniejsze spadki temperatury podczas rozpylania roztworu o wyższym stężeniu (Rys. 10.16). W przypadku JN-1 wartości T przy atomizacji 50% GLU spadły do ok. 16,2°C, 80% GLU do 16,9°C, natomiast JN-2 - 50% GLU do 15,2°C, a 80% GLU do 15,5°C. Podobne tendencje i spadku T zaobserwowano w przypadku płynów nieniuonowskich tj. gumy ksantanowej. Przebieg krzywych ΔT tak jak w przypadku GLU ma charakter nieliniowy i asymptotycznie dąży do wartości minimalnej (Rys. 10.17).

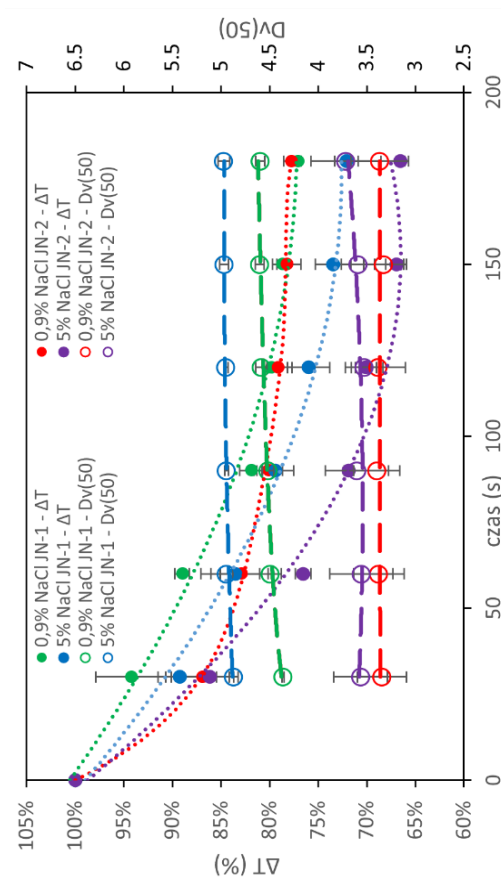
Tab. 10.5 Temperatura aerozolu w 3 minucie procesu atomizacji* podczas rozpylania wybranych substancji.

	Rozpylane substancje - T (°C)					
	0,9% NaCl	0,1% BAC	0,1% Tween 80	1,1% L-Leu	3mg/ml XG	3mg/ml AG
JN-1	16,9±0,1	16,8±0,1	16,0±0,3	17,3±0,3	16,5±0,1	15,5±0,1
JN-2	16,6±0,1	14,7±0,7	14,3±0,3	15,9±0,2	15,6±0,6	15,1±0,8

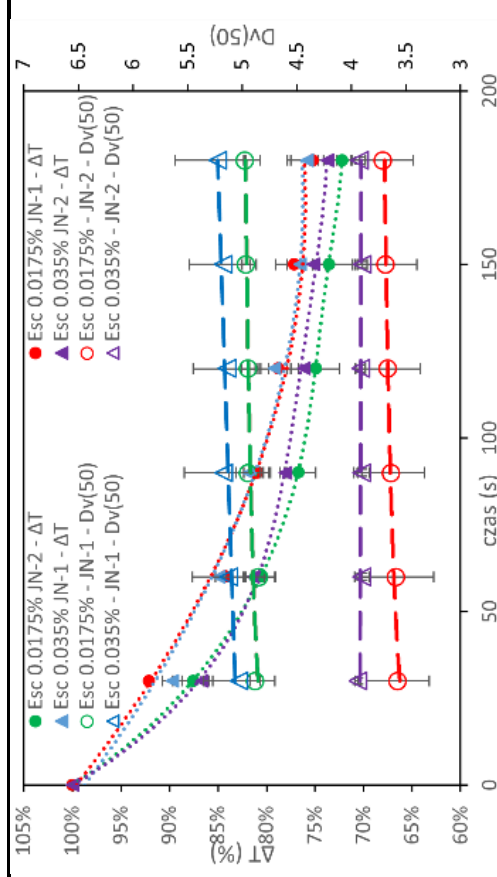
*punkt czasowy, w którym osiągnięto wartość quasi-równowagową temperatury

Zastosowanie płynów o podwyższonej lepkości umożliwia modyfikację średnic uwalnianych kropeł. Wraz z trwaniem procesu atomizacji oraz jednoczesnym obniżaniem się temperatury dochodzi do emisji coraz mniejszych kropeł. Zmniejszenie wartości MMAD może być powiązane w przypadku płynów nieniuonowskich o złożonej strukturze przestrzennej

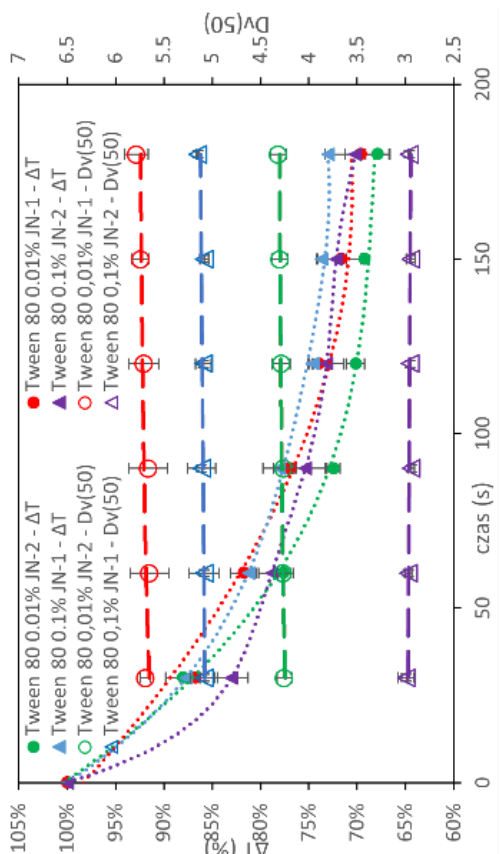
łańcuchów molekuł takich jak XG i AG ze zmianą strukturalną i rozbiciem wiązań wodorowych w wyniku działania naprężeń ścinających. Obniżenie temperatury cieczy wpływa na zwiększenie sił lepkościowych utrzymujących ciągłość cieczy wobec naprężeń ścinających wywoływanym przez przepływający gaz. Doprowadza to do powstawania dużych kropel pierwotnych, które ulegają odkropleniu i/lub rozbiciu na elementach wewnętrznych nebulizatora. W konsekwencji obniżenie temperatury wzmacnia efekt powstawania mniejszych kropel w aerozolu wtórnym wraz z trwaniem procesu atomizacji. Ten efekt nie jest obserwowany w przypadku roztworów GLU, gdzie stała wielkość kropel utrzymuje się przez cały czas trwania procesu. Jednocześnie wprowadzenie w cieczach zawierających modyfikatory lepkości podobnie jak w przypadku modyfikatorów napięcia powierzchniowego, obserwuje się znaczne obniżenie temperatury podczas atomizacji w porównaniu do soli fizjologicznej (Tab. 10.5 i Rys. 10.18). Największa różnica T w 3. minucie pomiędzy 0,9% NaCl i 3 mg/ml XG wynosi 1°C , a 3 mg/ml AG: $1,5^{\circ}\text{C}$. Zakres zmian jest jednak mniejszy niż w obecności związków powierzchniowo-czynnych. Należy znów zaznaczyć wyraźną różnicę dla dwóch różniących się konstrukcją nebulizatorów pneumatycznych (JN-1 i JN-2). W nebulizatorze JN-2 osiągnęte są znacznie niższe minimalne temperatury cieczy oraz uwalniane są mgły o mniejszych wartościach MMAD. Porównując wielkości kropel oraz krzywe ΔT zmierzone przy rozpylaniu modyfikatorów lepkości z emisją soli fizjologicznej można zauważyć mniejsze zmiany niż w przypadku modyfikatorów napięcia powierzchniowego, gdzie różnice pomiędzy otrzymanymi wynikami są wyraźnie zarysowane (Rys. 10.15 i 10.18).



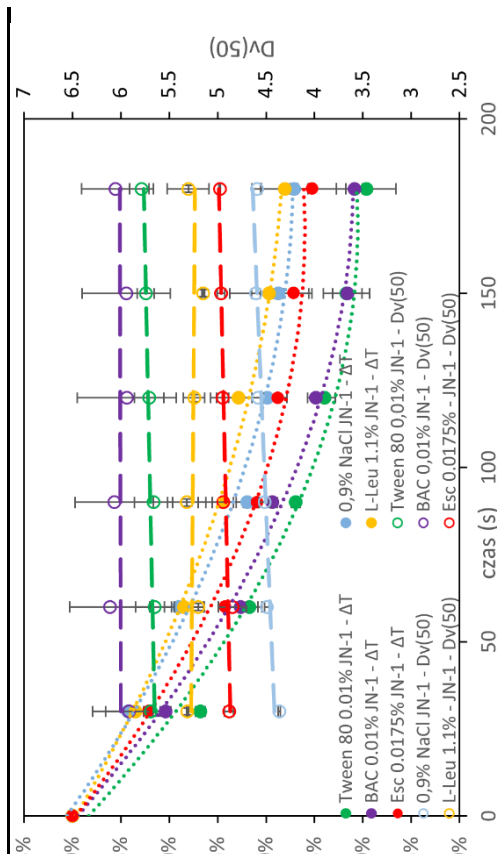
Rys. 10.12 Względna zmiana temperatury roztworów NaCl oraz $Dv(50)$ emitowanych kropeł podczas nebulizacji w JN-1 i JN-2



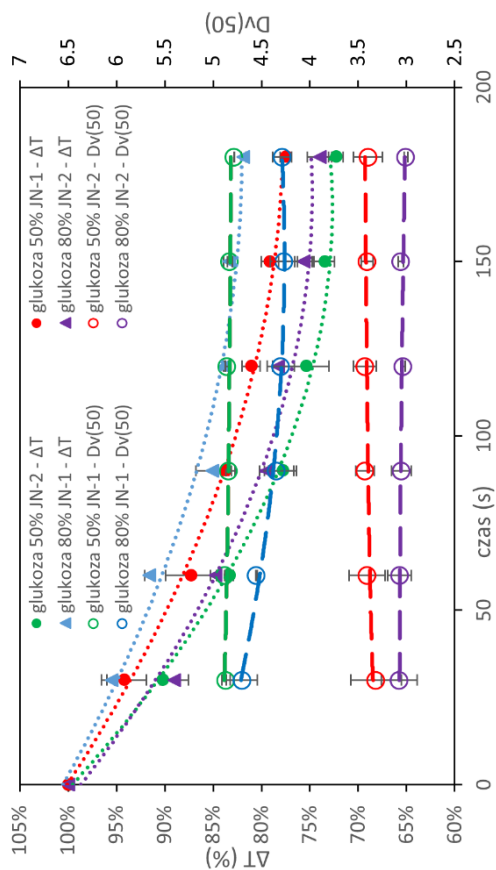
Rys. 10.14 Względna zmiana temperatury roztworów Esc oraz $Dv(50)$ emitowanych kropeł podczas nebulizacji w JN-1 i JN-2



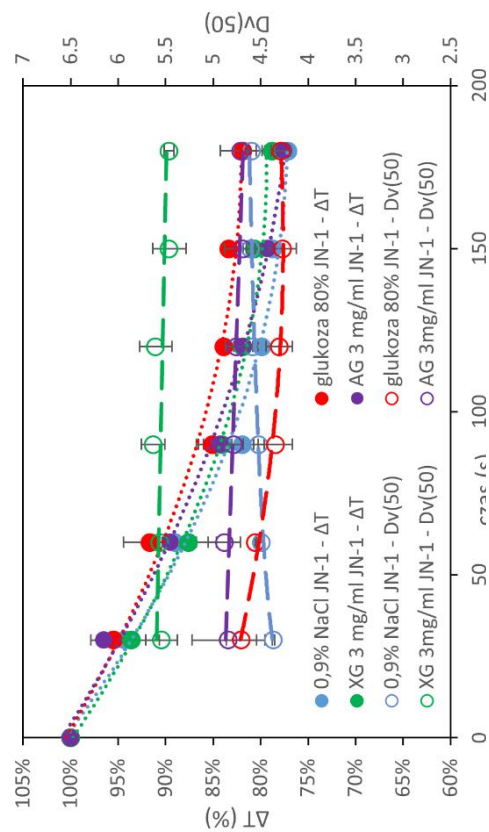
Rys. 10.13 Względna zmiana temperatury roztworów Tween 80 oraz $Dv(50)$ emitowanych kropeł podczas nebulizacji w JN-1 i JN-2



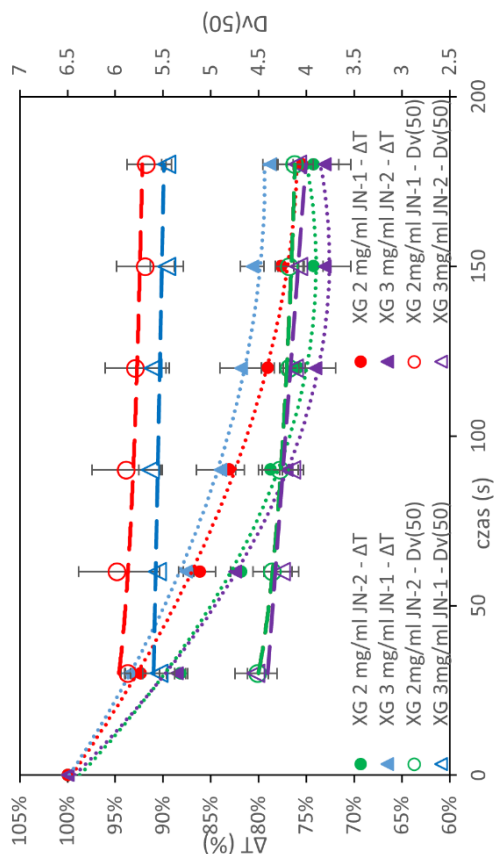
Rys. 10.15 Względna zmiana temperatury roztworów modyfikatora napięcia powierzchniowego oraz $Dv(50)$ emitowanych kropeł podczas nebulizacji w JN-1 i JN-2



Rys. 10.16 Względna zmiana temperatury roztworów GLU oraz $Dv(50)$ emitowanych kropeł podczas nebulizacji w JN-1 i JN-2



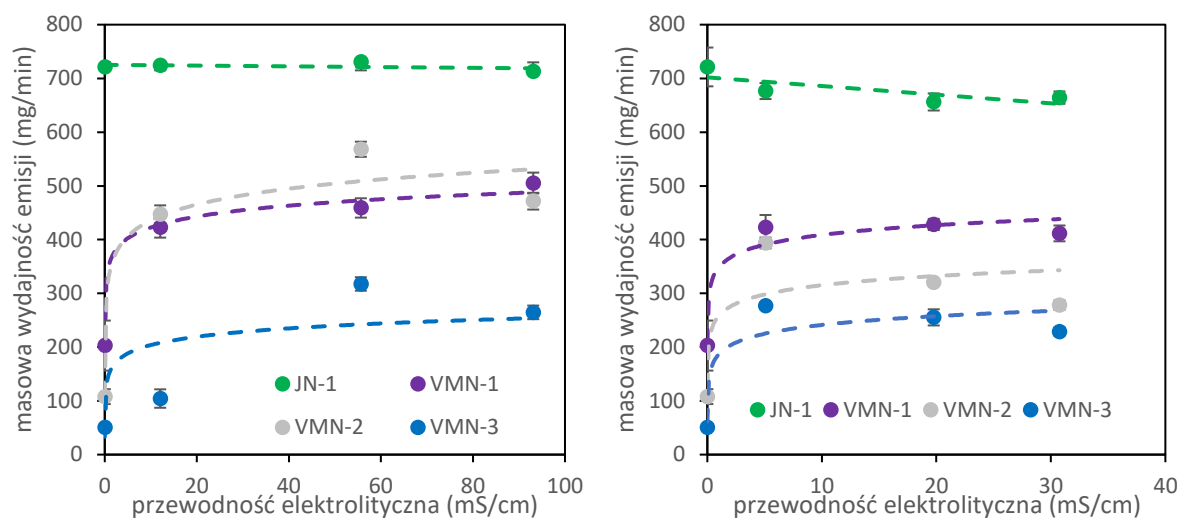
Rys. 10.18 Względna zmiana temperatury roztworów modyfikatora lepkości oraz $Dv(50)$ emitowanych kropeł podczas nebulizacji w JN-1 i JN-2



Rys. 10.17 Względna zmiana temperatury roztworów XG oraz $Dv(50)$ emitowanych kropeł podczas nebulizacji w JN-1 i JN-2

10.2.2.1. Wpływ przewodności elektrolitycznej cieczy na charakterystykę aerozolu i przebieg procesu atomizacji w wybranych nebulizatorach

Wydajność masowa emisji

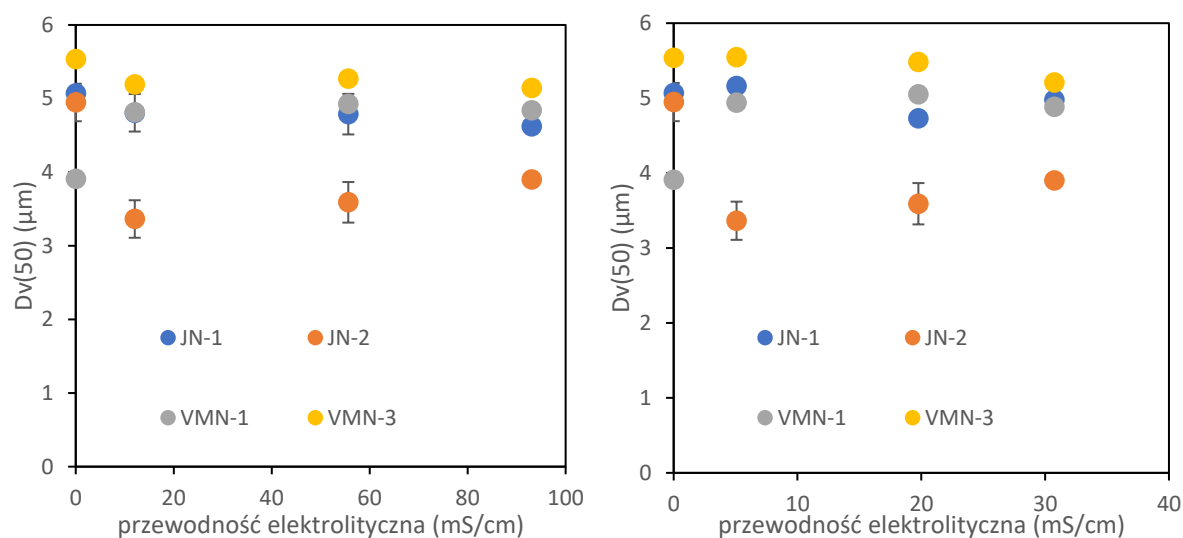


Rys. 10.19 Zmiana średniej wydajności masowej emisji aerozolu w funkcji przewodności elektrolitycznej na przykładzie rozpraszania roztworu chlorku sodu (po lewo) i cytrynianu sodu (po prawo) w temperaturze 25 °C

Wpływ przewodności elektrolitycznej na wydajność masową emisji aerozolu przeanalizowano na podstawie wartości średnich uzyskanych w wyniku rozpraszania roztworu chlorku sodu i cytrynianu sodu (Rys. 10.19). Otrzymane dane pokazują, że obecność jonów w większym stopniu wpływa na aerozol rozpylany z użyciem nebulizatorów siateczkowych niż pneumatycznych. W przypadku JN-1 wydajność emisji była nieznacznie niższa od wartości uzyskanej przy atomizacji wody. Dotyczy to szczególnie roztworów z 10% dodatkiem poszczególnych soli (713 mg/min dla NaCl oraz 664,27 mg/min dla CS). Może to wskazywać, że wydajność nebulizacji prowadzonej z użyciem nebulizatorów pneumatycznych, ze względu na zasadę działania tych urządzeń oraz ich konstrukcję w niewielkim stopniu zależy od przewodności elektrolitycznej rozpraszanej cieczy. Dodatek soli odgrywa większą rolę w przypadku stosowania nebulizatorów siateczkowych. W tym przypadku widoczny jest nieliniowy wzrost emisji aerozolu. Największy wzrost wydajności w porównaniu do rozpylania czystej wody (107,9 mg/min) zaobserwowano przy użyciu charakteryzującego się polimerową membraną nebulizatora VMN-2. W przypadku roztworu chlorku sodu o stężeniu 0,9% zmierzono wydajność emisji na poziomie 447 mg/min (wzrost 4-krotny), podczas gdy dla takiego samego stężenia cytrynianu sodu jest to wartość 394 mg/min. Zauważono również, że największy skok wartości średniej wydajności występuje przy wzroście przewodności do 12,04 mS/cm w przypadku NaCl oraz do 5,08 mS/cm w przypadku CS. W odróżnieniu od nebulizatorów pneumatycznych w urządzeniach membranowych w obecności jonów większe

znaczenie mają oddziaływania pomiędzy materiałem membrany a cieczą rozpraszaną. Niska wartość szybkości emisji aerozolu uwalnianego podczas atomizacji wody ultraczystej z nebulizatora VMN-3 pokazuje też, że niektóre urządzenia mebranowe wymagają wyższej przewodności elektrolitycznej cieczy do wydajniejszej pracy. Otrzymane wyniki pokazują, że przewodność elektrolityczna cieczy poddawanej atomizacji ma znaczenie dla szybkości uwalniania aerozolu (zwłaszcza dla VMN).

Parametry oceny ilościowej właściwości uwalnianych aerozoli



Rys. 10.20 Średnica $Dv(50)$ kropeł emitowanych z dwóch nebulizatorów pneumatycznych i dwóch siateczkowych na przykładzie roztworów chlorku sodu (po lewo) i cytrynianu sodu (po prawo).

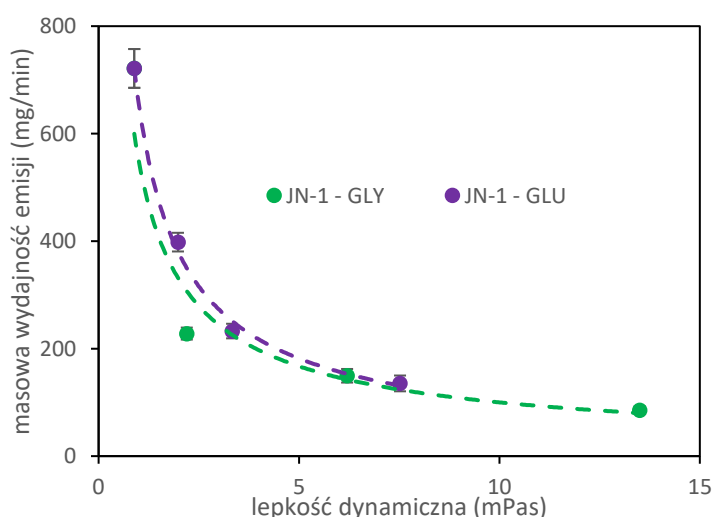
Przewodność elektrolityczna jest kolejną właściwością, która może wpływać na wielkość kropeł uwalnianych z nebulizatorów. Wpływ zmian przewodności osiąganey za pomocą dodatku dwóch soli – chlorku sodu oraz cytrynianu sodu, na medianę masowego rozkładu wielkości kropeł zaprezentowano na Rys. 10.20. Można zaobserwować, że zarówno rodzaj soli (sól nieorganiczna/organiczna), jak i jej zawartość w roztworze w niewielkim stopniu wpływa na rozmiar kropeł. W przypadku JN-1 i VMN-3 średnice uległy niewielkiemu zmniejszeniu w obecności każdego z elektrolitów. Natomiast nebulizator JN-2 emitował znacznie mniejsze krople (obniżenie od 4,95 μm dla wody do 3,9 μm w przypadku 10% roztworu cytrynianu sodu). Obecność jonów soli tylko w jednym przypadku (VMN-1) spowodowała niewielki wzrost wielkości kropeł. Ma ona też niewielki wpływ na szerokość rozkładu wielkości (geometryczne odchylenie standardowe). W stosunku do κ , dominującym elementem wpływającym na rozmiar kropeł jest zatem mechanizm atomizacji, a więc konstrukcja urządzenia. Pośredni wpływ nośników ładunków elektrycznych (sygnalizowany w podrozdziale 6.2.2), polegający na oddziaływaniu na ładunek powierzchniowy pozostałych składników ciekłego prekursora aerozolowego, co w konsekwencji determinuje zmianę m.in. wartości lepkości i napięcia

powierzchniowego, został opisany w podrozdziale 10.2.2.2 na przykładzie interakcji z modyfikatorami lepkości pochodzenia naturalnego oraz w podrozdziale 10.2.2.3 na przykładzie interakcji z modyfikatorami napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego i surfaktantami syntetycznymi.

10.2.2.2. Wpływ lepkości cieczy na charakterystykę aerozolu i przebieg procesu atomizacji w wybranych nebulizatorach

Wydajność masowa emisji

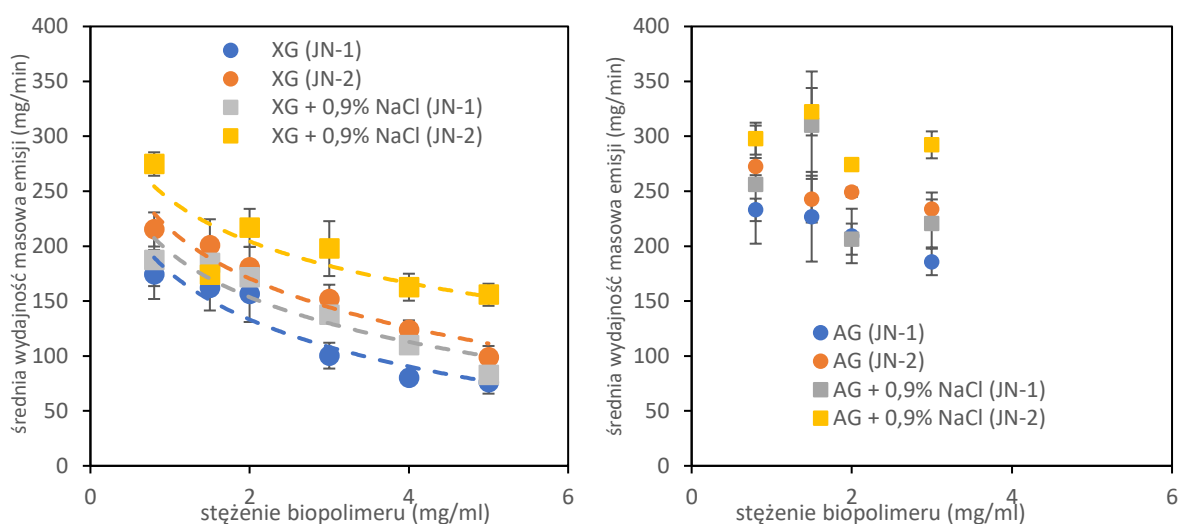
Wpływ lepkości dynamicznej na wydajność masową emisji aerozolu przeanalizowano na podstawie wartości średnich uzyskanych w wyniku rozpraszania roztworu glukozy i gliceryny (Rys. 10.21). Zgodnie z przypuszczeniem, wzrostowi lepkości towarzyszy spadek wydajności emisji. W przypadku gliceryny najniższe wartości osiągnięto przy stężeniu 62% (85,5 mg/min), a w przypadku glukozy przy stężeniu 80% (135,3 mg/min). Spadek zależności średniej wydajności masowej emisji od lepkości dynamicznej ma charakter nieliniowy.



Rys. 10.21 Zmiana średniej wydajności masowej emisji aerozolu w funkcji lepkości dynamicznej na przykładzie rozpraszania roztworu gliceryny (GLY) i glukozy (GLU) w nebulizatorze pneumatycznym

Nebulizatory pneumatyczne charakteryzują się chwilową wydajnością masową emisji fluktuującą wokół wartości średniej. Dlatego też, analizę jakości aerozolu powstałego poprzez rozpraszanie roztworów biopolimerów z określeniem wpływu właściwości reologicznych na szybkość atomizacji zdecydowano się oprzeć na średnich wartościach wydajności emisji. Na Rys. 10.22 przedstawiono średnią masową wydajność wyemitowanej dawki podczas 4-minutowej nebulizacji w medycznych urządzeniach pneumatycznych (JN-1 i JN-2) w funkcji stężenia polisacharydów. Obserwowana zmienność w każdym punkcie czasowym procesu nebulizacji nie jest niczym zaskakującym w przypadku nebulizatorów pneumatycznych (AG – Rys. 10.22 oraz SH – Rys. 10.Z.5.), jednak wraz ze wzrostem stężenia biopolimeru XG

zaobserwowano również znaczny spadek średniej wydajności emisji aerozolu. Nieliniowy spadek wydajności w badanym zakresie stężeń odnotowano z poziomu ok. 174 mg/min do ok. 76 mg/min (dla JN-1) oraz z 187 mg/min do 83 mg/min (dla JN-2). Porównując wydajności obu nebulizatorów, nebulizator JN-2 zdecydowanie efektywniej rozprasza roztwory modyfikatorów lepkości pochodzenia naturalnego. Dodatkowo, obecność jonów soli w roztworze zwiększa średnią wydajność nebulizacji i jest to bezpośrednio związane z obserwowanymi zmianami lepkości (podrozdział 10.1.3). Zupełnie inne zależności zaobserwowano przy rozpylaniu cieczy zawierających agar i hialuronian sodu. Obecność jonów soli NaCl w roztworze agaru również w niewielkim stopniu wpłynęła na wartości wydajności emisji. Wyniki pokazują, że przewagą emisji kropeł z cieczy zawierających polisacharydy nad rozpraszaniem płynów niutonowskich jest znaczący wzrost wartości wydajności.

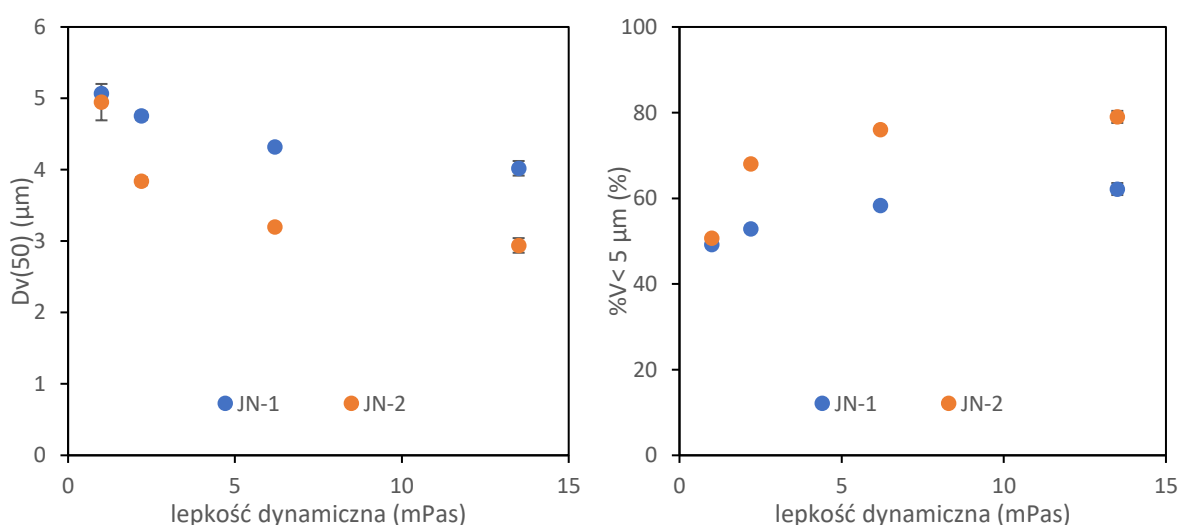


Rys. 10.22. Średnia masowa wydajność wyemitowanej dawki podczas 4-minutowej nebulizacji w wybranych urządzeniach pneumatycznych w funkcji stężenia gumy ksantanowej (po lewo) i agaru (po prawo)

Parametry oceny ilościowej właściwości uwalnianych aerozoli

Również lepkość w istotny sposób modyfikuje wartości wskaźników ilościowych opisujących chmurę aerozolową uwalnianą z nebulizatorów pneumatycznych. W badanych roztworach gliceryny (28-62%) lepkość dynamiczna wzrasta od 2,2 do 13,5 mPas. Wpływa to na wzrost zapotrzebowania energetycznego podczas procesu atomizacji. Stwierdzono (Rys. 10.23), że w przypadku obu modeli nebulizatorów pneumatycznych dochodzi do obniżenia wartości $Dv(50)$ wraz ze wzrostem lepkości dynamicznej. Tendencja ta jest analogiczna do obserwowanej w pracy(55). W przypadku JN-2 istotna zmiana obserwowana jest już pomiędzy próbką kontrolną (wodą – $\mu \approx 1$ mPas, $Dv(50) = 4,95 \mu m$) a 28% roztworem gliceryny ($\mu \approx 2,2$ mPas, $Dv(50) = 3,84 \mu m$). Zmiana $Dv(50)$ pociąga za sobą różnicę w wielkości udziału frakcji kropeł drobnych. Wartości FPF rosły wraz ze wzrostem lepkości dynamicznej (dla wody

wynosiły ok. 50%. W przypadku 28% roztworu gliceryny wynosiły one ok. 53% (JN-1) i ok. 68% (JN-2) a dla 62% roztworu ($\mu \approx 13,5$ mPas): 62% (JN-1) i 79% (JN-2). Nie zaobserwowano większego wpływu lepkości dynamicznej z badanego zakresu stężeń na polidispersyjność aerozolu (wartość geometrycznego odchylenia standardowego utrzymywała się na poziomie ok. 1,8). Gliceryna jest substancją, która obok modyfikacji lepkości dynamicznej, wywołuje również obniżenie napięcia powierzchniowego. Jednakże ze względu na podobne zależności, które otrzymano w przypadku roztworów glukozy (Załącznik – Rys. 10.Z.6) oraz ze względu na fakt, że w procesie, jak wykazano w pracy(55), dominującą rolę nad napięciem powierzchniowym odgrywa lepkość, skoncentrowano się jedynie na efekcie pochodzącym od lepkości tej substancji.

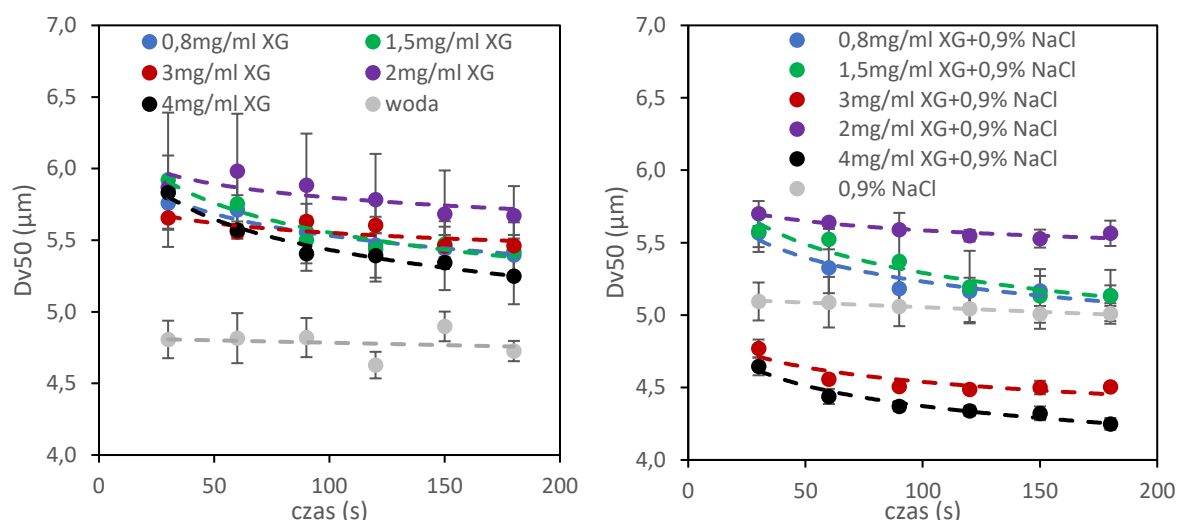


Rys. 10.23 Średnica $Dv(50)$ kropel (po lewej) i udział objętościowy frakcji kropel drobnych (po prawej) emitowanych z roztworów gliceryny przy użyciu nebulizatora pneumatycznego.

Stabilność parametrów charakteryzujących chmurę aerozolową

Roztwory guma ksantanowej oraz agaru są przykładami (jak wykazano w podrozdziale 10.1.3), płynów rozrzedzanych ścinaniem. Wraz ze wzrostem szybkości ścinania dochodzi do reorganizacji przestrzennej molekuł polisacharydów, co wpływa na obniżenie lepkości dynamicznej płynów. W komorze nebulizatora pneumatycznego dochodzi do intensywnego mierzenia cieczy, co skutkuje zmianą organizacji molekuł, a w przypadkach krytycznych - nieodwracalnym zerwaniem wiązań słabych np. wiązań wodorowych. Ze względu na dynamikę nebulizacji ważne jest sprawdzenie stabilności właściwości aerozolu podczas trwania całego procesu. Na Rys. 10.24 zobrazowano na przykładzie roztworów gumy ksantanowej w wodzie lub w soli fizjologicznej zmianę mediany $Dv(50)$ w trakcie 3-minutowego procesu atomizacji. Dodatek modyfikatora lepkości powoduje stopniowe obniżenie wielkości kropel wraz z trwaniem procesu, w odróżnieniu od procesu atomizacji cieczy niutonowskich (wody czy soli

fizjologicznej), w którym rozmiar kropeł jest stabilny. Obecność molekuł polisacharydu sprzyja wzrostowi wielkości średnic kropeł. Jest to tendencja analogiczna uzyskiwana przy rozpylaniu płynów niutonowskich, co pokazano m.in. w pracy(190) przy badaniu roztworów sacharozy. Nie zaobserwowano większego wpływu modyfikatorów lepkości na zmianę polidispersyjności aerozolu, ale ich obecność obniża udział kropeł drobnych, co jest konsekwencją wzrostu wielkości średnic.



Rys. 10.24. Ewolucja wielkości kropli emitowanej z użyciem JN-1 poprzez rozpraszanie roztworów wodnych (po lewej) gumy ksantanowej i w soli fizjologicznej (po prawej).

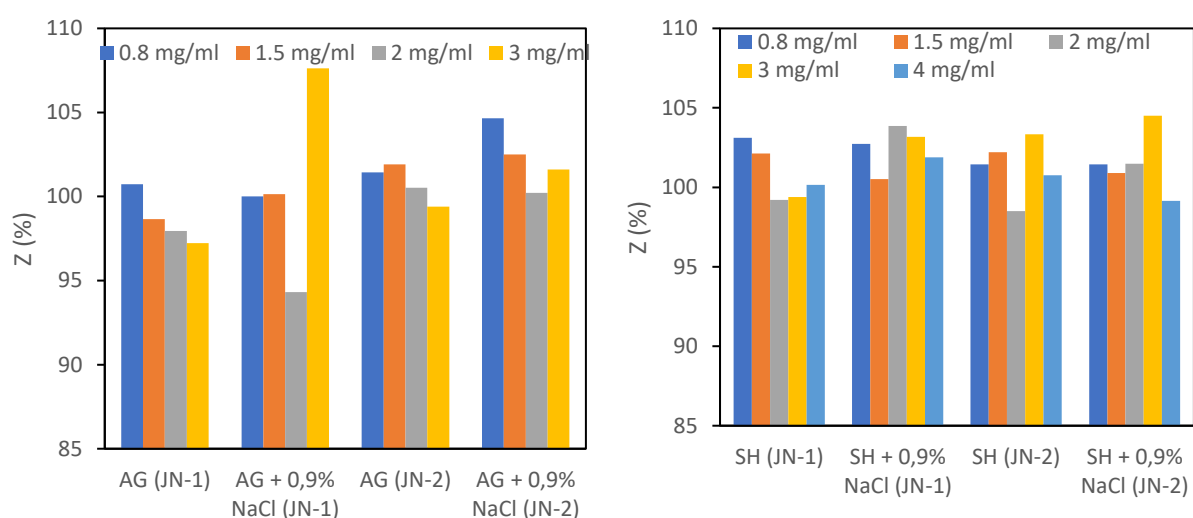
Odnotowano również wpływ chlorku sodu na zmianę parametrów mgieł uzyskiwanych w wyniku rozproszenia roztworów polisacharydu. Ponownie stwierdzono spadek wielkości kropeł wraz z trwaniem procesu. Krople były również mniejsze od generowanych bez dodatku chlorku sodu. Wynikać to może bezpośrednio z oddziaływania jonów soli na molekuły polisacharydu, powodującego zmianę właściwości reologicznych. Dwa najwyższe stężenia polisacharydu sprzyjają powstawaniu najmniejszych kropeł (średnia wartość Dv(50), odpowiednio, 4,55 μm i 4,39 μm – Tab. 10.Z.1). Są one mniejsze niż w przypadku rozpylania soli fizjologicznej (średnia: 5,03 μm). Obniżenie wartości Dv(50) wiąże się z korzystnym wzrostem udziału drobnych kropeł, ale przy jednoczesnym niewielkim wzroście szerokości rozkładu (parametr GSD), w przypadku najwyższego stężenia z 1,81 na 1,88 (wciąż mniejszym niż w przypadku soli fizjologicznej – GSD=1,91).

Odwrotny przebieg zmian wielkości kropeł w trakcie trwania procesu atomizacji wykazywały roztwory agaru. Zaobserwowano w tym przypadku stałość parametru Dv(50) (JN-2) lub jej nieznaczny wzrost (3 mg/ml AG + 0,9% NaCl – JN-1). Niewielkie zmiany Dv(50) mogą stanowić dowód na wytrzymałość konfiguracji łańcuchów polisacharydu, skutecznie przeciwstawiającej się siłom ścinającym. Zmiany w rozmiarach kropeł w trakcie trwania

procesu atomizacji zostały przeanalizowane na podstawie względnej zmiany $Dv(50)$. Względny spadek lub wzrost wartości $Dv(50)$ został przedstawiony jako stosunek wielkości w 3 minucie ($Dv(50)_{(t)}$) do wartości zmierzonej po 30 sekundach emisji ($Dv(50)_{(0)}$) (Rys. 10.25):

$$Z = \frac{Dv(50)_{(t)}}{Dv(50)_{(0)}} 100\% \quad (10.1)$$

Podczas trwania nebulizacji stałość wielkości kropeł otrzymywanych z substancji o potencjale wdrożeniowym do formulacji leczniczej jest kluczowym elementem. Ułamek Z umożliwia ilościowe sprawdzenie spadku lub wzrostu wielkości kropeł, a tym samym oszacowanie stałości właściwości formulacji, która również podlega ocenie w procesie projektowania nowego leku.



Rys. 10.25 Względna zmiana $Dv(50)$ w stosunku do wielkości początkowej podczas 3-minutowej nebulizacji dla roztworów agaru (po lewej) i hialuronianu sodu (po prawej).

Obecność jonów soli NaCl również w niewielkim stopniu wpłynęła na wielkość średnic i tym samym pozostałe parametry, co świadczy o mniejszym oddziaływaniu pomiędzy molekułami agaru a jonami soli niż w przypadku XG (Tab. 10.Z.1). Podobnie większą stabilność parametru $Dv(50)$ wykazano również w przypadku hialuronianu sodu. Wartości $Dv(50)$ z 3-ej minuty emisji otrzymane w przypadku obu nebulizatorów JN-1 i JN-2 wahały się wokół początkowej wartości. Natomiast obecność jonów soli NaCl w przypadku SH znacznie zmodyfikowała rozmiar kropeł, szerokość rozkładu oraz udział objętościowy kropeł drobnych. Analizując chmury aerozolowe uwalniane z JN-1, zaobserwowano ogólny wzrost średnich wielkości średnic $Dv(50)$ w obecności jonów soli NaCl, podobnie jak wraz ze wzrostem stężenia polisacharydu. Jednocześnie, dodatek jonów soli sprzyjał niewielkiemu wzrostowi GSD. Zauważono, że wartość GSD jest praktycznie niezależna od zawartości polisacharydu w zakresie badanych stężeń. Takie zmiany parametrów, w konsekwencji spowodowały spadek

parametru $\%V < 5 \mu\text{m}$ (FPF) (Tab. 10.Z.1). Zauważone zmiany powiązane są przede wszystkim z obecnością jonów soli i ich oddziaływaniem na strukturę molekuł.

Tab.10.6 Zmiany parametrów reologicznych prawa potęgowego Ostwald'a-de Waale'a wraz z czasem trwania procesu atomizacji z uwzględnieniem początkowej objętości cieczy emitowanej z komory nebulizacji (25 ° C)

Biopolimer	Początkowe stężenie (mg/ml)	Nebulizator	Objętość początkowa rozpylanej cieczy (ml)	Czas emisji (s)	Wskaźnik charakterystyczny płynięcia (n) (-)	Wzrost n (%)	współczynnik konsystencji (k) (mPas)	Spadek k (%)
XG	3	JN-1	5	0	0.32	146.05	0.79	46.42
				30	0.32		0.79	
				60	0.34		0.66	
				240	0.46		0.37	
	2	JN-1	5	0	0.38	191.41	0.40	13.97
				30	0.43		0.31	
				60	0.46		0.28	
				240	0.73		0.06	
	1,5	JN-1	5	0	0.53	180.65	0.09	35.60
				30	0.74		0.03	
				60	0.74		0.03	
				240	0.95		0.01	
AG	3	JN-1	5	0	0.37	-	0.22	-
				30	0.37		0.14	
				60	0.39		0.18	
				240	0.37		0.22	
	2	JN-1	5	0	0.44	-	1.03	48,54
				30	0.49		1.03	
				60	0.45		0.50	
				240	0.44		0.50	
	1,5	JN-1	5	0	0.60	91,67	0.07	114,29
				30	0.59		0.07	
				60	0.58		0.07	
				240	0.55		0.08	

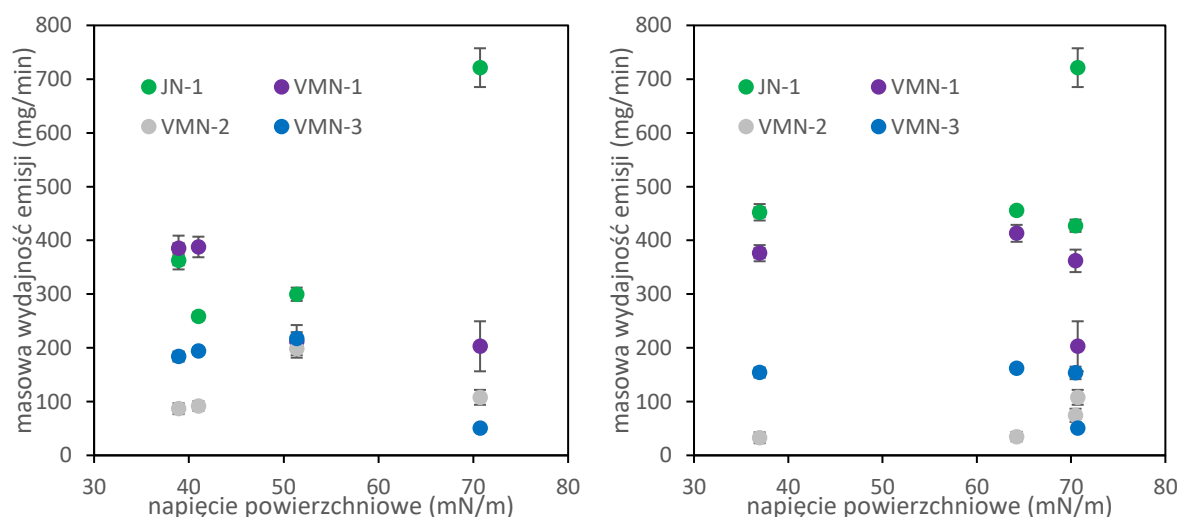
Stabilność wielkości kropeł emitowanych z nebulizatorów pneumatycznych w procesie atomizacji roztworów agaru może być analizowana również poprzez badania zmienności parametrów reologicznych prawa potęgowego Ostwald'a-de Waale'a cieczy obecnej w nebulizatorze w wybranych punktach czasowych (przed atomizacją – 0s, po 30s, po 60s i po 4-minutach procesu) (Tab. 10.6). Agar zestawiono w tych badaniach z mniej stabilną pod względem wartości parametrów reologicznych gumą ksantanową. Wyniki pokazują, że ciecz obecna w komorze nebulizatora podczas rozpylania roztworu XG wykazał wzrost wskaźnika charakterystycznego płynięcia oraz spadek współczynnika konsystencji, co świadczy o rozrzedzaniu cieczy wraz z trwaniem procesu atomizacji i zmiany charakteru płynu z rozrzedzanego ścinaniem na zbliżony do niutonowskiego. Testowane nebulizatory są zasilane

sprężonym powietrzem, które wywołuje naprężenia ścinające, co również może powodować rozrywanie wiązań pomiędzy łańcuchami polisacharydu. W miarę upływu czasu pracy nebulizatora może dojść do reorganizacji struktury przestrzennej XG, co manifestuje się w postaci zmiany właściwości reologicznych. Te z kolei są odpowiedzialne za zmianę wielkości kropelek emitowanych z nebulizatora. Z kolei, roztwory agaru wykazywały się znacznie większą odpornością na działanie sił ścinających niż XG. Niewielkie zmiany obserwowane są jedynie przy najniższym badanym stężeniu (1,5 mg/ml).

Można ogólnie przyjąć, że im wyższe stężenie polisacharydu tym zmiany w wartościach parametrów k i n w ciągu 4-minutowej nebulizacji są mniejsze. Stąd, wyższa zawartość biopolimeru zwiększa odporność na siły niszczące i tym samym lepiej stabilizuje strukturę układu łańcuchów.

10.2.2.3. Wpływ napięcia powierzchniowego cieczy na charakterystykę aerozolu i przebieg procesu atomizacji w wybranych nebulizatorach

Wydajność masowa emisji

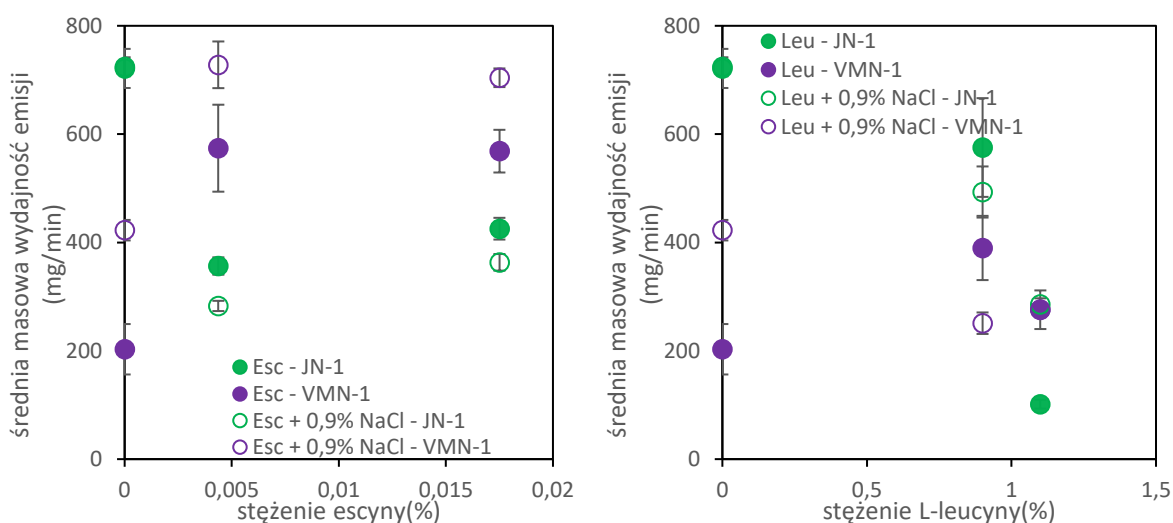


Rys. 10.26. Zmiana średniej wydajności masowej emisji aerozolu w funkcji napięcia powierzchniowego na przykładzie rozpraszania roztworu Tweenu 80 (po lewej) i BAC (po prawej) w różnych nebulizatorach.

Analiza wpływu napięcia powierzchniowego na wydajność masową emisji aerozolu, została przeprowadzona na podstawie wartości średnich uzyskanych w wyniku rozpraszania roztworu zawierającego niejonowy surfaktant Tween 80 oraz jonowe molekuly chlorku benzalkoniowego nie daje jednoznacznych wniosków (Rys. 10.26). Dodatek Tweenu 80 spowodował znaczące obniżenie wartości napięcia powierzchniowego oraz średniej wydajności emisji z nebulizatora pneumatycznego JN-1. Podobny efekt zaobserwowano również w przypadku VMN-2 wyposażonego w polimerową membranę. Z drugiej strony obecność niejonowego surfaktantu spowodowała widoczny wzrost wydajności emisji w

przypadku dwóch pozostałych nebulizatorów siateczkowych (VMN-1 i VMN-3) wyposażonych w metalowe membrany.

Analizując dane uzyskane przy rozpraszaniu cieczy zawierających drugi ze środków powierzchniowo czynnych, tzn. jonowego BAC zauważono analogiczną tendencję spadku wydajności nebulizacji prowadzonej z użyciem JN-1 wraz ze spadkiem napięcia powierzchniowego. Zależności dla nebulizatorów siateczkowych mają również analogiczny przebieg do tych obserwowanych dla Tweenu 80. Potwierdza to istotny wpływ napięcia powierzchniowego na wydajność emisji aerozolu w każdym rodzaju nebulizatora.



Rys. 10.27 Średnia masowa wydajność wyemitowana podczas nebulizacji w wybranych urządzeniach medycznych w funkcji stężenia escyny (po lewej) i L-leucyny (po prawej)

Ze względu na trudne do jednoznacznej analizy zależności pomiędzy wydajnością emisji a napięciem powierzchniowym zdecydowano się na przeprowadzenie charakterystyki jakości aerozolu uzyskiwanego w wyniku atomizacji roztworów modyfikatorów napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego, wybierając jedno urządzenie wykazujące spadek emisji wraz z obniżeniem napięcia powierzchniowego – nebulizator VMN-1 oraz jedną wykazującą wzrost – nebulizator JN-1. Na Rys. 10.27 przedstawiono średnią masową wydajność wyemitowanej dawki podczas 4-minutowej nebulizacji w urządzeniach JN-1 i VMN-1 w funkcji stężenia modyfikatora napięcia powierzchniowego. Duża zmienność i niepewność (stosunkowo spore słupki błędów) potwierdzają wcześniej analizowane wyniki rozpraszania roztworów Tweenu 80 i BAC. Jednakże, ogólnie można przyjąć, że wraz ze wzrostem stężenia escyny (czyli spadku napięcia powierzchniowego) w przypadku nebulizatora pneumatycznego ma miejsce znaczny spadek średniej wydajności, a w przypadku urządzenia siateczkowego - jej duży wzrost. Dodatek NaCl nie wpływa na charakter tych zależności, a jedynie potęguje obserwowany wpływ, co wynika ze zmiany napięcia

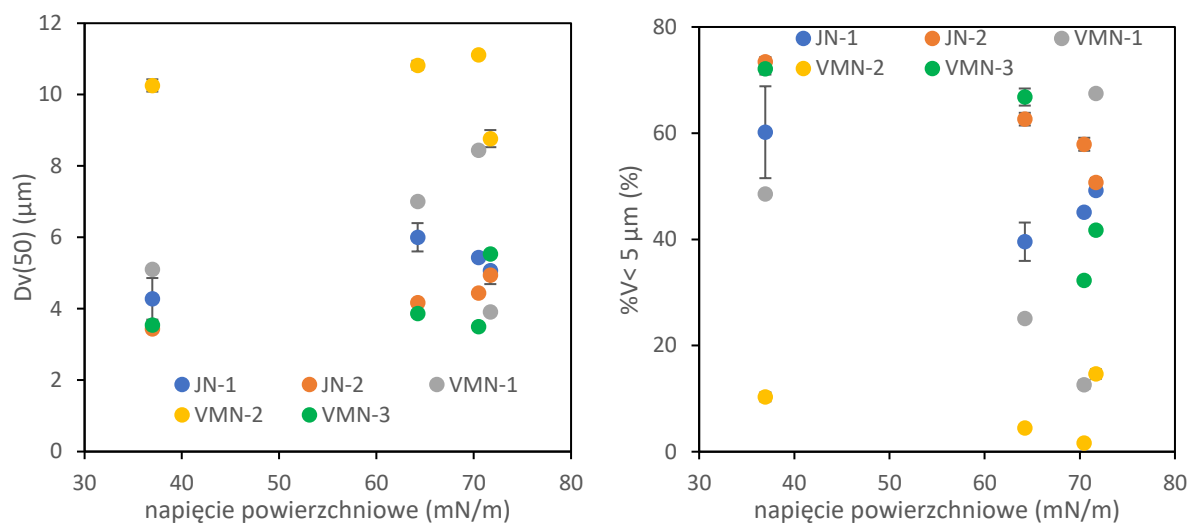
powierzchniowego roztworów escyny w obecności chlorku sodu (Tab. 10.Z.2). Podczas analizy związku wykazującego aktywność powierzchniową o mniejszych cząsteczkach – L-leucyny, także zaobserwowano niejednoznaczne zależności. Wraz ze spadkiem napięcia powierzchniowego odnotowano spadek średniej wydajności emisji z nebulizatora pneumatycznego JN-1 oraz wzrost podczas atomizacji z zastosowaniem VMN-1. Odstępstwo od tego trendu zaobserwowano podczas rozpraszania roztworu L-leucyny z dodatkiem NaCl.

Parametry oceny ilościowej właściwości uwalnianych aerozoli

Zależność pomiędzy napięciem powierzchniowym a właściwościami aerozolowymi chmur uwalnianych z nebulizatorów pneumatycznych i siateczkowych zostanie przedstawiona na przykładzie roztworów chlorku benzalkoniowego (BAC) (Rys. 10.28). Obniżenie wartości napięcia powierzchniowego zmniejsza zapotrzebowanie na energię, wymaganej do rozpadu cieczy. BAC obniża napięcie powierzchniowe wody w zakresie od 70,5 mN/m do 37,0 mN/m, Wpływa to na zmniejszenie $Dv(50)$ widoczne w przypadku nebulizatora siateczkowego VMN-3 oraz pneumatycznego JN-2. Wpływ napięcia powierzchniowego w przypadku JN-1 jest niejednoznaczny. Natomiast w nebulizatorach siateczkowych wraz ze wzrostem stężenia powstają coraz mniejsze krople. W przypadku VMN-3 zauważono obniżenie $Dv(50)$ już przy $\sigma=70,5$ mN/m w porównaniu z wodą (odpowiednio: 4,5 μm i 5,5 μm). Aerosol otrzymany z nebulizatora VMN-1 i VMN-2 charakteryzował się wzrostem średnicy aerodynamicznej $Dv(50)$ przy niskich stężeniach, która następnie spadała (od 8,4 μm do 5,1 μm w nebulizatorze VMN-1; od 11,1 do 10,3 μm w VMN-2). Podobną tendencję obserwowali inni badacze w pracy(242). W przypadku nebulizatora pneumatycznego JN-2 stwierdzono, że dodatek surfaktantu zmniejszał wielkość rozpraszanych kropeł.

Wszystkie emitowane aerozole z dodatkiem surfaktantu mają charakter polidyspersyjny. Jednakże obecność molekuł powierzchniowo-czynnych spowodował zwężenie szerokości rozkładu w przypadku w JN-2, VMN-1 i VMN-2 (dwie wyższe wartości σ), co jest korzystne z punktu widzenia zastosowania terapeutycznego. W pozostałych przypadkach szerokość rozkładu (określana przez geometryczne odchylenie standardowe była na podobnym poziomie (Załącznik – Rys. 10.Z.7). Zmiany są też widoczne w wielkości udziału frakcji kropeł drobnych w chmurze aerozolowej (Rys. 10.28). Obecność BAC w poszczególnych nebulizatorach w niejednakowy sposób wpływa na FPF. W JN-1 i JN-2 dopiero przy niższych wartościach σ udział kropeł o średnicy poniżej 5 μm było wyższe w porównaniu z wodą. W VMN-1 i VMN-2 zaobserwowano stopniowy wzrost udziału kropeł o średnicy poniżej 5 μm wraz z obniżaniem σ , z tym, że wartości FPF zawsze utrzymywały się poniżej wartości odnotowanej przy

rozpylaniu wody. Wyjątek stanowi VMN-3, gdzie obecność BAC zawsze zwiększała FPF (wzrost od ok. 58% do ok. 74%).



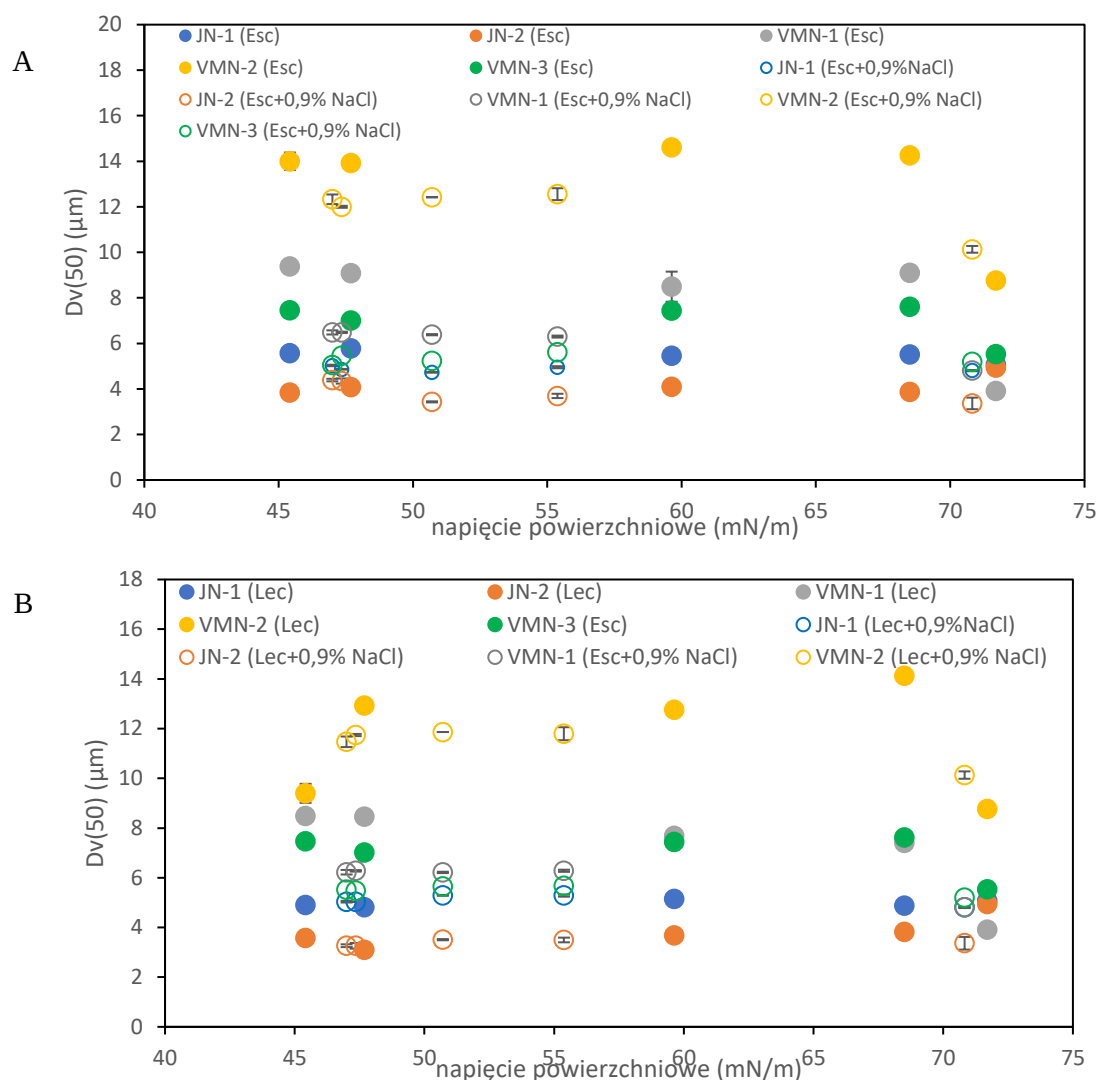
Rys. 10.28 Średnica $Dv(50)$ kropeł (po lewej) i udział objętościowy frakcji kropeł (po prawej) emitowanych z wybranych leków inhalacyjnych przy użyciu nebulizatora pneumatycznego i siateczkowego.

Nawiązując do badań przedstawionych w podrozdziale 10.2.2.1, wpływ obecności soli na rozmiar kropeł można także ocenić poprzez analizę średnic $Dv(50)$ kropeł powstałych w wyniku rozpraszania roztworów surfaktantów Tween 80 i BAC w soli fizjologicznej, czy roztworów substancji pochodzenia naturalnego cechujących się zdolnością do modyfikacji napięcia powierzchniowego lub lepkości. Tween 80, ze względu na swoją niejonową budowę, nie jest podatny na oddziaływanie jonów mocnego elektrolitu (NaCl) w takim samym stopniu jak jonowe molekuly (BAC)(310). W przypadku BAC zmianie ulega wielkość napięcia powierzchniowego, przykładowo 0,01% roztwór BAC o napięciu powierzchniowym 64,2 mN/m po dodaniu soli chlorku sodu (do osiągnięcia stężenia 0,9%) cechuje się napięciem powierzchniowym równym 35,9 mN/m (Załącznik - Rys. 10.Z.8.). Drugą konsekwencją jest raportowany także w pracy(236) efekt stabilizujący NaCl na średnice kropeł aerozolu. Ten efekt został zaobserwowany w przypadku wszystkich stężeń surfaktantu z dodatkiem chlorku sodu przy pomocy nebulizatorów JN-1, VMN-1 i VMN-3. Wielkość emitowanych kropeł jest porównywalna do otrzymywanych przy rozpraszaniu roztworów soli fizjologicznej, co może świadczyć o istotnej roli pełnionej przez nośniki ładunków (jony).

Kontynuując rozważania dotyczące wpływu jonów chlorkowych i sodowych na wielkość kropeł aerozolu przeanalizowano również kryteria oceny ilościowej aerozoli rozpraszanych roztworów biosurfaktantów tj. lecytyny sojowej, L-leucyny i escyny. Zaobserwowano, że obecność anionów chlorkowych i kationów sodowych również wpływa na wartość parametrów opisujących jakość powstającego aerozolu. Sam dodatek modyfikatorów napięcia

powierzchniowego pochodzenia naturalnego, m.in. lecytyny sojowej oraz escyny, stanowiących mieszaninę wielu substancji wykazujących aktywność powierzchniową, wpłynął w podobny sposób na medianę, udział kropel drobnych oraz polidispersyjność chmury. Podobieństwo we wpływie na $Dv(50)$ przedstawiono na dwóch poniższych wykresach (Rys. 10.29). Obecność substancji powierzchniowo czynnej powoduje wzrost $Dv(50)$. W szczególności, znaczący wzrost średnic stwierdzono w przypadku VMN. Wyjątek stanowi nebulizator JN-2, gdzie modyfikatory napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego tj. escyna i lecytyna, w wyraźny sposób obniżyły wielkość średnic z $4,95\ \mu\text{m}$ (woda) do $3,87\ \mu\text{m}$ (0,025% roztwór lecytyny sojowej) oraz do $3,82\ \mu\text{m}$ (0,004375% roztwór escyny). Obecność modyfikatorów nie wpłynęła w znaczący sposób na wzrost polidispersyjności aerozolu z nebulizatorów, ale zauważono wyraźną zmianę w wartościach udziału objętościowego kropel drobnych. Przykładowo, porównując aerozol wodny oraz mieszaniny o najmniejszej zawartości modyfikatorów (0,004375% escyny lub 0,025% lecytyny sojowej) wartości parametru $\%V<5\ \mu\text{m}$ spadły od ok. 5 p.p. (nebulizator JN-1), a najwięcej po 54 p.p. (VMN-1; 0,004375% escyna) i 12 p.p. (VMN-2; 0,025% lecytyna sojowa). Jedynie przy użyciu JN-2 zauważono wzrost wartości $\%V<5\ \mu\text{m}$ o 16 p.p., co jest związane ze zmniejszeniem wielkości średnic kropel. Wzrost zawartości substancji powierzchniowo czynnych nie wskazuje na jednoznaczną tendencję wzrostu lub spadku udziału kropel drobnych.

Ze względu na wieloskładnikowość mieszanin tworzących lecytynę sojową oraz escynę trudno jest także stwierdzić mechanizm oddziaływania NaCl. Obecność NaCl modyfikuje wyraźniej napięcie powierzchniowe escyny. W obu przypadkach przesuwają również granicę minimalnego σ (Tab. 10.4.). Niższe wartości napięcia powierzchniowego sprzyjają powstawaniu mniejszych kropel, co obserwowane jest we wszystkich testowanych nebulizatorach (Rys. 10.29). Większe różnice pomiędzy rozmiarami kropel otrzymanymi w wyniku rozpylania cieczy z dodatkiem soli odnotowano dla VMN. Porównując wielkość średnic rozpraszanej soli fizjologicznej oraz mieszanin modyfikatorów σ pochodzenia naturalnego w soli fizjologicznej, stwierdzono wzrost rozmiarów kropel w obecności modyfikatorów. Przebieg tych zmian jest analogiczny do obserwowanych dla roztworów bez NaCl. Obecność soli wpłynęła również na wzrost szerokości rozkładu wielkości oraz udział frakcji kropel drobnych (Tab. 10.Z.3).



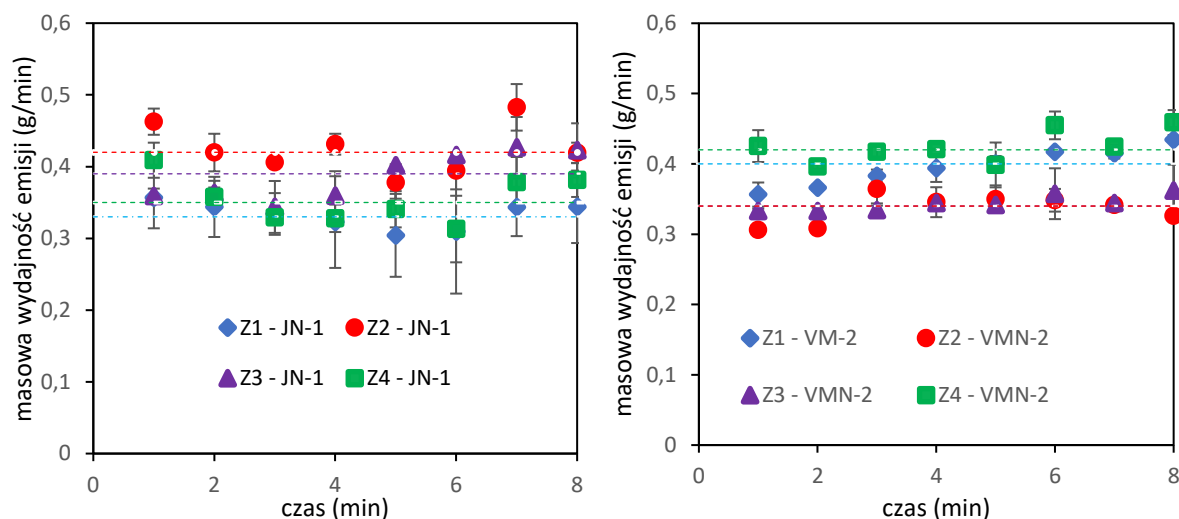
Rys. 10.29 Średnica $Dv(50)$ kropeł emitowanych z roztworów escyny (A) i lecytyny sojowej (B) oraz w wodzie lub soli fizjologicznej przy użyciu nebulizatorów pneumatycznych i siateczkowych.

10.2.3. Wpływ właściwości fizykochemicznych leków inhalacyjnych na właściwości aerozolu

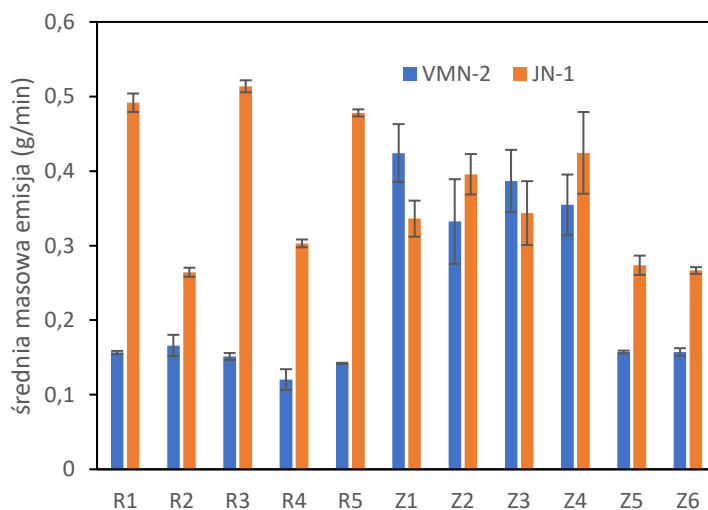
Wydajność masowa emisji

Rolę napięcia powierzchniowego dla wydajności emisji określono również dla leków inhalacyjnych. Wybrano w tym celu preparaty o takiej samej lepkości dynamicznej tj. zawiesiny Z1-Z4. Prowadzono 4-minutową atomizację leków Z1-Z4 z użyciem nebulizatora pneumatycznego JN-1 i z wibrującą membraną VMN-2. Otrzymane dane (Rys. 10.30) pokazały, że wartości chwilowe wydajności emisji fluktuują wokół średniej, a większe wahania występują w nebulizatorze pneumatycznym. O większej powtarzalności wydajności emisji z nebulizatora VMN-2 świadczą również mniejsze słupki błędów. Uzyskane wyniki wskazują również, że występują różnice pomiędzy lekiem oryginalnym (Z1) i generycznymi (Z2-Z4) oraz na istnienie optymalnego układu lek-nebulizator. Przykładowo, większe dawki Z2

uwalniane z nebulizatora otrzymamy stosując JN-1 niż VMN-2, a w przypadku Z4 korzystniejsze jest zastosowanie nebulizatora siateczkowego. Z kolei emisja zawiesin Z1-Z4 dostarcza kolejnego dowodu na wpływ właściwości fizykochemicznych na produkcję aerozolu i różnic pomiędzy lekami generycznymi i oryginalnym lekiem. Mniejsze różnice odnotowano przy emisji leku oryginalnego Z5 i jego odpowiednika generycznego Z6.



Rys. 10.30 Chwilowa wydajność masowa emisji aerozolu powstałego w procesie atomizacji leków inhalacyjnych Z1-Z4 w nebulizatorze pneumatycznym JN-1 (po lewej) i membranowym VMN-2 (po prawej)



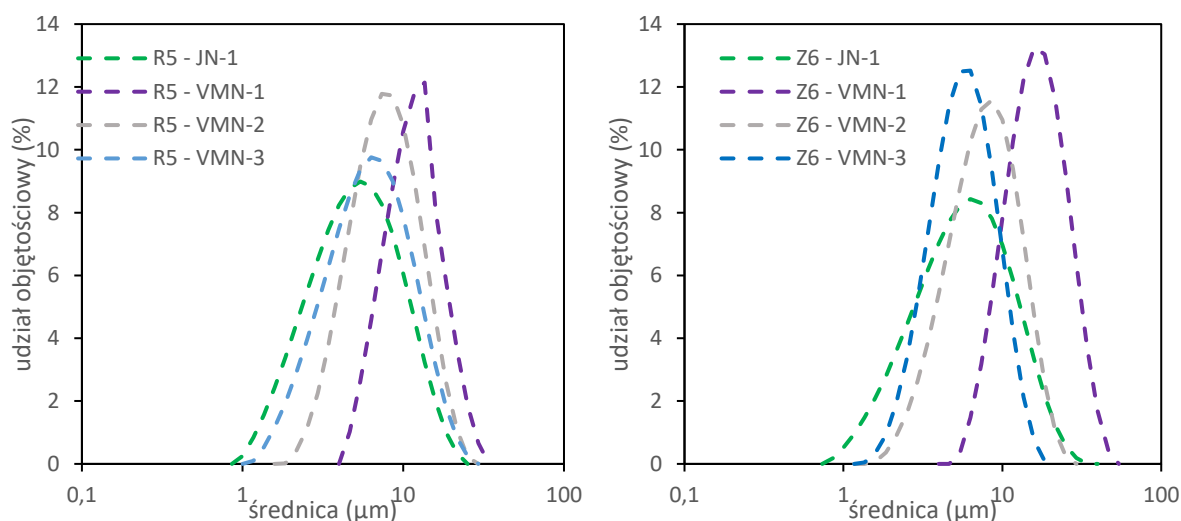
Rys. 10.31 Średnia wydajność masowa emisji aerozolu uwalnianego z nebulizatora

Z kolei, analiza średniej wydajności emisji leków inhalacyjnych w postaci roztworów (Rys. 10.31) pokazuje, że zależy ona głównie od konstrukcji urządzenia atomizującego, a dopiero w drugiej kolejności od napięcia powierzchniowego. Otrzymane wyniki wskazują, że wyższą wydajnością emisji charakteryzuje się nebulizator pneumatyczny. Jest ona również związana z właściwościami atomizowanej cieczy. Produkty R2 i R4 charakteryzują się najniższym napięciem powierzchniowym spośród pozostałych roztworów (R2 - 29,38 mN/m oraz R4 -

35,32 mN/m) i w przypadku rozpraszania z użyciem JN-1 obserwowane są zdecydowane najniższe wydajności (R2 – 264,33 mg/min oraz R4 - 303 mg/min). Takiej tendencji nie zauważono w przypadku nebulizatora siateczkowego VMN-2.

Parametry oceny ilościowej właściwości uwalnianych aerozoli

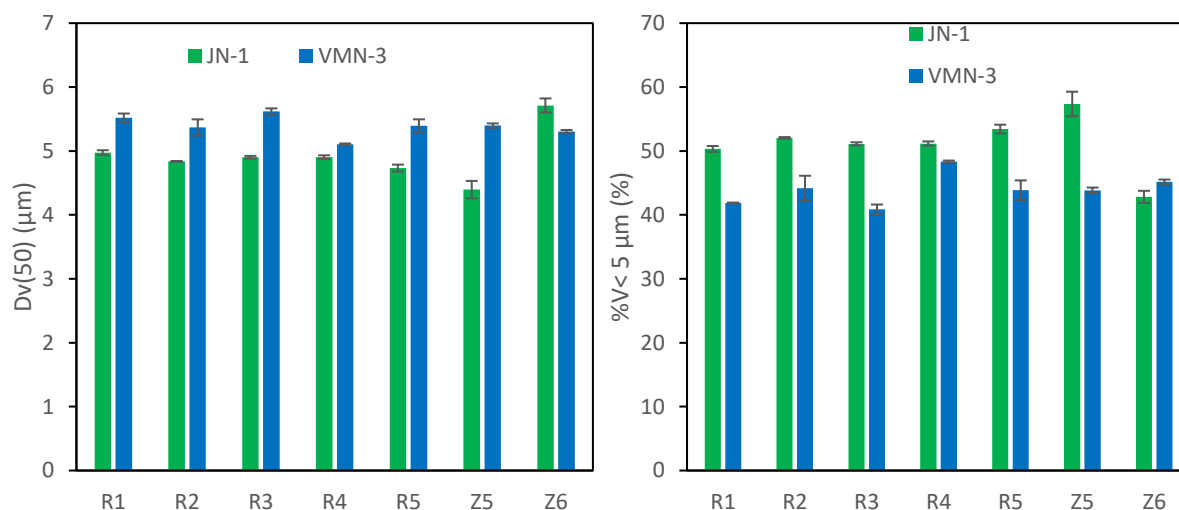
Kontynuując rozważania nad zależnością pomiędzy sposobem działania nebulizatora i właściwościami aerozolu, przeanalizowano rozkłady wielkości kropeł (Rys. 10.32) otrzymanych w wyniku rozpraszania leków w formie roztworu (R5) oraz zawiesiny (Z6). Można zaobserwować, że rozkłady wielkości kropeł otrzymanych w wyniku użycia nebulizatorów siateczkowych są węższe niż w przypadku urządzenia pneumatycznego. Jednocześnie, zauważono, że wartości $Dv(50)$ są znacznie większe w przypadku aerozoli otrzymywanych z nebulizatorów siateczkowych niż nebulizatora pneumatycznego. Różnica we właściwościach fizykochemicznych tj. napięciu powierzchniowym cechującym zawiesinę (40,6 mN/m) i roztwór leku (59,4 mN/m) odgrywa rolę drugorzędną i tylko w nieznaczny sposób wpływa na wielkość kropeł.



Rys. 10.32 Rozkład wielkości kropeł wytwarzanych poprzez atomizację leków R5 (roztwór – po lewej) oraz Z6 (zawiesina – po prawej) w czterech typach nebulizatorów pneumatycznym JN-1 i siateczkowych VMN-1, VMN-2 i VMN-3

Znaczącą rolę konstrukcji nebulizatora dla wielkości uwalnianych kropeł potwierdzają także badania rozkładów wielkości kropeł powstałych w wyniku rozpraszania leków inhalacyjnych. Leki, dla których wyniki przedstawiono na wykresie Rys. 10.33, charakteryzują się podobną lepkością dynamiczną, ale różnią się napięciem powierzchniowym w zakresie od 59,4 (R5) do 29,4 mN/m (R2). Analizując, średnicę $Dv(50)$ dla leków w postaci roztworów nie stwierdzono znacznego wpływu napięcia powierzchniowego na wielkość kropeł. Dla zawiesin w przypadku nebulizatora pneumatycznego JN-1 wartości udziału kropeł drobnych oraz $Dv(50)$ były na podobnym poziomie w przypadku leków R1-R5, zaś różniły się dla Z5 i Z6. Różnic

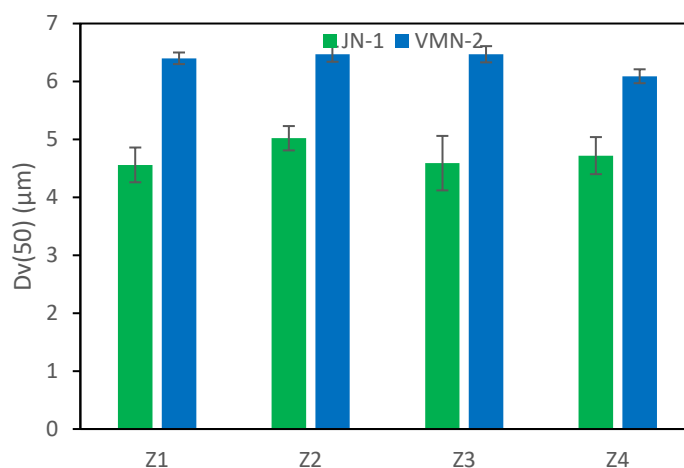
takich nie stwierdzono w przypadku stosowania nebulizatorów VMN. Porównanie pokazuje, że korzystniejszymi właściwościami, pod względem terapeutycznym, charakteryzuje się aerozol emitowany z nebulizatora pneumatycznego JN-1. Pomimo większej polidispersyjności ($GSD=1,8-1,9$) niż VMN-3 (GSD ok. 1,5), aerozol ten ma właściwości umożliwiające większą penetrację płuc.



Rys. 10.33 Średnica $Dv(50)$ kropeł (po lewej) i udział objętościowy frakcji kropeł drobnych (po prawej) emitowanych z wybranych leków inhalacyjnych przy użyciu JN i VMN

Podobne wnioski wynikają z różnic pomiędzy nebulizatorem JN-1 a VMN-2 stwierdzono w badaniach zawiesin leków inhalacyjnych (Rys. 10.34) m.in. porównując lek oryginalny Z1 z jego odpowiednikami (generykami: Z2, Z3 i Z4). Również w tym przypadku odnotowano korzystniejsze wielkości kropeł emitowanych z nebulizatora pneumatycznego ($Dv(50)$ 4,5-5,0 μm) niż siateczkowego ($Dv(50)$ 6,1-6,5 μm). Wiąże się to również z większym udziałem pożądanych kropeł drobnych tj. o średnicy poniżej 5 μm . Można także zauważyć wyniki uzyskane dla VMN są dużo bardziej powtarzalne niż dla JN. Rozbieżności pomiędzy wielkościami kropeł otrzymanymi w wyniku rozpylania leków generycznych i oryginalnego można tłumaczyć różnicami w składzie wynikającymi ze stosowanych substancji pomocniczych, co wiąże się z różnicami we właściwościach fizykochemicznych (podrozdział 10.1.2). W generykach ilość/stężenie API musi być identyczne jak w lekach oryginalnych.

Podsumowując tą część badań, należy podkreślić, że czynnikiem determinującym wielkości emitowanych kropeł jest konstrukcja nebulizatora, a dla danego urządzenia znaczenie mają zjawiska związane z właściwościami fizykochemicznymi.



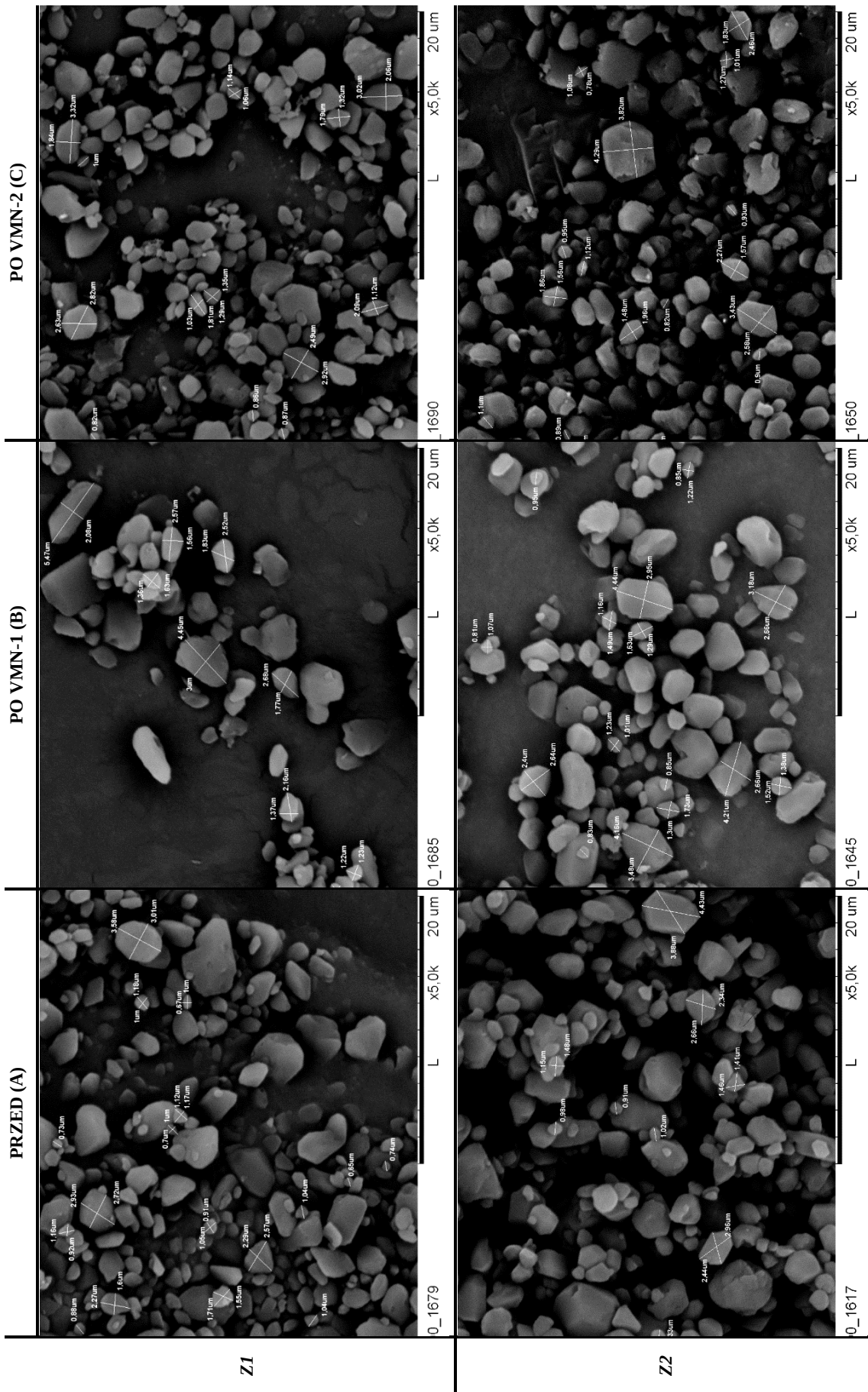
Rys. 10.34 Średnica $Dv(50)$ kropeł uzyskiwanych w wyniku rozproszenia wybranych zawiesinowych leków inhalacyjnych: (Z1 - oryginalnego i Z2-Z4 – generycznych) w nebulizatorach: pneumatycznym i siateczkowym

Analiza morfologii cząstek oraz rozpadu agregatów cząstek zawiesin w wyniku atomizacji w nebulizatorach siateczkowych

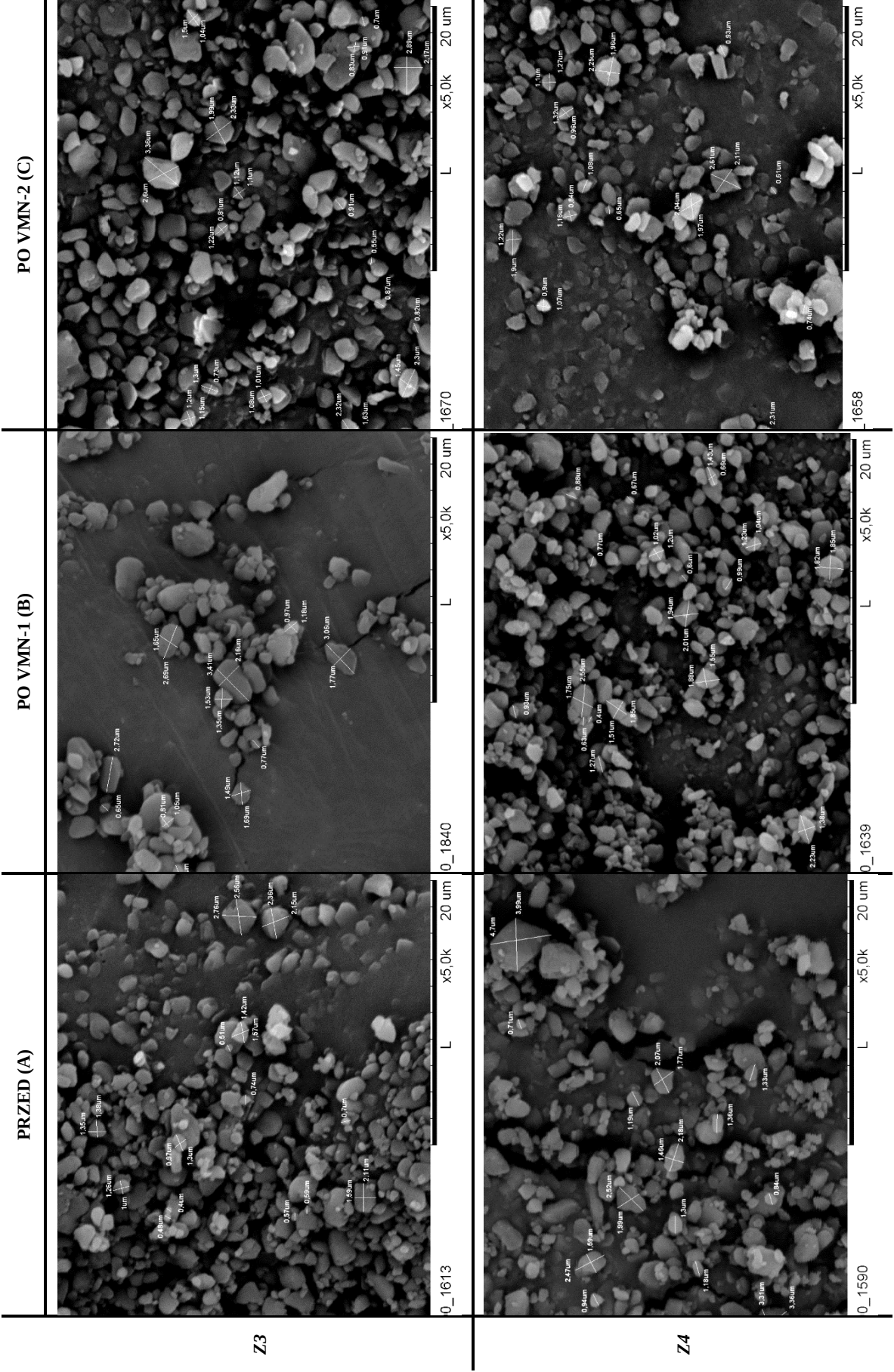
Poprzez ocenę morfologii cząstek substancji aktywnej (ich strukturę, kształt) oraz tendencji do agregacji i sedymentacji (wyniki opisane w podrozdziale 10.1.2.1 i 10.1.2.2) można ocenić wpływ procesu atomizacji przebiegającym w nebulizatorach siateczkowych (opis przedstawiono w podrozdziale 6.1.2.2.2) na lek w postaci zawiesiny.

Ocenę rozpadu agregatów cząstek API w wyniku atomizacji zawiesin inhalacyjnych w nebulizatorach VMN oparto o analizę obrazów dwuwymiarowych (Rys. 10.35 i 10.36 Z1-Z4 B oraz C). Po rozpyleniu czyli przejściu cieczy przez wibrującą membranę nebulizatora przeprowadzono analizę rozkładu wielkości cząstek API, po zebraniu aerozolu wyemitowanego z nebulizatora. Stwierdzono, że w przypadku nebulizatora VMN-1, jedynie w zawiesinie Z4 występuje duża liczba cząstek w próbce. W pozostałych przypadkach mamy do czynienia z mniej licznymi zagęszczeniami agregatów drobnych cząstek lub cząstkami o większych rozmiarach. Natomiast VMN-2 w przypadku każdej z badanych zawiesin charakteryzuje się licznymi skupiskami cząstek o zróżnicowanych wymiarach. Taka sytuacja może być spowodowana dużą liczbą małych cząstek tworzących struktury agregatów w zawiesinie Z4. W wyniku intensywnej wibracji membrany dochodzi do rozbicia skupisk cząstek i następuje emisja kropeł zawierających drobne cząstki. Ciecz, zawierająca częściowo rozbite już agregaty, wnika do otworów membrany, w których poddana jest naprężeniom ścinającym. W tym momencie może dojść do ostatecznego rozbicia skupisk cząstek. Różnice pomiędzy liczebnością cząstek w próbkach VMN-1 i VMN-2 mogą wynikać również z różnic w wielkości porów membrany, pokazanych na Rys. 6.4.

Ocenę rozpadu agregatów cząstek API podczas atomizacji zawiesin w nebulizatorach VMN oparto również o analizę zmiany absorbancji (ΔAbs). Przeprowadzone doświadczenie, w którym emitowano zawiesiny leków inhalacyjnych o tym samym API (budezonid) w nebulizatorach VMN-2 i VMN-3 (Rys. 10.37), umożliwiło porównanie stabilności w czasie: (i) leku przed atomizacją (Z1 lub Z2), (ii) farmaceutyku zebranego z aerozolu tj. po przejściu przez membranę (ozn. Z1-skolekcjonowany lub Z2-skolekcjonowany) oraz (iii) preparatu, który nie uległ rozpyleniu i pozostał w komorze nebulizatora po ustaniu procesu atomizacji (ozn. Z1-objętość rezydualna lub Z2-objętość rezydualna).

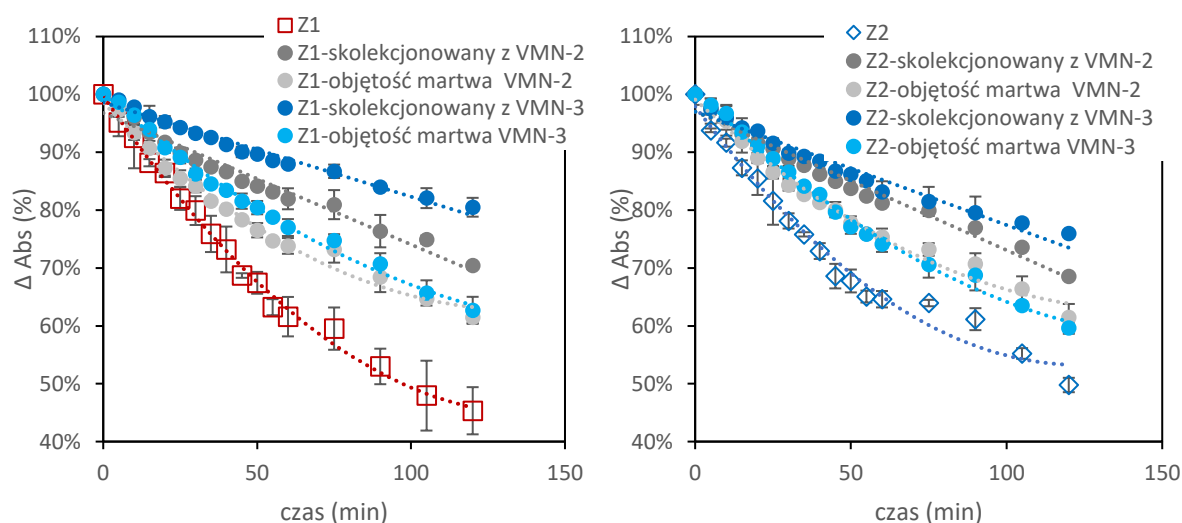


Rys.10.35. Zdjęcia SEM cząstek API w lekach Z1 i Z2 przed atomizacją (A) oraz po procesie atomizacji cieczy inhalacyjnej w nebulizatorze VMN-1 (B) oraz VMN-2 (C).



Rys.10.36 Zdjęcia SEM cząstek API w lekach Z3 i Z4 przed atomizacją (A) oraz po procesie atomizacji cieczy inhalacyjnej w VMN-1 (B) oraz VMN-2 (C).

Przebieg krzywych ΔAbs jest nieliniowy, przy czym leki nierozpylone charakteryzują się największą dynamiką zmian oznaczającą największe szybkości opadania cząstek (klarowania zawiesiny). W przypadku obu badanych leków otrzymano podobne zależności. Mniejszym spadkiem absorbancji cechują się próbki preparatu, który nie uległ emisji (objętość rezydualna). W przypadku Z1 osiągnięto poziom 61,5% (VMN-2) oraz 62,6% (VMN-3), a Z2 61,5% (VMN-2) oraz 59,6% (VMN-3). Świadczy to o pozostaniu części sedymentujących cząstek lub agregatów w komorze nebulizatora po ok. 8 minutach trwania nebulizacji, które jednak opadały wolniej niż w leku niepoddawanym rozpylaniu. Świadczy to o rozbiciu agregatów cząstek obecnych pierwotnie w formulacji. Najmniejszą dynamiką przebiegu krzywych charakteryzowały się próbki po wykropleniu aerozolu. Skolekcjonowana próbka zawiesiny Z1 cechowała się spadkiem absorbancji do 70,4% w przypadku VMN-2 oraz 80,5% w przypadku VMN-3. Natomiast skolekcjonowany farmaceutyk Z2 osiągnął ΔAbs na poziomie 68,5% w przypadku VMN-2 oraz 75,9% w przypadku VMN-3. Takie zawężone zakresy spadków absorbancji świadczące o wolniejszej sedymentacji wskazują na rozbijanie agregatów cząstek API podczas emisji cieczy w nebulizatorach siateczkowych, co odbywa się w wyniku działania vibracji ultradźwiękowych (ok. 100mHz).

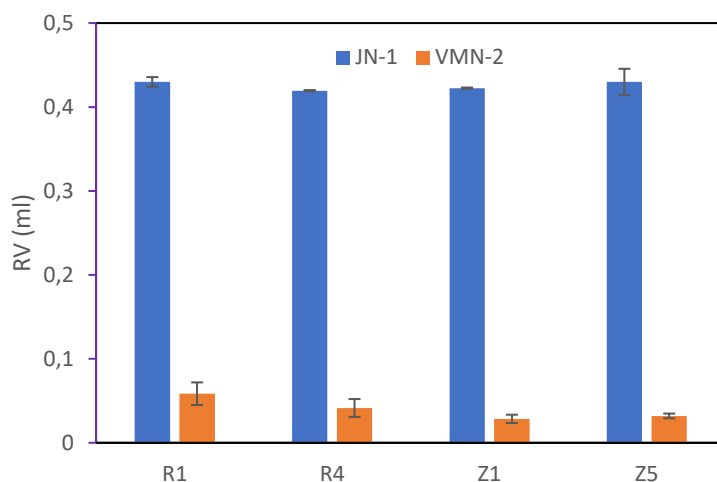


Rys. 10.37. Względny spadek absorbancji zawiesiny Z1 (po lewej) i Z2 (po prawej) atomizowanej przy zastosowaniu VMN-2 i VMN-3.

Wpływ właściwości fizykochemicznych leków inhalacyjnych na objętość rezydualną wybranych nebulizatorów

Wpływ właściwości fizykochemicznych tj. napięcia powierzchniowego, lepkości oraz przewodności elektrolitycznej (przedstawione w podrozdziale 10.2.2), na RV oceniono na przykładzie rzeczywistych cieczy rozpylanych w aerozoterapii – roztworów oraz zawiesin leków inhalacyjnych. Analizując wpływ (Rys. 10.38) napięcia powierzchniowego, RV dla leku

R4 ($\sigma=35,3$ mN/m) zgodnie z przewidywaniami osiąga niższą wartość w nebulizatorze siateczkowym VMN-2 ok. 0,04 ml oraz w nebulizatorze pneumatycznym JN-1 0,42 ml niż R1 ($\sigma=40,8$ mN/m): VMN-2 - 0,06 ml, a JN-1 - 0,43 ml. Lepkości obu leków są podobne, a więc napięcie powierzchniowe jest tutaj dominującą właściwością decydującą o wartości RV. Dla zawiesin leków inhalacyjnych Z1 i Z5 z VMN-2 obserwuje się mniejsze wartości RV, co wynika przede wszystkim z różnych wartości lepkości oraz, w mniejszym stopniu, napięcia powierzchniowego (Tab. 10.2).



Rys. 10.38 Średnie objętości rezydualne nebulizatorów VMN-2 i VMN-3 przy emisji wybranych leków inhalacyjnych.

Wpływ procesu atomizacji na temperaturę cieczy rozpylanej zawierającej leki inhalacyjne

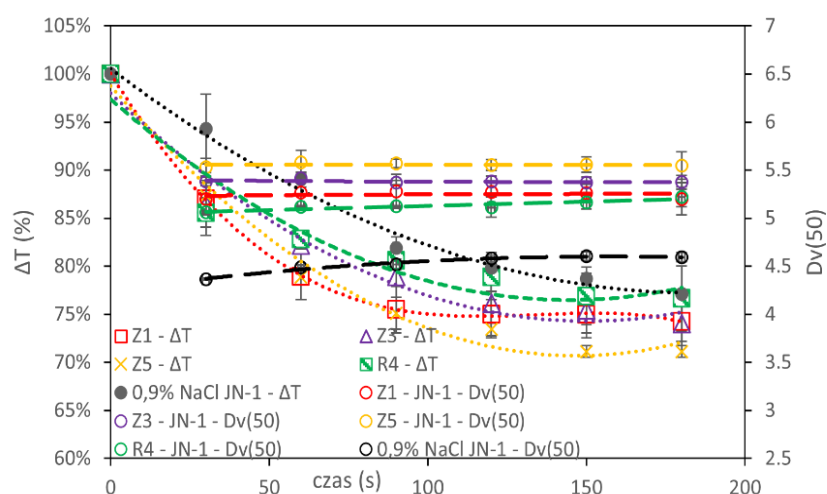
Zmniejszająca się temperatura rozpylanej cieczy zawierającej leki inhalacyjne mogą przekładać się na zmiany w jakości aerozolu w trakcie trwania procesu atomizacji, a co za tym idzie na skuteczność aerzoloterapii. Zbadane wcześniej tendencje dotyczące wpływu właściwości fizykochemicznych tj. napięcia powierzchniowego, lepkości oraz przewodności elektrolitycznej (przedstawione w podrozdziale 10.2.2), sprawdzono na przykładzie rzeczywistych płynów stosowanych w terapiach inhalacyjnych. Przebieg krzywych ΔT na Rys. 10.39 wskazuje, że obecność w lekach inhalacyjnych API w postaci cząstek nierozpuszczalnych oraz obecność substancji pomocniczych zmieniających właściwości fizykochemiczne płynów wodnych wpływają na zakres spadku temperatur, przy czym kształt krzywych (tj. dynamika zmian) zostaje zachowany. Zauważono również niewielkie różnice pomiędzy lekiem oryginalnym a generycznym, wynikające prawdopodobnie z różnic w napięciu powierzchniowym. Temperatura leków inhalacyjnych podczas nebulizacji jest obniżana w większym stopniu niż w przypadku soli fizjologicznej (różnica ta wynosi do $1,7^{\circ}\text{C}$ - Tab. 10.7). Porównując proces atomizacji roztworu soli fizjologicznej oraz leków inhalacyjnych, w których faza wodna zawiera 0,9% NaCl, zauważono, że rozpylanie roztworu

chlorku sodu prowadzi do mniejszego spadku temperatury niż rozpraszanie farmaceutyków (Rys. 10.39). Różnice zanotowano też w przypadku rozmiarów kropeł. Mgły wytworzona z soli fizjologicznej cechują się MMAD równą ok. 4,5 μm , zaś leki inhalacyjne - z zakresu 5,2-5,5 μm . JN-1 emituje krople o podobnej wielkości w ciągu całego czasu trwania nebulizacji.

Tab. 10.7 Temperatura aerozolu w 3 minucie procesu atomizacji* podczas rozpylania wybranych substancji i leków.

	Rozpylane substancje - $T (^{\circ}\text{C})$					
	0,9% NaCl	0,1% BAC	0,1% Tween 80	Z1	Z3	R4
JN-1	16,9 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1	16,0 $\pm$ 0,3	15,2 $\pm$ 0,9	15,8 $\pm$ 0,5	15,4 $\pm$ 0,8

*punkt czasowy, w którym osiągnięto wartość quasi-równowagową temperatury



Rys. 10.39 Względna zmiana temperatury wybranych leków inhalacyjnych oraz soli fizjologicznej oraz $Dv(50)$ emitowanych kropeł podczas nebulizacji w nebulizatorach pneumatycznych JN-1 i JN-2

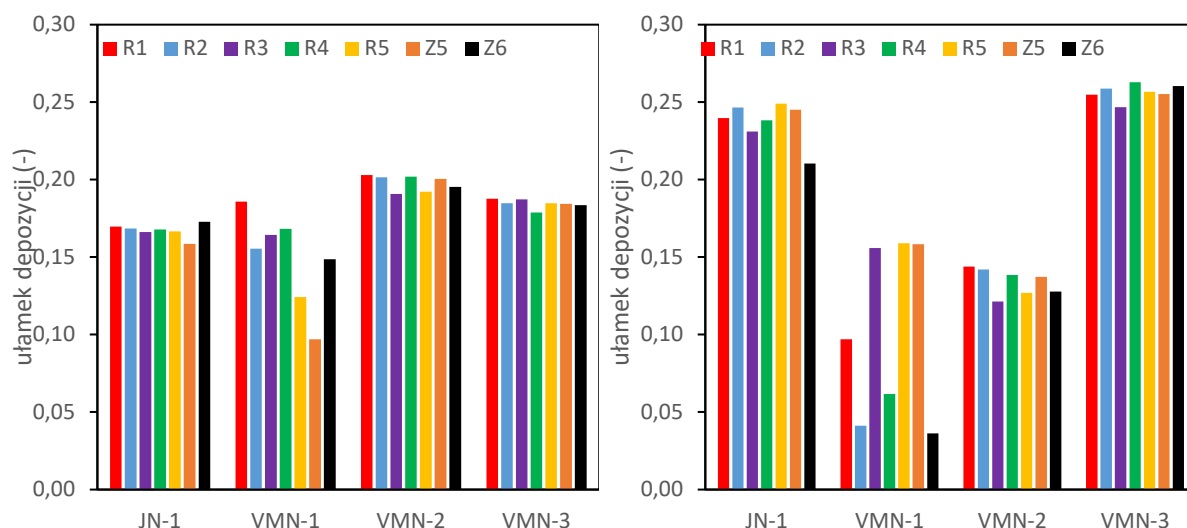
10.3. Oddziaływanie składników inhalowanych aerozoli z surfaktantem płucnym

10.3.1. Wyliczenie ilości aerozolu deponowanego w płucach

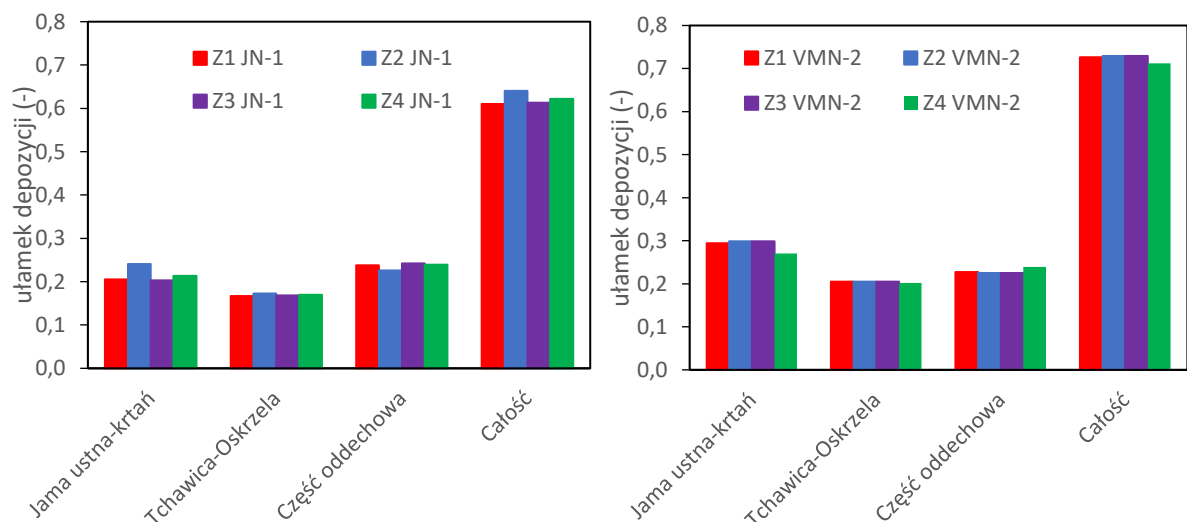
Wyniki uzyskane z pomiarów rozkładu wielkości kropeł aerozolu w poprzedniej części (podrozdział 0) zostały zaimplementowane do modelu MPPD. W ten sposób na podstawie otrzymanych danych: średnic $Dv(50)$, GSD oraz wprowadzonych warunków obliczeń zgodnie z Tab. 9.11, otrzymano ułamki depozycji mgły leczniczej w układzie oddechowym z uwzględnieniem jego trzech odcinków: jama ustna-gardło, rejon od tchawicy do oskrzeli oraz obszar płucny wymiany oddechowej, tj. małe oskrzeliki i pęcherzyki płucne, a także sumaryczny ułamek depozycji (całość). Ułamek depozycji stanowi ilość (masę) zdeponowaną w stosunku do ilości zainhalowanej. Na Rys. 10.40. zestawiono ułamki depozycji kropeł powstających przy rozpraszaniu roztworów (R1-R5) oraz zawiesin (Z5 i Z6) przy zastosowaniu wybranych nebulizatorów: pneumatycznego i siateczkowego. Wybrane leki mają działanie

lokalne i powinny się deponować w obszarze oskrzeli, gdzie znajdują się receptory, z którymi docelowo związane jest ich terapeutyczne działanie. Stąd też na wykresie po lewej stronie Rys. 10.40 przedstawiono ułamek depozycji w tym obszarze dróg oddechowych. Jak przedstawiono w podrozdziale 5.2, na skutek różnych czynników dochodzi także do niepożądanego osadzania się aerozolu w jamie ustnej i gardle. Zdeponowana w tym obszarze dawka nie ma założonego działania leczniczego i po połknięciu ulega neutralizacji w żołądku, choć może ona wywoływać również negatywne efekty uboczne. Zaobserwowano różnice w efektywności dostarczania leku z różnych nebulizatorów. Świadczy to, jak podkreślano w analizie poprzedniego podrozdziału (podrozdział 0), o dominacji konstrukcji urządzenia ponad pozostałymi czynnikami kształtującymi wielkości kropeł aerozolu. Z Rys. 10.40 wynika, że największe ułamki depozycji aerozolu w obszarze oskrzeli zapewniają nebulizatory siateczkowe VMN-2 i VMN-3. Nebulizator pneumatyczny charakteryzuje się mniejszymi wielkościami depozycji. Znaczące różnice pomiędzy uławkami depozycji leków uwidoczniły się przy emisji aerozolu wygenerowanego z VMN-1. Obserwujemy obniżone wielkości udziału w przypadku zawiesin oraz roztworu R5. Obecność cząstek w połączeniu z obniżonym napięciem powierzchniowym decydując o wielkości kropeł może wpływać na taki przebieg depozycji.

Drugim miejscem niepożądanego depozycji jest obszar wymiany oddechowej (pęcherzykowy). Zdeponowany w tym miejscu aerozol może wpływać na płyn płucny (w tym: surfaktant płucny), którego poprawny skład i właściwości są kluczowe dla zapewnienia prawidłowej mechaniki oddychania oraz przebiegu procesów fizjologicznych w płucach (podrozdział 5.4). Wykres przedstawiony po prawej stronie Rys. 10.40. obrazuje wielkość depozycji w miejscu, w którym może dojść do niepożądanego interakcji leku z układem oddechowym. Największymi wartościami uławków depozycji w tym obszarze odznaczały się nebulizatory VMN-3 i JN-1. Oba te urządzenia generują aerozol o również stosunkowo niewielkim udziale uławków depozycji w górnych drogach oddechowych, na poziomie ok. 20% (Rys. 10.Z.9). Nie widać znaczących różnic pomiędzy emisją poszczególnych leków przy zastosowaniu tego samego nebulizatora. Z kolei, VMN-1 i VMN-2 cechuje znacznie obniżona w stosunku do pozostałych wielkość udziału depozycji w obszarze pęcherzyków płucnych i oskrzelików. Znow znaczące różnice pomiędzy uławkami depozycji leków uwidoczniły się przy emisji aerozolu wygenerowanego z VMN-1. Różnice te występują w przypadku leków o najniższym napięciu powierzchniowym. Zmiany zaobserwowano również w przypadku depozycji w górnych drogach oddechowych (bez jamy nosowej) w postaci znaczącego wzrostu (Rys. 10.Z.9.). Wszystkie testowane nebulizatory charakteryzują się stosunkowo dużą depozycją niepożądaną w stosunku do docelowego miejsca osadzania.



Rys. 10.40. Ułamek depozycji kropeł zawierających leki inhalacyjne w postaci roztworu R1-R5 oraz zawiesiny Z5-Z6 przy użyciu wybranych nebulizatorów w odniesieniu do poszczególnych odcinków układu oddechowego: tchawica-oskrzela (po lewej) i oskrzeliki-pęcherzyki płucne (po prawej).

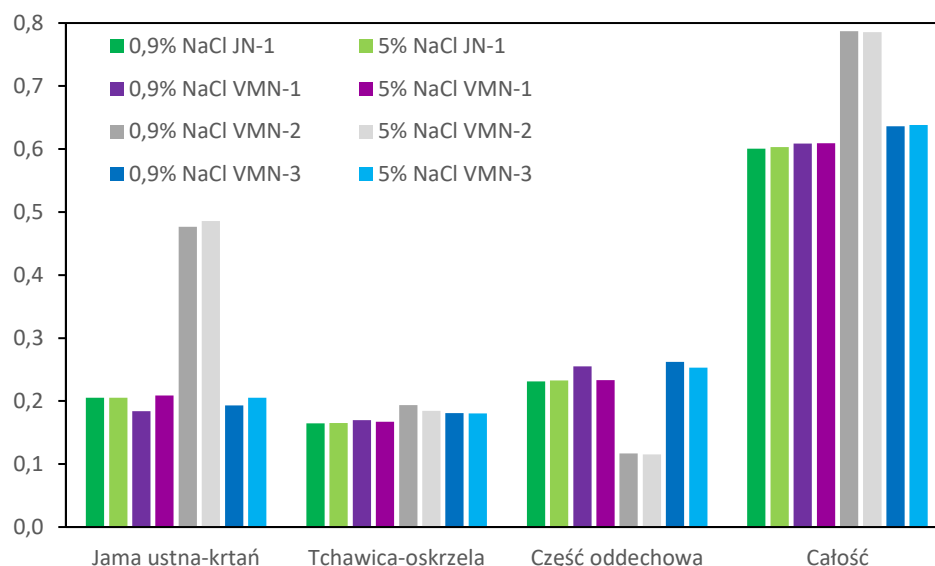


Rys. 10.41. Porównanie ułamków depozycji kropeł aerozolu leku oryginalnego i jego odtwórczych odpowiedników rozpraszanych w nebulizatorze JN-1 (po lewej) i VMN-2 (po prawej) w poszczególnych odcinkach układu oddechowego.

Na Rys. 10.41. dokonano porównania depozycji leku oryginalnego i jego odtwórczych odpowiedników atomizowanych w wybranych nebulizatorach: pneumatycznym i siateczkowym. Odnotowano rozbieżności pomiędzy depozycją aerozoli z urządzenia JN i VMN. To kolejny dowód potwierdzający zasadniczy wpływ konstrukcji urządzenia, w porównaniu z pozostałymi czynnikami, na jakość aerozolu. VMN-2 odznacza się większą depozycją w obszarze oskrzeli oraz w górnych drogach oddechowych niż JN-1 i przekłada się to na większą sumaryczną depozycję. Na te różnice ma wpływ przepływ powietrza, ale także jego dynamika, od której uzależnione są mechanizmy depozycji. Dodatkowo należy zauważyć,

że przedstawione ułamki sumarycznie nie wynoszą 100%, co oznacza częściową emisję aerozolu do otoczenia w powietrzu wydychanym.

Do modelu również zaimplementowano wyniki z pomiarów rozkładu wielkości kropeł chmury aerozolowej powstałej poprzez rozpraszanie roztworów zawierających chlorek sodu w różnych nebulizatorach. Roztwory soli fizjologicznej a nawet o większej zawartości NaCl (3% lub 5%) są stosowane w inhalacjach w celu nawilżenia lub obkurczenia obrzęku błon śluzowych w układzie oddechowym. Uzyskane wyniki obliczeń (Rys. 10.42.) pokazują, że obecność elektrolitu ma w niewielkim stopniu wpływ na wielkość depozycji. Wzrost przewodności elektrolitycznej sprzyja nieznacznemu wzrostowi całościowej depozycji, co wynika ze wzrostu udziału zdeponowanych kropeł w górnych drogach oddechowych przy nieznacznym spadku w części oddechowej. Zmiany te są nieznaczne, za wyjątkiem VMN-2.



Rys. 10.42. Porównanie ułamków depozycji kropeł aerozolu roztworów chlorku sodu rozpraszanych przy użyciu wybranych nebulizatorów w poszczególnych odcinkach układu oddechowego.

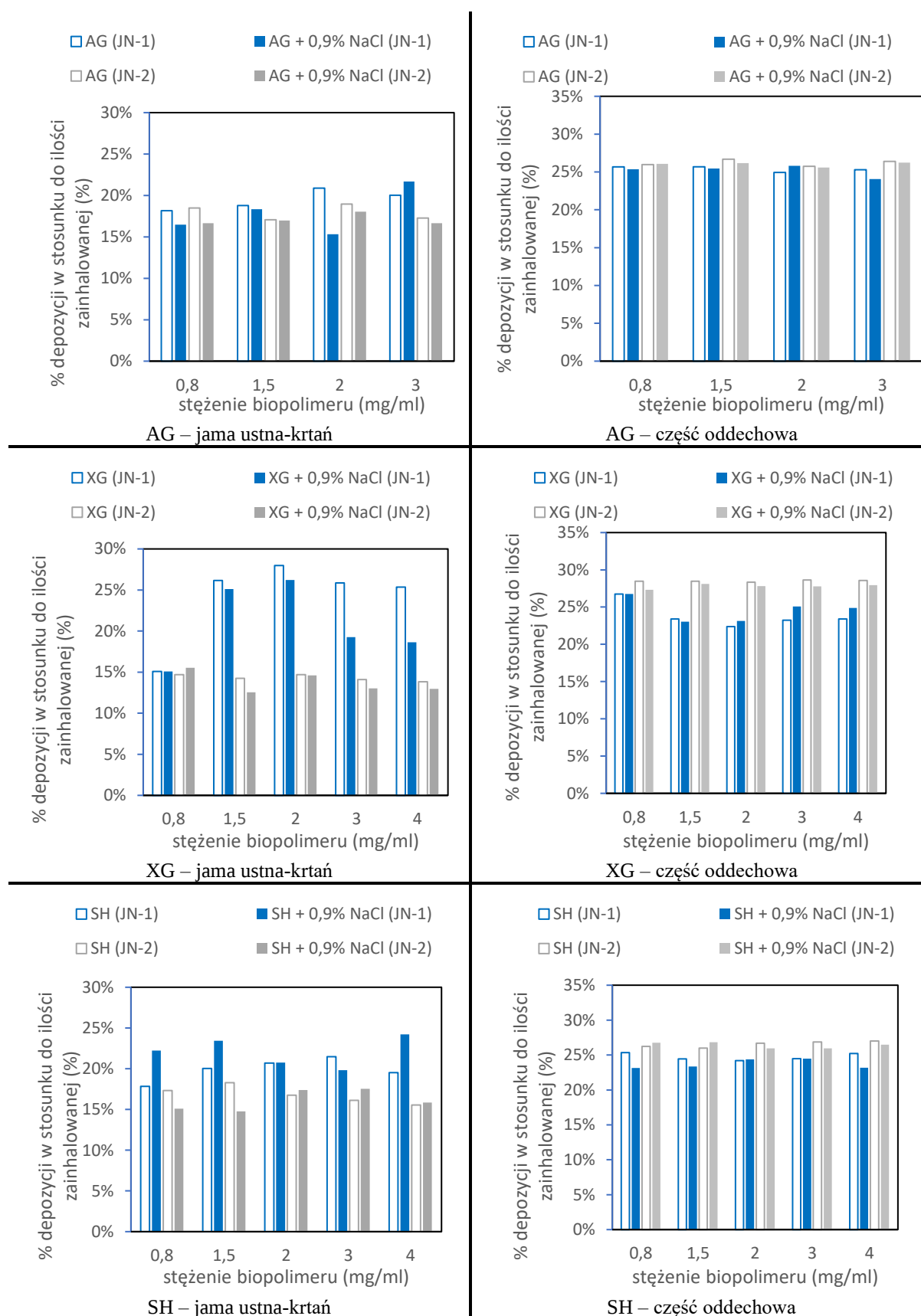
Na Rys. 10.Z.10. pokazano wpływ lepkości na rozkład depozycji kropeł w układzie oddechowym. Wzrost lepkości obniża depozycję w górnych drogach oddechowych i odcinku obejmującym oskrzela oraz wyraźnie zwiększa depozycję w obszarze wymiany gazowej. Odnosi to skutek w obniżeniu całkowitej depozycji kropeł. Wyniki te świadczą, że wzrost lepkości sprzyja ukierunkowaniu depozycji na najgłębsze partie płuc, co może zostać wykorzystane przy lekach inhalacyjnych o działaniu systemowym. Natomiast wpływ napięcia powierzchniowego na depozycję aerozolu w płucach jest znacznie mniejszy. Obecność Tween 80 i BAC w dwóch stężeniach nieznacznie zmieniają wartości ułamków depozycji w przypadku JN-1 i VMN-3 (Rys. 10.Z.11.), za to zmiany są widoczne w przypadku dwóch pozostałych nebulizatorów siateczkowych. W obecności BAC znacznie spada depozycja w górnych drogach

oddechowych i rośnie w obszarze wymiany gazowej. Z kolei, obecność Tweenu 80 prowadzi do przeciwnej zależności.

Otrzymane wyniki pokazały, że największy wpływ na przestrzenny układ depozycji, spośród badanych właściwości fizykochemicznych, ma lepkość. Wynika to wprost z jej wpływu na wielkość kropeł powstających w nebulizatorze. Na Rys. 10.43. pokazano przebieg depozycji aerozolu zawierającego krople powstałe przy rozpraszaniu roztworów modyfikatorów lepkości pochodzenia naturalnego: agaru, gumy ksantanowej i hialuronianu sodu w wodzie lub w soli fizjologicznej. Zmiany na skutek obecności biopolimerów zauważono jedynie w rejonach peryferyjnych, a ułamki depozycji w obszarze oskrzeli utrzymywały się na podobnym poziomie ok. 17,5% niezależnie od rodzaju biopolimeru oraz jego zawartości. Potwierdzono to, że konstrukcja urządzenia, decydując o wielkości kropeł, najsilniej wpływa na depresję, jednak właściwości fizykochemiczne mogą w pewnym stopniu wpływać na depozycję w najgłębszych obszarach płuc oraz w jamie ustnej. Wartości ułamków depozycji w odcinku jamy ustnej-krtani podczas inhalacji aerozolu powstałego z wodnych roztworów agaru fluktuują wokół średniej wartości ok. 19% i występuje to dla obu nebulizatorów pneumatycznych. Fluktuacje wartości udziałów procentowych depozycji odnotowano również w przypadku najgłębszego obszaru płuc. Wartości te utrzymywały się na poziomie ok. 25%, a więc wyższej niż dla roztworów chlorku sodu (Rys. 10.42) czy leków inhalacyjnych (Rys. 10.41). Obecność jonów chlorku sodu w roztworach biopolimerów nie wpływa w znacznym stopniu na opisane zależności. Podobne fluktuacje ułamków depozycji występują podczas inhalacji aerozolu wodnych roztworów hialuronianu sodu, i utrzymują się one w zakresie ok. 17,8-21,5% (JN-1) oraz ok. 15,5-18,2% (JN-2) w przypadku obszaru jama ustna-krtani oraz w zakresie ok. 24,4-25,4% (JN-1) oraz ok. 26,2-27 % (JN-2) w obszarze wymiany oddechowej. Z kolei, obecność kationów sodowych i anionów chlorkowych silnie oddziałuje na molekuly SH, co przenosi się również na depozycję w układzie oddechowym. Zauważono znaczący wzrost wartości ułamków depozycji w odcinku jama ustna-krtani oraz spadek tych wartości w części oddechowej w przypadku JN-1. Natomiast JN-2 cechował się mniej raptownymi zmianami, lecz odnotowano przeciwne tendencje, zwłaszcza przy mniejszej zawartości polimeru w próbce. Wraz ze wzrostem stężenia rozbieżności wartości się niwelowały. Największe rozbieżności między działaniem obu nebulizatorów pneumatycznych zauważono przy analizie emisji roztworów zawierających gumę ksantanową przy stężeniach 1,5-4mg/ml. Wzrost zawartości biopolimeru w przypadku emisji z użyciem JN-1 obniżył udział depozycji w rejonie pęcherzyków płucnych kosztem wzmożonego osadzania w jamie ustnej (wzrost wielkości kropeł). Z kolei, w przypadku JN-2 zauważono odwrotną tendencję. Mniejsza

depozycja w górnych partiach układu oddechowego jest korzystniejsza ze względu na mniejsze skutki uboczne. Roztwory XG również wykazują powinowactwo do jonów soli NaCl, co można zauważyć w zmianach w wielkości udziałów.

Otrzymane wyniki pozwoliły na oszacowanie stężenia leku w obszarze pęcherzyków płucnych przy założeniu idealnie równomiernej depozycji w płucach. Przy wyznaczaniu maksymalnej objętości cieczy zdeponowanej w obrębie pęcherzyków płucnych, na podstawie wyznaczonych teoretycznych wydajności depozycji aerozolu, przyjęto, że atomizacji poddano 2 ml cieczy. Oszacowane stężenie wyznaczono jako nominalny stosunek cieczy rozpylanej do surfaktantu płucnego (przyjęto objętość równą 30 ml). W tabeli 10.Z.4. zamieszczono uzyskane stężenia leków i modyfikatorów. Ze względu na niewielkie wahania otrzymanych wyników, do dalszych badań przyjęto wartość stężenia 0,018 ml dodatku tj. leku lub modyfikatora/ml surfaktantu.

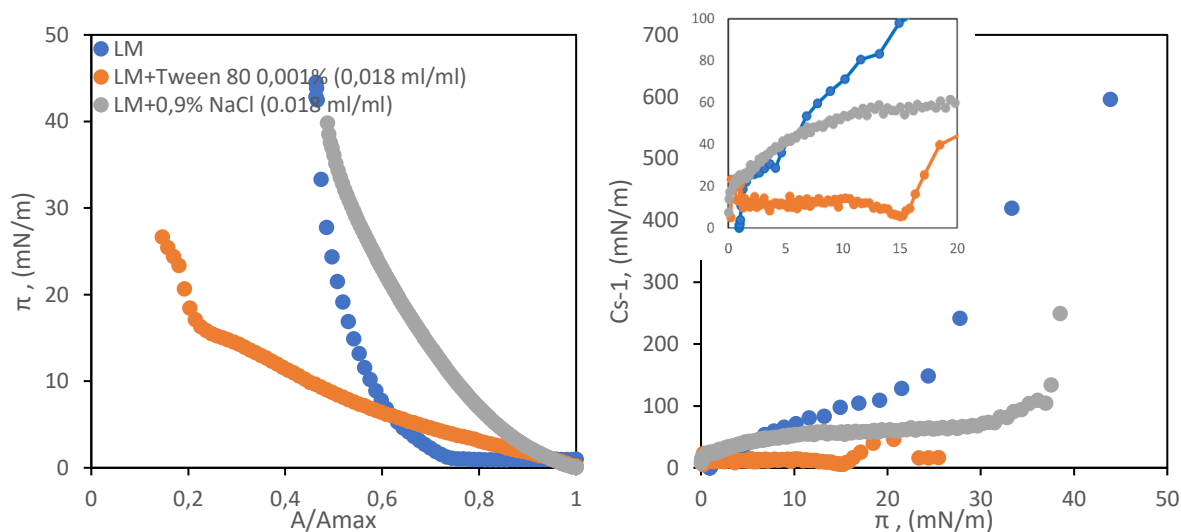


Rys.10.43. Ułamek depozycji aerozoli zawierających: AG, XG i SH wytwarzanych przy użyciu JN-1 i JN-2 w poszczególnych obszarach układu oddechowego: jama ustna-krtani (góra) i oskrzeliki-pęcherzyki płucne (dół).

10.3.2. Oddziaływania z modelem lipidowym surfaktantu płucnego (LM)

10.3.2.1. Charakterystyka modelu lipidowego LM oraz badanie oddziaływań z substancjami modyfikującymi przewodność elektrolityczną i napięcie powierzchniowe

Badania właściwości modelu lipidowego surfaktantu płucnego prowadzono podczas izotermicznej kompresji monowarstwy uformowanej na powierzchni woda-powietrze przez zaadsorbowane fosfolipidy i lipidy obojętne tworzące model LM w obecności substancji pomocniczych – 0,9% NaCl i 0,01% Tween 80 (stężenie 0,018 ml dodatku /ml). Otrzymano izotermie kompresji π -A (Rys. 10.44 – lewy wykres), które pozwoliły również na wyznaczenie współczynnika ściśliwości c_s^{-1} w funkcji π (Rys. 10.44 – prawy wykres). W Tab. 10.8 porównano wpływ badanych dodatków na LM oraz monowarstwę DPPC na podstawie charakterystycznych parametrów izotermie kompresji oraz zależności $c_s^{-1}(\pi)$. Oprócz wartości maksymalnego współczynnika ściśliwości, wymieniono również wartości powierzchni A/A_{max} oraz wartości c_s^{-1} przy $\pi=30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Zdecydowano się na taką referencyjną wartość ciśnienia powierzchniowego, gdyż w badanym przypadku (model LM) c_s^{-1} osiąga wartości nawet powyżej $250 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, po przejściu monowarstwy w stan zestalony (S – zob. podrozdział 5.4.5).



Rys. 10.44. Izotermie kompresji (po lewej) i zależność współczynnika ściśliwości powierzchni międzyfazowej woda-powietrze (po prawej) w obecności DPPC i cholesterolu (8:2) przy różnym składzie lipofazy ($T=37^\circ\text{C} \pm 0,3^\circ\text{C}$)

Zależność ciśnienia powierzchniowego od powierzchni względnej A/A_{max} (Rys. 10.44 – lewy wykres) pokazuje zmiany w organizacji monowarstwy w wyniku oddziaływań między molekułami fosfolipidu DPPC a cząsteczkami cholesterolu. Kompresja w oczywisty sposób zmniejsza dystans między cząsteczkami na powierzchni, co wpływa na konfigurację łańcuchów węglowodorowych fosfolipidu i wzmacnia interakcje z lipidem obojętnym. Zwraca uwagę również występowanie charakterystycznego obszar *plateau* odpowiadającego przejściu

fazowemu LE-LC przy $\pi=1-5$ mN/m. Jego przebieg jest jednak inny niż w przypadku izotermi samej DPPC (Rys. 10.Z.12). Ponadto, w zgodzie z doniesieniami literaturowymi(169,311–313) odnotowano, że obecność cholesterolu odpowiada za mniej gwałtowne przejścia między kolejnymi stanami organizacji monowarstwy. Molekuły cholesterolu rozłożone w monowarstwie lipidowej tworzą ciasniej upakowane domeny niż cząsteczki czystej DPPC. Prowadzi to do nagłego wzrostu ciśnienia powierzchniowego, co jest charakterystyczne dla sztywnych monowarstw. Analizując izotermę π -A układu: LM+0,9% NaCl (0,018 ml/ml) zauważono, że obecność jonów chlorkowych i sodowych również wpływa na stan monowarstwy. Może być to spowodowane zmianą ładunku powierzchniowego molekuł obecnych na powierzchni międzyfazowej. Szybszy wzrost ciśnienia powierzchniowego przy mniejszej zmianie powierzchni oraz zanik tzw. obszaru wypłaszczenia wynika z tworzenia przez kationy sodowe wiązania z grupami karbonyłowymi DPPC, oraz z tworzenia przez aniony chlorkowe tzw. chmury jonowej wokół grup cholinowych⁽¹⁴²⁾. Również obecność Tweenu 80 w hipofazie oddziałuje z cząsteczkami LM na powierzchni ciecz-gaz i tym samym wpływa na przebieg kompresji monowarstwy.

Jak wykazano w podrozdziale 5.4.5, zależność współczynnika ściśliwości od ciśnienia powierzchniowego ułatwia analizę zmian w organizacji cząsteczek monowarstwy na granicy faz powietrze/woda pod wpływem innych substancji. W niewielkim zakresie kompresji monowarstwy LM tj. dla π poniżej 1,2 mN/m oraz 1,2- 6,8 mN/m obserwujemy odpowiednio stan gazowy oraz stan cieczy rozprężonej. Z kolei, w szerokim zakresie π tj. od 6,8 do 28,0 mN/m utrzymuje się stan LC, zaś powyżej zaobserwowano stan stały. Takie zakresy występowania stanów organizacji monowarstwy są spowodowane obecnością cholesterolu w filmie zawierającym DPPC. Cząsteczki tego lipidu obojętnego sprzyjają przesunięciu (w porównaniu do monowarstwy samej DPPC) izoterm kompresji w kierunku niższych wartości ciśnienia powierzchniowego oraz niższego pola powierzchni. Wiąże się to z koniecznością zwiększenia wymaganego stopnia kompresji GLI do uzyskania podobnych π i tym samym obniżenia σ od wartości początkowej (σ_{wody})(zależność pomiędzy σ a π pokazuje równanie 5.6) (Tab. 10.8). Obecność NaCl znacząco wpływa na organizację monowarstwy poprzez zawężenie zakresu występowania stanu gazowego G monowarstwy, rozszerzenie zakresu występowania stanu cieczy skondensowanej LC oraz obniżenie wartości ciśnień powierzchniowych, w których odnotowane są przejścia fazowe G/LE i LE/LC. W obecności jonów sodowych i chlorkowych poniżej 0,05 mN/m obserwujemy stan G, 0,05-8,8 mN/m LE, a LC od 8,8 do 38 mN/m. Powierzchnia A_{30}/A_{max} uległa niewielkiemu zwiększeniu, a maksymalny c_s^{-1} zdecydowanie obniżył się, co również świadczy o interakcjach jonów z lipidami (Tab. 10.8).

Podobnie do zmian przewodności elektrolitycznej wywołanych obecnością NaCl, zmiany napięcia powierzchniowego wywołanego dodatkiem Tweenu 80 odgrywają dużą rolę. Tween 80 powoduje przesunięcie izotermy w kierunku mniejszych wartości ciśnienia powierzchniowego, przez co obserwuje się współlistnienie stanów LE/LC oraz stan gazowy w szerokich zakresach kompresji. Taki przebieg świadczy o intensywnej wymianie molekuł między powierzchnią a hipofazą (procesy adsorpcji/desorpcji). O oddziaływaniach Tween 80-cholesterol oraz Tween 80-DPPC świadczą również otrzymane dane powierzchni A_{30}/A_{max} , które uległy znaczącemu obniżeniu (Tab. 10.8).

Tab. 10.8. Charakterystyczne parametry izotermy kompresji oraz krzywej współczynnika ściśliwości powierzchni międzyfazowej woda-powietrze w obecności monowarstwy mieszanej DPPC/cholesterol (8:2) lub DPPC, z uwzględnieniem wpływu NaCl (0,9%) lub Tween 80 (0,01%)

Parametry	LM	DPPC	LM+Tween 80 0,001%	DPPC+Tween 80 0,001%	LM+0,9% NaCl
A_{30}/A_{max}	46,74±0,08	44,32±1,02	14,45±0,04	29,52±0,11	52,36±2,15
C_s^{-1} przy $\pi = 30$ (mN·m ⁻¹)	419,57±23,24	231,02±0,83	16,46±0,10	249,38±3,20	71,78±0,73
max C_s^{-1} (mN·m ⁻¹)*	595,80±31,06	1258,96±4,15	60,12±1,00	249,38±3,20	249,30±6,08

*w badanym zakresie ciśnienia powierzchniowego

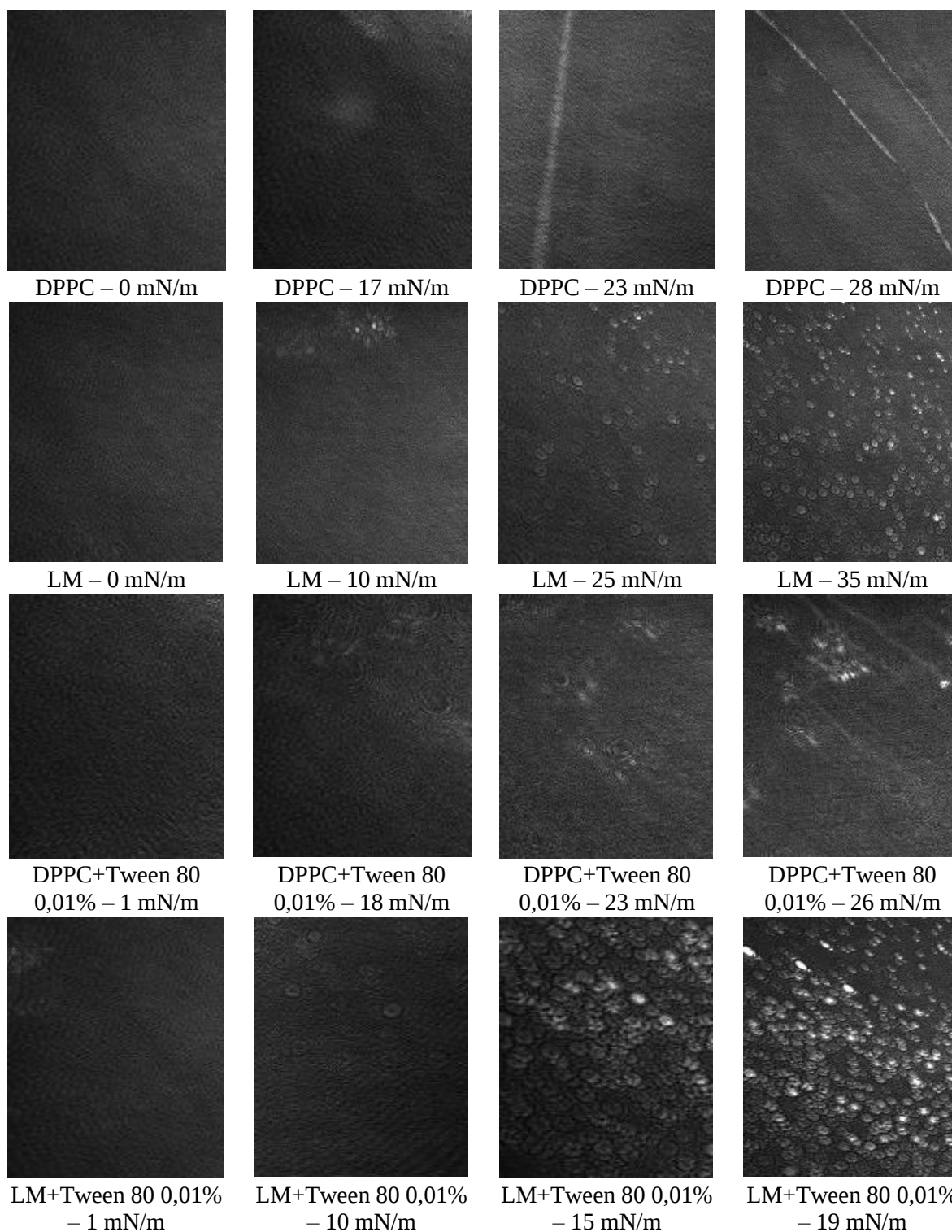
Dodatkowe informacje na temat zmian organizacji monowarstwy na skutek oddziaływania jej składników z dodatkami w postaci substancji pomocniczych są obserwacje w mikroskopie kąta Brewstera (BAM). Uzyskane obrazy BAM (Rys. 10.45) ilustrują zmiany organizacji domen powierzchniowych podczas jednostajnej kompresji GLI. Aby spróbować zrozumieć wpływ każdego składnika modelu LM, przedstawiono zdjęcia wykonane w przypadku czystego DPPC oraz DPPC-cholesterol (8:2). Przy $\pi \approx 0$ mN/m (stan gazowy), nie zaobserwowano żadnych różnic, co wynika z dużych odległości pomiędzy chaotycznie poruszającymi się molekułami na GLI. Pierwsze struktury cząsteczkowe na powierzchni obserwowane są przy ciśnieniu powierzchniowym 10 mN/m w przypadku LM oraz 17 mN/m w przypadku DPPC. Zaobserwowane domeny ilustrujące obszary cieczy rozprężonej mają podobne koliste kształty (jasne plamki na ciemnym tle) tj. obszary molekuł przyciągających się do siebie. Struktury te w układzie LM (DPPC-CHOL) pojawiają się przy niższym π niż w przypadku DPPC, co świadczy o roli cholesterolu w ich formowaniu. Przy wzroście π do 23 mN/m osiągnąwszy jeśli charakterystyczny dla monowarstwy DPPC stan przejściowy LE-LC (nieobecny, gdy monowarstwa zawiera CHOL), i w tym momencie pojawiają się typowe dla tej cząsteczki struktury w postaci jasnych, wąskich pasm, których liczba wraz z dalszą kompresją rośnie w miarę zbliżania się do $\pi=28$ mN/m (stan LC). Intensyfikacja jasnego koloru, wynikająca ze

zmniejszenia odległości pomiędzy cząsteczką a źródłem światła/detekтором, świadczy o pionowej orientacji molekuł fosfolipidu przy kondensacji monowarstwy. W obecności cholesterolu monowarstwa ulega usztywnieniu. Nie obserwuje się stanu przejściowego ani struktury pasów, gdyż oddziaływanie DPPC-CHOL jest na tyle silne, że molekuły DPPC nie przyjmują wówczas orientacji pionowej. Zauważalne jest za to tworzenie na powierzchni licznych pęcherzykowatych domen, które wraz z dalszą kompresją stają się liczniejsze i silniej bardziej skondensowane, o czym świadczy ich większa jasność na obrazach BAM.

Oddziaływania molekuł w układzie jednoskładnikowym a dwuskładnikowym analizowano także i w obecności Tweenu 80. W stanie gazowym (1 mN/m) nie odnotowano różnic, ze względu na zerowy wpływ obecności molekuł Tweenu 80 na rozmieszczone w dużej odległości lipidy. W stanie cieczy rozprężonej tj. przy ciśnieniu powierzchniowym ok. 18 mN/m (DPPC) oraz 10 mN/m (LM) zaczynają pojawiać się skondensowane struktury. Mają one w układzie mieszanym (DPPC-CHOL) charakterystyczny pęcherzykowy kształt. Wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego do 23 mN/m (stan przejściowy dla DPPC) oraz 15 mN/m (DPPC-CHOL) zaczynają powstawać liczne duże domeny. Wpływ Tweenu 80 na organizację molekuł w monowarstwie jednoskładnikowej (DPPC) potwierdza brak obecności charakterystycznych pasów a w to miejsce - formowanie domen o kulistym kształcie. Przy upakowanym filmie tj. $\pi=26$ mN/m i $\pi=19$ mN/m domeny powiększają się, stają się liczniejsze, a ich krawędzie stają się gładkie. Dodatkowo w tym stanie organizacji monowarstwy, w przypadku czystej DPPC z dodatkiem Tweenu 80 widoczne są charakterystyczne pasy (jasnoszare) tworzone przez agregujące molekuły lipidu. Obserwowane zmiany organizacji molekuł lipidu na GLI odzwierciedlają wyniki uzyskane z pomiarów izoterm π -A oraz wyznaczonych wartości współczynnika ściśliwości powierzchni.

Oddziaływania molekuł w układzie jednoskładnikowym a dwuskładnikowym analizowano także i w obecności Tweenu 80. W stanie gazowym (1 mN/m) nie odnotowano różnic, ze względu na zerowy wpływ obecności molekuł Tweenu 80 na rozmieszczone w dużej odległości lipidy. W stanie cieczy rozprężonej tj. przy ciśnieniu powierzchniowym ok. 18 mN/m (DPPC) oraz 10 mN/m (LM) zaczynają pojawiać się skondensowane struktury. Mają one w układzie mieszanym (DPPC-CHOL) charakterystyczny pęcherzykowy kształt. Wraz ze wzrostem ciśnienia powierzchniowego do 23 mN/m (stan przejściowy dla DPPC) oraz 15 mN/m (DPPC-CHOL) zaczynają powstawać liczne duże domeny. Wpływ Tweenu 80 na organizację molekuł w monowarstwie jednoskładnikowej (DPPC) potwierdza brak obecności charakterystycznych pasów a w to miejsce - formowanie domen o kulistym kształcie. Przy upakowanym filmie tj. $\pi=26$ mN/m i $\pi=19$ mN/m domeny powiększają się, stają się liczniejsze,

a ich krawędzie stają się gładkie. Dodatkowo w tym stanie organizacji monowarstwy, w przypadku czystej DPPC z dodatkiem Tweenu 80 widoczne są charakterystyczne pasy (jasnoszare) tworzone przez agregujące molekuły lipidu. Obserwowane zmiany organizacji molekuł lipidu na GLI odzwierciedlają wyniki uzyskane z pomiarów izoterm π -A oraz wyznaczonych wartości współczynnika ściśliwości powierzchni.



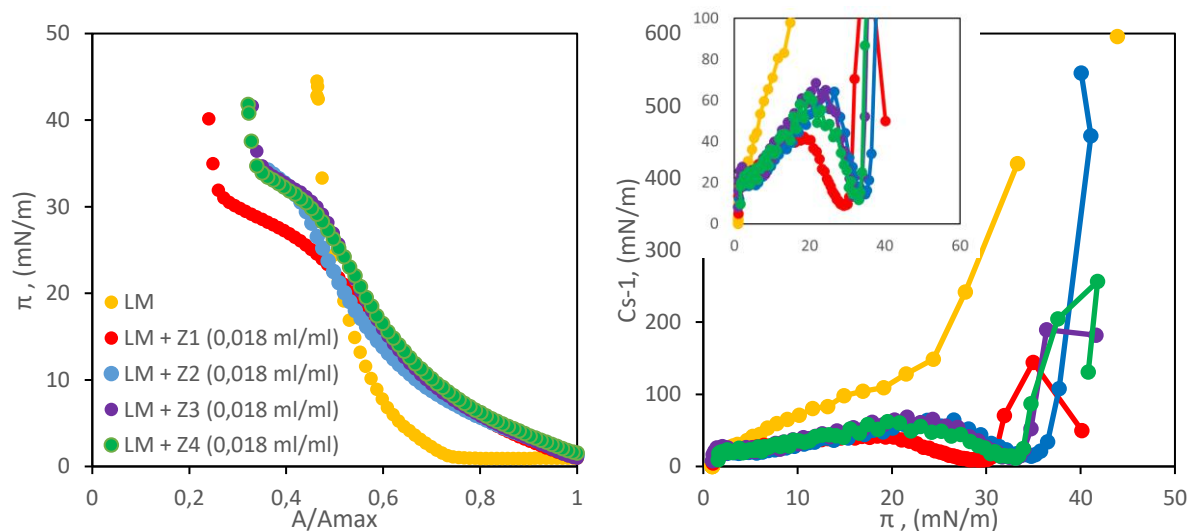
Rys. 10.45. Obrazy BAM monowarstw DPPC oraz DPPC-Cholesterol (8:2) – ozn. LM utworzonej na powierzchni wody lub wody z dodatkiem Tweenu 80 (0,01%)

10.3.2.2. Interakcje pomiędzy modelem surfaktantu płucnego LM a lekami inhalacyjnymi

Dalsze wyniki izotermicznej kompresji monowarstwy LM umożliwiły analizę zmian w jej zachowaniu się w wywołanych w wyniku obecności leków inhalacyjnych w stężeniu 0,018 ml/ml wyznaczonym z wyliczeń depozycji inhalowanych aerozoli leczniczych. Otrzymane izotermy π -A (Rys. 10.46 – lewy wykres) oraz krzywe współczynnika ściśliwości c_s^{-1} - π (Rys. 10.46 – prawy wykres) stanowiły podstawę rozważań, dotyczących wpływu wybranych zawiesin Z1-Z4 wspartymi przez dane liczbowe zamieszczone w Tab. 10.9. Zależność ciśnienia powierzchniowego od pola powierzchni GLI wyrażonego jako stosunek A/A_{max} (Rys. 10.46 – lewy wykres) ilustruje wyraźną zmianę w organizacji monowarstwy w wyniku oddziaływania między molekułami lipidów a składnikami obecnymi w leku inhalacyjnym. Wpływ zawiesin budezonidu (API w badanych produktach leczniczych Z1-Z4) na monowarstwę może mieć różne źródła. Po pierwsze, preparat zawiera nierozpuszczalne cząstki steroidu nawet o wielkości submikrometrowej, które mogą zostać wbudowane w hydrofobową część monowarstwy (oddziaływanie z łańcuchami węglowodorowymi molekuł DPPC). Po drugie, aktywne powierzchniowo substancje pomocnicze obecne w preparatach jako stabilizatory zawiesin lub konserwanty (np. Tween) adsorbują na granicy faz powietrze-woda. Stąd, zmniejszenie dystansu między pojedynczymi cząsteczkami, w wyniku kompresji intensyfikuje interakcje między DPPC, cholesterolem a cząstkami API i/lub molekułami substancji pomocniczych. Izotermy kompresji układu LM+leki inhalacyjne do wartości π równej 18 mN/m (osiągnięcie stanu LC) mają praktycznie identyczny przebieg. Jedynie izoterma LM+Z1 wykazuje duże odstępstwo od krzywych uzyskanych dla pozostałych farmaceutyków. Mamy tu do czynienia z dużą zmianą ściśliwości GLI przy niższych ciśnieniach powierzchniowych. Analiza wartości A_{30}/A_{max} (Tab. 10.9) pokazuje, że przy $\pi=30$ mN/m, gdy monowarstwa LM staje się sztywna, jedynie w przypadku leku Z1 dochodzi do znaczącego obniżenia powierzchni zajmowanej przez cząsteczki lipidów. Pozostałe leki jedynie nieznacznie zmniejszają ten parametr w porównaniu do LM. Te dane świadczą o różnicach między lekiem oryginalnym (Z1) a odtwórczymi (Z2-Z4), wynikających najprawdopodobniej z różnej zawartości substancji pomocniczych.

Obecność leków inhalacyjnych adsorbujących się na GLI niweluje występowanie charakterystycznego obszaru *plateau*, natomiast uwidaczniają się punkty przegięcia zauważalne przy stosunku A/A_{max} ok. 0,7, 0,45 0,25-0,3, których nie obserwuje się przy kompresji LM. Punkty przegięcia odpowiadają kolejnym przejściom fazowym w monowarstwie, co znajduje potwierdzenie w analizie zależności c_s^{-1} - π . Filmy LM w obecności

leków inhalacyjnych charakteryzują się wąskim obszarem stanu gazowego ($\pi < 1,5$ mN/m) i stosunkowo szerokim stanem LE (1,5 – ok. 18 mN/m). Po przekroczeniu ciśnienia powierzchniowego równego ok. 25 mN/m i osiągnięciu przez monowarstwę stanu cieczy skondensowanej, następuje wymiana molekuł z filmu powierzchniowego do hipofazy wynikająca z procesów desorpcji na skutek oddziaływania lek-LM. Współczynnik ściśliwości (Tab. 10.9) wynosi w przypadku Z1 poniżej 12,5 mN/m, co informuje o gazowym stanie monowarstwy, a w przypadku leków generycznych Z2-Z4 pomiędzy 17,5 a 32,1 mN/m, co świadczy o większym skondensowaniu monowarstwy (stan LE). Jest to tendencja podobna do tej obserwowanej w obecności Tweenu 80. Powyżej ciśnienia powierzchniowego 30 mN/m następuje dalszy wzrost upakowania monowarstwy (osiągnięcie stanu cieczy skondensowanej – Z1 i Z3 oraz stanu stałego monowarstwy – Z2 i Z4), po którym zachodzi proces desorpcji części molekuł z powierzchni, ale jedynie w przypadkach Z1, Z3 i Z4. W taki sposób leki z budezonidem zmniejszają elastyczność monowarstwy LM w fizjologicznie istotnym zakresie kompresji powierzchniowej (tj. przy $\pi > 30$ mN/m), umożliwiając tworzenie ciasno upakowanych monowarstw o wysokich wartościach ($c_s^{-1}_{\max}$). Wyniki te poszerzają nieliczne potwierdzają wcześniejsze doniesienia na temat interakcji budezonidu z PS(314,315).



Rys. 10.46. Izotermy kompresji (po lewej) i zależność współczynnika ściśliwości powierzchni międzyfazowej woda-powietrze (po prawej) w obecności DPPC i cholesterolu (8:2) oraz leków Z1-Z4 ($T = 37^\circ\text{C} \pm 0,3^\circ\text{C}$)

Porównując obrazy BAM dla próbki kontrolnej zawierającą monowarstwę DPPC-CHOL (8:2) z próbkami w obecności leków (Rys. 10.47) zaobserwowano znacznie zmniejszoną liczbę charakterystycznych struktur pęcherzykowych. Obserwacje te potwierdzają zmiany organizacji molekuł w monowarstwie pod wpływem zawiesin budezonidu. Prowadząc obserwacje mikroskopowe stwierdzono również, że poszczególne leki wywoływały różne zmiany w

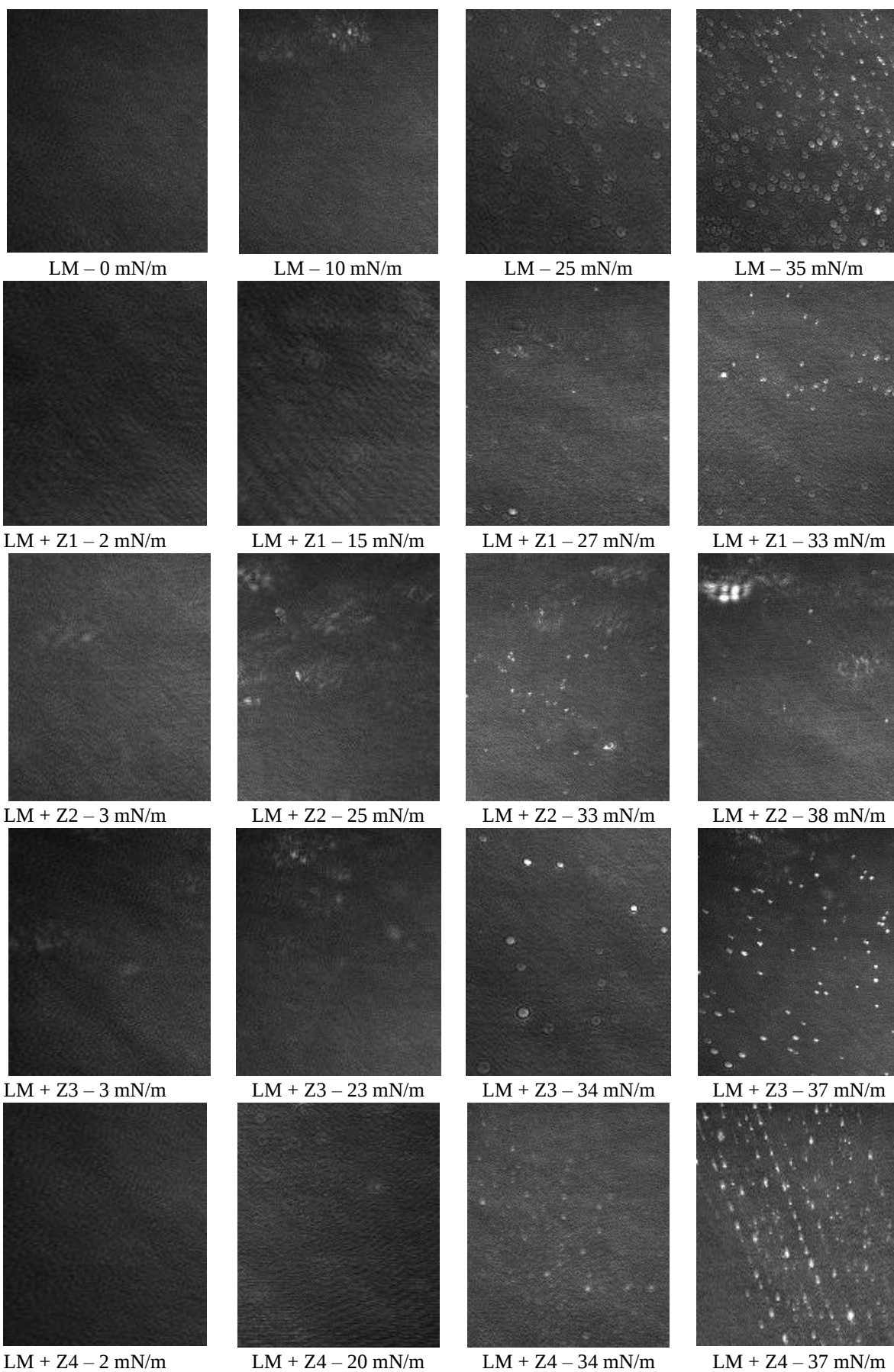
organizacji cząsteczek monowarstwy modelowego surfaktantu płucnego. Przykładowo już w stanie gazowym monowarstwy LM, tj. przy 3 mN/m, w przypadku Z2 i Z3 zaobserwowano tworzenie się nieregularnych domen (jasnoszare elementy) na Rys. 10.47, natomiast obecność pozostałych leków w zbliżonych warunkach nie powodowała takich zmian. Pod wpływem dalszej kompresji powierzchni międzyfazowej zaczynają być widoczne coraz liczniejsze zmiany w strukturze filmu – jaśniejsze punkty i/lub elementy koliste charakterystyczne dla zgrupowań cząsteczek DPPC+CHOL.

Tab. 10.9. Charakterystyczne parametry izotermy kompresji oraz krzywej współczynnika ściśliwości powierzchni międzyfazowej woda-powietrze w obecności monowarstwy mieszanej DPPC/cholesterol (8:2) z uwzględnieniem wpływu leków Z1-Z4

Parametry	LM	Z1	Z2	Z3	Z4
$A_{30}/A_{\max} (\text{\AA}^2)$	46,7±0,08	29,0±0,09	42,4±0,02	44,6±0,06	43,5±0,07
C_s^{-1} przy $\pi = 30$ (mN·m ⁻¹)	419,57±23,24	9,64±0,15	32,13±3,13	22,10±6,36	17,58±1,34
max C_s^{-1} (mN·m ⁻¹)*	595,80±31,06	144,36±18,45	545,32±28,82	189,54±18,87	256,37±13,68

*w badanym zakresie ciśnienia powierzchniowego

Podsumowując, analiza danych pokazała, że DPPC jest najczęściej używanym (najprostszym) modelem surfaktantu płucnego(142,144,156,316), to dodatek cholesterolu znacząco zmienia charakterystykę monowarstwy lipidowej, umożliwiając bardziej realistyczne odwzorowanie naturalnego układu(313). W badanych układach analizowano oddziaływania pomiędzy lipidami w monowarstwie oraz wpływ substancji pomocniczych obecnych w produktach do inhalacji oraz cząstek sterydu (budezonid) na te interakcje. Pomiary prowadzone w wadze Langmuir’a-Wilhelmy’ego wsparto mikroskopią Brewster’a, która stanowi cenną technikę do obrazowania organizacji molekuł na powierzchni międzyfazowej. Przeprowadzone badania podkreśliły znaczenie stosowania modeli wieloskładnikowych. Jednakże, metoda wagi Langmuir’a-Wilhelmy’ego, ze względu na swoje ograniczenia, pozwala ocenić, jedynie podstawowe interakcje leków z modelowym surfaktantem płucnym. Metoda oferuje znacznie wolniejszą kompresję powierzchni GLI, niż to ma miejsce w płucach, co ogranicza fizjologiczne znaczenie uzyskanych wyników. Dlatego poszerzenia wiedzy na temat oddziaływań lek-surfaktant płucny, zdecydowano się na zastosowanie wieloskładnikowego modelu surfaktantu płucnego opartego na preparacie stosowanym w leczeniu zespołu zaburzeń oddychania u wcześniaków.



Rys. 10.47. Obrazy BAM monowarstw LM utworzonej na powierzchni fazy ciekłej z dodatkiem leków Z1-Z4

10.3.3. Oddziaływania z wieloskładnikowym modelem lipidowo-proteinowym surfaktantu płucnego (MPS)

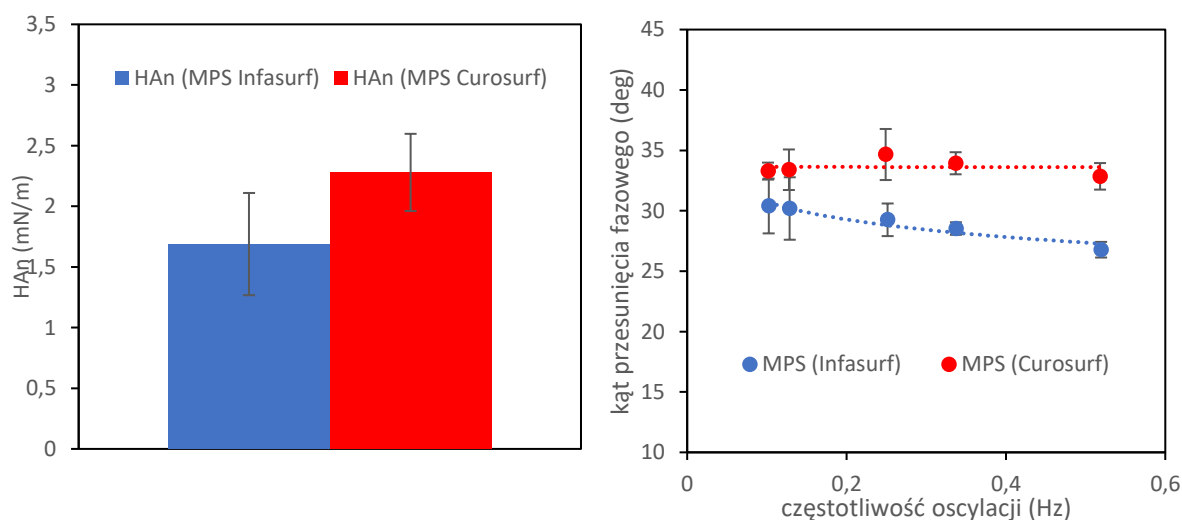
10.3.3.1. Charakterystyka modelu lipidowo-proteinowego oraz oddziaływań pomiędzy substancjami modyfikującymi napięcie powierzchniowe a modelem MPS

Badania z zastosowaniem wieloskładnikowego modelu MPS, bazujące na ocenie histerezy napięcia powierzchniowego, można opisać parametrami numerycznymi tj. σ_{min} , HAn i SI oraz kryteriami reologicznymi powierzchni m.in. ϕ , stanowiącymi wygodne narzędzia w porównawczej ocenie ilościowej. Wiedza o zmianach przebiegu krzywych kompresji i ekspansji w warunkach dynamicznych symulujących oddychanie może dostarczyć informacji mogących pomóc w przewidywaniu konsekwencji kontaktu surfaktantu płucnego z zainhalowaną substancją oraz ocenie poprawności przebiegu funkcji fizjologicznych w płucach. Pozwala to na oszacowanie faktycznego bezpieczeństwa inhalacji dla organizmu. W związku z różnorodnością czynników mogących wpływać na dynamiczne właściwości powierzchniowe, porównawcza ocena ilościowa jest bardzo cenna, nawet jeżeli określenie mechanizmów fizykochemicznych odpowiadających za obserwowane zmiany będzie trudne lub niemożliwe do zidentyfikowania. W badaniach zastosowano w roli MPS dwa preparaty zawierające surfaktant płucny stosowane w leczeniu zespołu zaburzeń oddychania u wcześniaków: Curosurf[®] (preparat otrzymywany z świńskich płuc) oraz Infasurf[®] (preparat otrzymywany z płuc cielęcych). Wynikało to z trudności z dostępnością preparatów (m.in. w okresie pandemii COVID-19) podczas trwania części badawczej niniejszej rozprawy doktorskiej. Stąd wymagane było także porównanie obu ww. modeli lipidowo-proteinowych surfaktantu płucnego (MPS). Każdy z nich jest zawiesiną jednak o różnej zawartości fosfolipidów – w Curosurfie[®] wynosi ono 80 mg/ml a w Infasurfie[®] 35 mg/ml. Frakcja lipidowa w obu preparatach zawiera m.in. fosfolipidy i cząsteczki obojętne takie jak cholesterol, a także specyficzne białka surfaktantu płucnego (apoproteiny). W badaniach każdy z preparatów rozcieńczano do stężenia 2,5 mg fosfolipidów/ ml.

Tab. 10.9. Porównanie parametrów σ_{min} oraz SI charakteryzujących MPS Curosurf[®] i MPS Infasurf[®].

MPS - Curosurf					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$31,84 \pm 1,29$	$32,06 \pm 1,07$	$30,92 \pm 1,28$	$30,77 \pm 0,82$	$30,09 \pm 0,53$
SI (-)	$0,15 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$
MPS - Infasurf					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$29,62 \pm 0,45$	$29,35 \pm 1,14$	$28,67 \pm 0,21$	$28,42 \pm 1,72$	$27,92 \pm 1,42$
SI (-)	$0,18 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$

Charakterystyka dynamiczna powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz została wyznaczona podczas cyklicznej deformacji prowadzonej wokół *quasi*-równowagowej wartości napięcia powierzchniowego. W przypadku MPS Curosurf[®] wynosiła ona 32,68 mN/m, a MPS Infasurf[®] 32,07 mN/m. Podobieństwo obu modeli MPS potwierdza między innymi wartość indeksu stabilności (SI) (Tab. 10.9), która stopniowo rośnie z częstotliwością deformacji powierzchni, ale nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy wartościami uzyskiwanymi dla obu modeli. Wskazuje to na ich zamiennność. Wyniki uzyskane dla obu modeli cechuje wysoka powtarzalność. Obok SI, porównywalne wyniki otrzymywano przy pomiarze σ_{min} (Tab. 10.9), które w obu modelach nieznacznie malało wraz ze wzrostem częstotliwości oscylacji. Spadek minimalnego napięcia tłumaczy tendencję wzrostową indeksu stabilności (na podstawie równania 5.11). Innym parametrem pokazującym zbliżone właściwości powierzchniowe obu modeli MPS jest znormalizowane pole histerezy. Na przykładzie pomiaru przy $f=100\text{mHz}$ przedstawiono ich wartości (Rys. 10.46-po lewej). Nieco wyższa wartość dla Curosurfu[®] wiąże się z większą wartością kąta przesunięcia fazowego (Rys. 10.46-po prawej). Wartości φ w przypadku MPS Curosurf[®] wahały się wokół wartości średniej ok. $33,5^\circ$ przy zmianach częstotliwości oscylacji. Natomiast w przypadku MPS Infasurf[®] obserwujemy spadek wartości φ wraz ze wzrostem szybkości deformacji powierzchni od $30,4^\circ$ do $26,8^\circ$. Świadczy to o spadku cech lepkich powierzchni przy jednoczesnym wzroście elastyczności przy wyższych szybkościach odkształcania powierzchni.



Rys. 10.46. Porównanie parametru HAn (po lewej) oraz φ (po prawej) przy oscylacjach powierzchni z częstotliwością 100 mHz charakteryzujących MPS Curosurf[®] i MPS Infasurf[®]

Dalsze badania skoncentrowano na ocenie analizy wpływu na MPS Infasurf[®] substancji pomocniczych o właściwościach powierzchniowo czynnych, tj. chlorku benzalkoniowego oraz Polisorbatu 80, powszechnie stosowanych w lekach inhalacyjnych (Rys. 10.47 oraz Tab.

10.10). Na wykresie nie zamieszczono wyników 0,1% Tween 80, ze względu na zbyt niskie napięcie powierzchniowe, osiągnięte w tych warunkach, nie pozwalające na uzyskanie powtarzalnych danych pomiarowych.

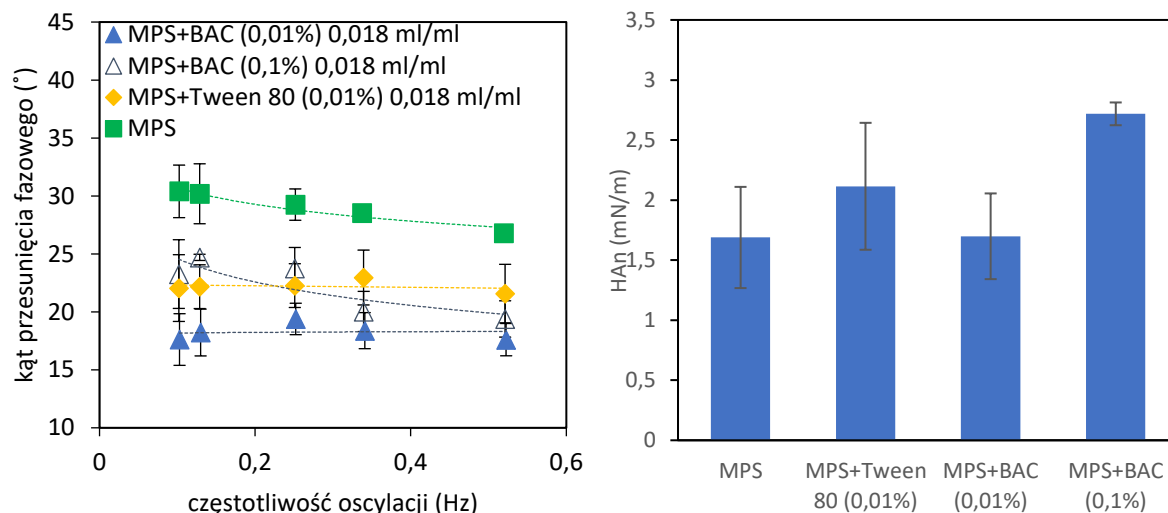
Tab. 10.10. Porównanie parametrów σ_{min} i SI charakteryzujących MPS Infasurf® oraz syntetyczne surfaktanty

MPS - Infasurf					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$29,62 \pm 0,45$	$29,35 \pm 1,14$	$28,67 \pm 0,21$	$28,42 \pm 1,72$	$27,92 \pm 1,42$
SI (-)	$0,18 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$
MPS + Tween 80 0,01%					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$28,53 \pm 0,20$	$27,24 \pm 0,42$	$26,92 \pm 0,70$	$26,18 \pm 0,91$	$26,14 \pm 0,79$
SI (-)	$0,33 \pm 0,00$	$0,31 \pm 0,00$	$0,36 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,02$
MPS + BAC 0,01%					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$27,76 \pm 0,09$	$27,25 \pm 0,68$	$26,76 \pm 1,16$	$27,49 \pm 0,15$	$26,89 \pm 0,66$
SI (-)	$0,27 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$
MPS + BAC 0,1%					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$27,09 \pm 0,53$	$26,72 \pm 0,48$	$26,11 \pm 0,69$	$26,36 \pm 0,71$	$25,26 \pm 0,64$
SI (-)	$0,26 \pm 0,06$	$0,26 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,01$

Otrzymane dane pokazują, że ww. dodatki istotnie zmieniają właściwości modelowego surfaktantu płucnego. Przebieg zmian jest różny w zależności od użytego dodatku, co sugeruje, że budowa i rodzaj molekuł surfaktantu m.in. wielkość łańcucha czy ładunek powierzchniowy, odgrywają rolę w interakcjach z cząsteczkami MPS obecnymi na GLI. Quasi-równowagowa wartość napięcia powierzchniowego, wokół której prowadzone są pomiary oscylacyjne zwiększyła się z 32,1 mN/m (MPS Infasurf®) do 33,3 (Tween 80 0,01%) oraz zmniejszyła do 31,5 mN/m czy 30,1 mN/m (odpowiednio BAC 0,01% i BAC 0,1%). W obecności surfaktantów syntetycznych dochodzi do znaczącego wzrostu indeksu stabilności (Tab. 10.10) i tendencja wzrostowa zależności $SI-f$ zostaje utrzymana. Zwiększenie indeksu jest powiązane z obniżeniem σ_{min} (zachowana jest tendencja spadkowa wraz ze wzrostem częstotliwości oscylacji), oraz ze wzrostem σ_{max} (nie pokazana w Tab. 10.10 - rośnie wraz ze wzrostem częstotliwości oscylacji). Różnice wynikające z zawartości BAC nie rzutują na wielkość SI ani wartości krańcowych napięcia powierzchniowego σ_{min} i σ_{max} .

Z kolei kąt przesunięcia fazowego uległ najbardziej widocznym zmianom w obecności syntetycznych surfaktantów (Rys. 10.47 – po lewej). Wartości φ w przypadku MPS + Tween 80 wahały się wokół średniej ok. 22,5°, a MPS + BAC wokół ok. 18°, a więc spadły w porównaniu do samego MPS. Brak spadku φ wraz ze wzrostem szybkości deformacji świadczy o zachowaniu stałej proporcji pomiędzy iloczynem częstości oscylacji (ω) i lepkości

powierzchni a jej elastycznością (równanie 5.21.). Konsekwencje w modyfikacji kształtu histerezy, odnotowano również analizując wielkości znormalizowanego pola histerezy (Rys. 10.47 – po prawej). Na przykładzie $f=100\text{mHz}$ zauważono, że obecność dodatkowych surfaktantów sprzyja wzrostowi wartości HAn , proporcjonalnie do stężenia.



Rys. 10.47. Porównanie parametru HAn (po prawej) oraz ϕ (po lewej) przy oscylacjach powierzchni z częstotliwością 100 mHz dla MPS w obecności BAC i Tween 80.

Biorąc pod uwagę wszystkie wyniki przedstawione w tej części, można stwierdzić, że stosowane w lekach syntetyczne surfaktanty, takie jak BAC czy Tween 80 w stężeniach oczekiwanych po depozycji aerozolu leczniczego w układzie oddechowym oddziałują na surfaktant płucny, lecz nie zaburzają jego dynamicznych właściwości powierzchniowo czynnych w takim stopniu, który wskazywałby na możliwe pogorszenie jego funkcji.

10.3.3.2. Interakcje pomiędzy modelem surfaktantu płucnego MPS a lekami inhalacyjnymi

W tej części badań stosując MPS Curosurf® prześledzono zmiany SI (Tab. 10.11), HAn (Rys. 10.48 po prawej) oraz ϕ (Rys. 10.48 po lewej), jakie zachodzą w układzie pod wpływem leków zawieszinowych budezonidu. Quasi-równowagowa wartość napięcia powierzchniowego zwiększyła się z 32,7 mN/m (MPS Curosurf®) do 35,6 w przypadku Z2 oraz zmniejszyła do 27,7 mN/m w przypadku Z4. W przypadku pozostałych leków budezonidowych nie uległa tak znaczącej zmianie $\sigma_{eq}=32,8$ (Z1) i 31,9 mN/m (Z3). Parametr SI wzrasta przy szybszych deformacjach powierzchni, co jest spowodowane rozszerzaniem się różnic pomiędzy granicznymi wartościami napięcia powierzchniowego rejestrowanymi podczas oscylacji. W przypadku dodatku Z2 i Z3 zaobserwowano spadek σ_{min} i niewielki wzrost σ_{max} a w przypadku Z1 i Z4 - wzrost σ_{max} . Przykładowo przy 100 mHz, dodatek Z3 spowodował spadek wartości σ_{min} z 31,8 mN/m (MPS Curosurf®) do 29,7 mN/m, a nawet do 23,3 mN/m (Z4) i 23,2 mN/m

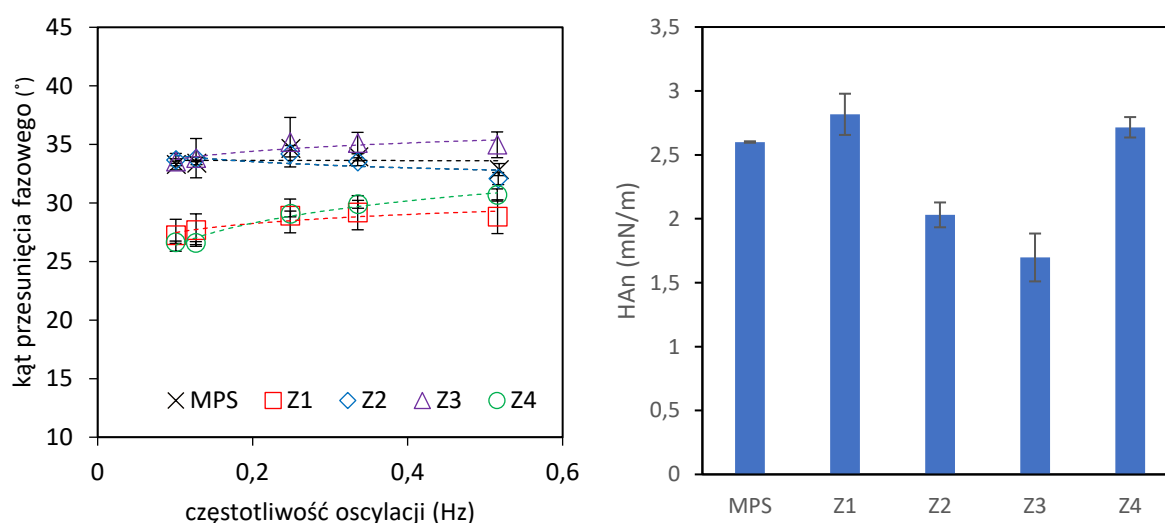
(Z1). Wyjątek stanowi lek Z2, którego obecność nieznacznie podwyższyła wartość σ_{min} do 34,1 mN/m. Różnice wynikają z różnego składu formulacji leków (pod względem substancji pomocniczych) pomiędzy lekiem oryginalnym a jego kilkoma odpowiednikami generycznymi. Wzrost parametru SI ze wzrostem f został utrzymany w obecności leków Z1-Z4, świadczy o wzmocnieniu aktywności powierzchniowej MPS, ale również o zmianie kształtu histerezy. Najmniejszy wzrost zanotowano w obecności leku Z4 (od 0,28 do 0,33), a największy przy badaniu Z1 (od 0,29 do 0,39). Na poziom SI wpływał rodzaj leku, przykładowo, przy deformacjach powierzchni z $f=500$ mHz dla MPS $SI=0,25$, a w obecności Z1 $SI=0,39$ czy Z4 $SI=0,33$. Dla dwóch pozostałych leków $SI=0,22$ (Z2) i $SI=0,19$ (Z3), potwierdzając zawężenie zakresu zmian σ histerezy. Przeprowadzone badania jasno wskazują, że leki Z1, Z3 i Z4 mają silniejszy wpływ na powierzchnię międzyfazową zawierającą surfaktant płucny niż Z2. Jednocześnie zauważono, że większe zmiany zachodzą przy szybszych oscylacjach powierzchni, które intensyfikują proces wymiany masy w pobliżu GLI.

Tab. 10.11. Porównanie parametrów σ_{min} i SI charakteryzujących MPS Curosurf® oraz dodatek leków Z1-Z4.

MPS – Curosurf					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$31,84 \pm 1,29$	$32,06 \pm 1,07$	$30,92 \pm 1,28$	$30,77 \pm 0,82$	$30,09 \pm 0,53$
SI (-)	$0,15 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$
MPS + Z1					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$23,18 \pm 0,21$	$23,64 \pm 0,32$	$23,39 \pm 0,09$	$23,82 \pm 0,12$	$23,03 \pm 0,17$
SI (-)	$0,29 \pm 0,00$	$0,30 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,00$	$0,39 \pm 0,02$
MPS + Z2					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$34,14 \pm 0,04$	$33,85 \pm 0,19$	$33,10 \pm 0,22$	$33,04 \pm 0,04$	$32,82 \pm 0,37$
SI (-)	$0,14 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,00$	$0,18 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01$
MPS + Z3					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$29,68 \pm 0,10$	$29,34 \pm 0,09$	$28,65 \pm 0,13$	$28,85 \pm 0,13$	$28,41 \pm 0,13$
SI (-)	$0,11 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,00$	$0,15 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,00$	$0,19 \pm 0,00$
MPS + Z4					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$23,30 \pm 0,21$	$23,43 \pm 0,61$	$23,56 \pm 0,72$	$23,92 \pm 0,12$	$24,08 \pm 0,32$
SI (-)	$0,28 \pm 0,00$	$0,28 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,01$

Analizując dalej zmianę kształtu histerezy w wyniku obecności zawiesin budezonidu przedyskutowano wartości kąta przesunięcia fazowego. Obecność leków Z1, Z3 i Z4 sprzyjała wzrostowi tego parametru wraz z przyspieszaniem oscylacji. Jednakże wartości otrzymane w przypadku Z3 były tylko niewiele większe w porównaniu do czystego modelu. Największą różnicę zauważono przy 500 mHz, gdy wynosiła ona $32,9^\circ$ dla MPS Curosurf® oraz $35,0^\circ$ dla

układu MPS+Z3. Natomiast dodatek Z1 i Z4 spowodował znaczące obniżenie ϕ , co wiązało się ze zwężeniem histerezy σ . Z kolei, obecność Z2 miała znów najmniejszy wpływ na MPS spośród wszystkich leków. Została utrzymana wartość ϕ jak i stałość tego parametru w funkcji częstotliwości deformacji. Stąd (analiza zgodna z Rys. 5.9.) parametrem, który można powiązać z kształtem histerezy był SI , co w konsekwencji wiązało się z polem histerezy i wartościami HAn (Rys. 10.48, po prawej). Otrzymane wyniki w przypadku leków Z1 i Z4 cechowały się dużym podobieństwem. Ogólny spadek wartości ϕ i wzrost SI towarzyszył niewielkiemu wzrostowi HAn , na skutek zwiększenia zakresu $\sigma_{max} - \sigma_{min}$. Obecność Z3, z kolei spowodowała porównywalny do Z2 spadek wartości HAn , choć te wyniki te są obarczone niepewnością.



Rys. 10.48. Porównanie parametrów HAn (po prawej) przy 100 mHz oraz ϕ (po lewej) charakteryzujących MPS w obecności leków Z1-Z4

Badanie interakcji lek inhalacyjny-modelowy surfaktant płucny kontynuowano z użyciem MPS Infasurf[®] oraz leków w postaci roztworów R1, R2, R4 i R5 oraz zawiesin Z5 i Z6. Przeprowadzono badania podczas oscylacji GLI i dokonano analizy wyników na podstawie zmian SI (Tab. 10.12), HAn (Rys. 10.49, po prawej) oraz ϕ (Rys. 10.49 po lewej). Quasi-równowagowa wartość napięcia powierzchniowego zmniejszyła się w porównaniu do wartości otrzymywanej w przypadku czystego MPS, co pokazano w Załączniku – Tab. 10.Z.5. Obniżenie jest znaczące od $\Delta\sigma=4,5$ mN/m (R2) do nawet 7,6 mN/m (R4), co świadczy o oddziaływaniu leku na warstwę surfaktantu. Spadek wartości quasi-równowagowej rzutuje również na zmiany innych parametrów charakteryzujących pętlę histerezy. Analizując dane zamieszczone w Tab. 10.12 zauważono, że wartość minimalnego napięcia powierzchniowego obniżyła się o ok. 4-5 mN/m pod wpływem badanych leków inhalacyjnych. Trend spadku wartości minimalnej wraz ze wzrostem szybkości deformacji powierzchni został zaobserwowany. Zmianom tym towarzyszą oczekiwane zmiany indeksu stabilności. W

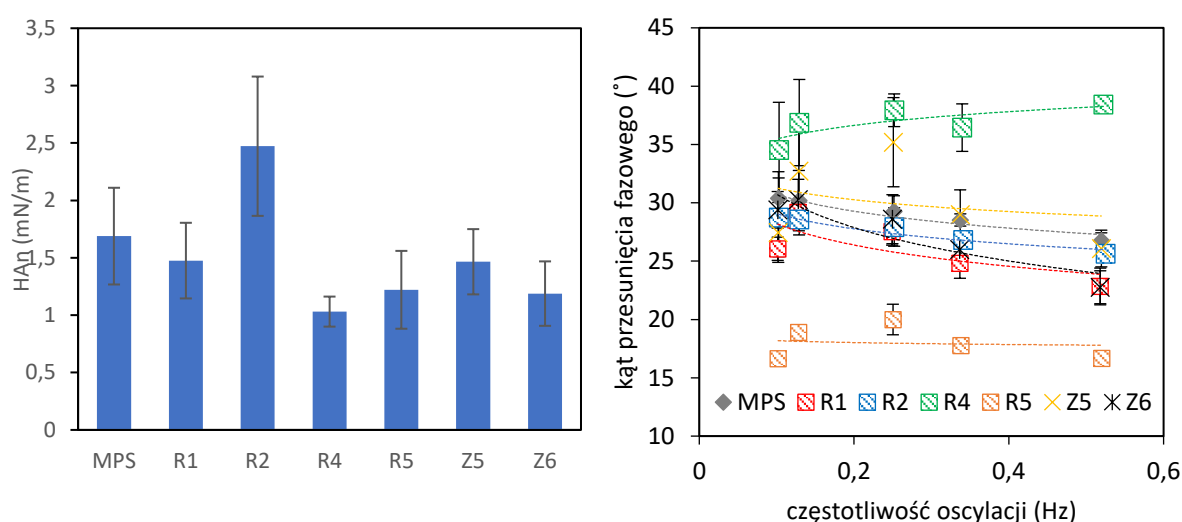
przypadku leku R4 doszło do znaczącego obniżenia wartości SI , co można interpretować jako potencjalnie zagrażające aktywności surfaktantu płucnego w warunkach fizjologicznych. Z kolei, lek R2 zwiększa wartości SI zwłaszcza przy wyższych częstotliwościach oscylacji, co można uznać za efekt przynoszący pozytywny skutek fizjologiczny. Dla pozostałych leków wartość indeksu nieznacznie wzrosła lub pozostała niezmienną, przy zachowaniu podobnego charakteru zależności SI - f . Na przykładzie leków Z5 i Z6 ponownie stwierdzono rozbieżność pomiędzy lekiem generycznym (Z6) i oryginalnym (Z5). W przypadku tych leków nie zaobserwowano tak znaczących różnic, jakie odnotowano przy zawiesinach budezonidu (Z1-Z4).

Tab. 10.12. Porównanie parametrów σ_{min} i SI charakteryzujących MPS Infasurf® w obecności leków Z5-Z6 (zawiesiny) oraz R1, R2, R4 i R5 (roztwory)

MPS - Infasurf					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$29,62 \pm 0,45$	$29,35 \pm 1,14$	$28,67 \pm 0,21$	$28,42 \pm 1,72$	$27,92 \pm 1,42$
SI (-)	$0,18 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$
MPS + Z5					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$23,59 \pm 0,25$	$23,12 \pm 0,34$	$22,58 \pm 0,52$	$22,66 \pm 0,18$	$22,59 \pm 0,40$
SI (-)	$0,14 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,05$
MPS + Z6					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$24,24 \pm 0,16$	$24,00 \pm 0,11$	$23,85 \pm 0,14$	$23,95 \pm 0,07$	$23,64 \pm 0,10$
SI (-)	$0,19 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,00$	$0,18 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,03$
MPS + R1					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$24,20 \pm 0,43$	$23,64 \pm 0,71$	$23,32 \pm 0,49$	$23,69 \pm 0,52$	$22,91 \pm 0,58$
SI (-)	$0,21 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,03$
MPS + R2					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$24,81 \pm 1,41$	$24,77 \pm 1,04$	$24,01 \pm 1,01$	$23,98 \pm 1,42$	$23,50 \pm 1,64$
SI (-)	$0,23 \pm 0,07$	$0,24 \pm 0,10$	$0,32 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,00$
MPS + R4					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$23,92 \pm 0,14$	$23,82 \pm 0,16$	$23,55 \pm 0,36$	$23,47 \pm 0,28$	$23,33 \pm 0,32$
SI (-)	$0,06 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,04$
MPS + R5					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$24,26 \pm 0,14$	$24,12 \pm 0,08$	$23,89 \pm 0,03$	$23,98 \pm 0,03$	$23,79 \pm 0,16$
SI (-)	$0,19 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,03$

Kolejnym parametrem pokazującym wpływ leków inhalacyjnych na powierzchnię płucną był kąt przesunięcia fazowego. Największe zmiany w stosunku do czystego MPS odnotowano w przypadku roztworów leczniczych R5 (spadek), R4 (wzrost) oraz zawiesiny Z5 (wzrost). W

pozostałych przypadkach otrzymane wartości ϕ uległy niewielkiemu obniżeniu, przy zachowaniu tendencji spadku ϕ wraz ze wzrostem częstotliwości oscylacji. Potwierdza to, że leki nie wpłynęły na kształt histerezy, a biorąc pod uwagę zmiany indeksu stabilności, ma miejsce również zmniejszenie zakresu zmian π (analiza wg Rys. 5.9.). Obserwuje się zmniejszenie pola histerezy, co pokazano na wykresie 10.49 (po prawej). Wyjątkiem jest lek R2 dla którego pomimo spadku ϕ , odnotowano znaczący wzrost SI i HAn przy 100 mHz. W obecności tego leku praktycznie zanika charakterystyczna zależność $\phi(f)$. Analiza dodatku leków R4 i Z5 pokazuje wzrost wartości kąta przesunięcia fazowego. Kształt histerezy w takim przypadku zmienia się – histereza poszerza się. Jednocześnie zauważono zmianę tendencji $\phi(f)$ w przypadku R4, tj. ϕ rośnie ze wzrostem częstotliwości.



Rys. 10.49. Porównanie parametrów HAn (po lewej) przy 100 mHz oraz ϕ (po prawej) charakteryzujących MPS w obecności leków Z5-Z6 (zawiesiny) oraz R1, R2, R4 i R5 (roztwory)

Zauważono, że większość leków (z wyjątkiem Z1, Z4 i R2) oddziałując z modelowym surfaktantem płucnym przyczyniła się do znaczącej zmiany kształtu histerezy napięcia powierzchniowego, zmniejszając jej pole (HAn). Świadczy to o zmniejszeniu energii powierzchniowej zużywanej m.in. na procesy wymiany masy i hydrodynamicznego procesu oczyszczania pęcherzyka płucnego. Takie zmiany mogą, więc, zaburzać poprawne, fizjologiczne funkcje surfaktantu płucnego. Interakcje pozostałych leków z MPS skutkowały wzrostem pętli histerezy, co wyrażało się wzrostem HAn . Można oceniać to jako wzmocnienie funkcji surfaktantu. Obserwowane efekty w układzie MPS zależą od rodzaju leku nawet przy takim samym stężeniu substancji aktywnej, co wynika z różnej zawartości i stężenia substancji pomocniczych w produkcie leczniczym. Wyniki badań mogą więc stanowić przyczynek do dyskusji na temat różnic między lekami generycznymi a oryginalnymi, co sygnalizowano w pracach opublikowanych w związku z realizacją doktoratu^(249,314).

Przedstawione wyniki stanowią przykład porównania możliwości zastosowania dwóch koncepcji badania dynamiki surfaktantu płucnego do oceny oddziaływań lek-surfaktant płucny. Analiza wyników doświadczeń pokazała istnienie wzajemnych interakcji pomiędzy dwoma składnikami lipidowymi surfaktantu (DPPC i cholesterol) oraz ich zmian pod wpływem składników leków inhalacyjnych. Pokazano to na podstawie analizy zmian stanów fizycznych oraz porównawczej oceny obrazów BAM badanej powierzchni. Uzyskane informacje potwierdziły przypuszczenia o występowaniu wpływu leków na warstwę lipidową, tworzoną przez DPPC i cholesterol. Z kolei, badania z zastosowaniem pełnego modelu MPS wykorzystujące analizę zmian kształtu histerezy napięcia powierzchniowego wykazały możliwość interakcji farmaceutyk-surfaktant płucny. Uzyskane informacje mogą posłużyć do oszacowania ryzyka inhalacji badanych leków i wskazania potencjalnych mechanizmów konsekwencji zdrowotnych. Badania tego typu stanowią narzędzie bazujące na fizykochemii i reologii powierzchni, umożliwiające bardziej realistyczną analizę oddziaływań na powierzchni układu surfaktantu płucnego. Z drugiej strony jednak badania monowarstwy LM pozostają subtelniejszą analizą ilustrującą zmiany na poziomie molekularnym, wnoszącą cenne informacje do zrozumienia mechanizmów analizowanych oddziaływań ze składników surfaktantu płucnego.

10.3.3.3. Interakcje pomiędzy modelem surfaktantu płucnego (MPS) a potencjalnymi substancjami pomocniczymi pochodzenia naturalnego

10.3.3.3.1. Modyfikatory napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego

W tej części zdecydowano się na przedstawienie jedynie badań oddziaływań pomiędzy modyfikatorami napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego i MPS bez obecności chlorku sodu (w stężeniu fizjologicznym). Taki wybór był podyktowany m.in. podkreślanym w podrozdziale 10.1.4 oddziaływaniem pomiędzy modyfikatorami napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego a NaCl (badania napięcia powierzchniowego), dodatkowo utrudniającym analizę wyników w sytuacji, gdy jony soli wpływają również na MPS poprzez interakcję ze składnikami lipidowymi (podrozdział 10.3.2.1). Podejście to jest uzasadnione również wynikami badań (rozdział 0), które pokazały niewielki wpływ obecności soli na jakość aerozolu powstającego w obecności modyfikatorów lepkości.

W wyniku badań MPS Infasurf® w obecności modyfikatorów napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego uzyskano wyniki, które pokazano Tab. 10.13 i na Rys. 10.50. Wartość quasi-równowagowego σ w przypadku escyny zmieniła się z 32,07 mN/m (MPS Infasurf®) do 32,10 mN/m (stężenia Esc: 0,0175%) i 30,10 mN/m (stężenia Esc: 0,035%) a w przypadku

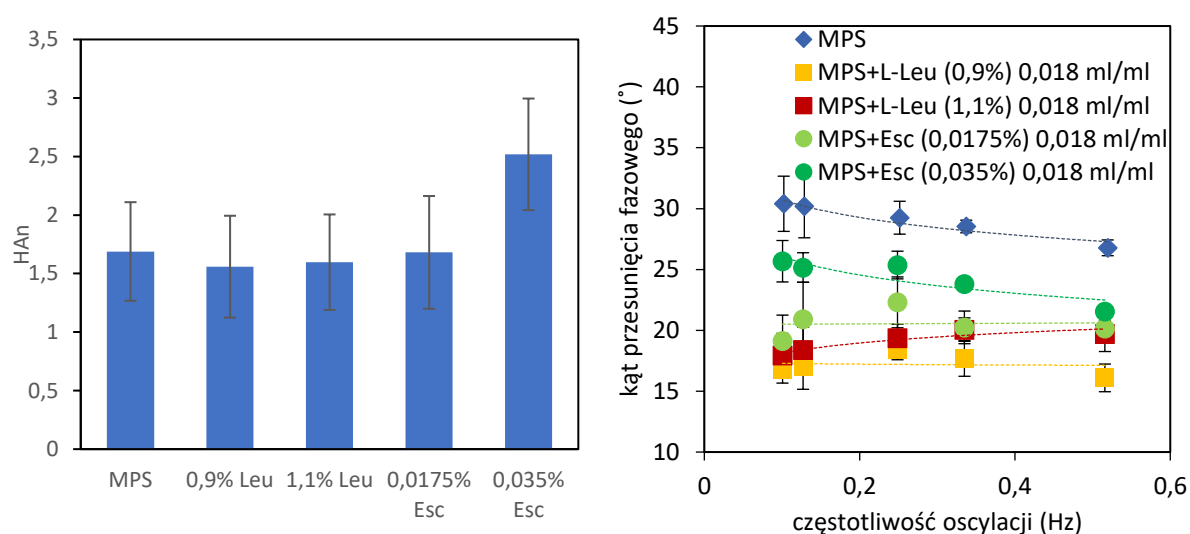
leucyny do 31,35 mN/m (0,9%) i 32,71 mN/m (1,1%). Różnice (Tab. 10.13) nie są duże i świadczą o niewielkim wpływie środków powierzchniowoczynnych na ten parametr. Podobne obserwacje zanotowano również analizując σ_{min} . Wartości parametru były zbliżone do tych zmierzonych w przypadku czystego modelu, a spadkowa tendencja zależności $\sigma_{min}(f)$ została utrzymana choć w przypadku escyny i leucyny spadek jest mniejszy. Natomiast znaczące różnice w wartościach SI wynikają ze wzrostu σ_{max} . Wpływa to na kształt histerezy napięcia powierzchniowego, która ulega rozszerzeniu. Zauważono, że dodatek substancji pochodzenia naturalnego sprzyja zwiększa SI wraz z przyspieszaniem oscylacji powierzchniowej. Obie substancje (Esc i L-Leu) wykazywały podobny wpływ, przy czym zależności od stężenia jest zauważalna tylko w przypadku leucyny.

Tab. 10.13. Porównanie parametrów σ_{min} i SI charakteryzujących MPS Infasurf® w obecności wybranych modyfikatorów napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego

MPS - Infasurf					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$29,62 \pm 0,45$	$29,35 \pm 1,14$	$28,67 \pm 0,21$	$28,42 \pm 1,72$	$27,92 \pm 1,42$
SI (-)	$0,18 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$
MPS + Esc 0,0175%					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$27,53 \pm 0,75$	$27,74 \pm 0,51$	$27,14 \pm 0,60$	$27,07 \pm 0,39$	$26,89 \pm 0,37$
SI (-)	$0,30 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,04$
MPS + Esc 0,035%					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$27,07 \pm 0,47$	$27,01 \pm 0,31$	$26,77 \pm 0,30$	$26,88 \pm 0,41$	$26,17 \pm 0,66$
SI (-)	$0,28 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,03$
MPS + Leu 0,9%					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$26,56 \pm 0,50$	$26,32 \pm 0,49$	$26,01 \pm 0,65$	$25,89 \pm 0,27$	$25,60 \pm 0,47$
SI (-)	$0,30 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$
MPS + Leu 1,1%					
Parametry	$f=100\text{mHz}$	$f=125\text{mHz}$	$f=250\text{mHz}$	$f=330\text{mHz}$	$f=500\text{mHz}$
σ_{min} (mN/m)	$28,72 \pm 0,87$	$28,47 \pm 1,30$	$27,94 \pm 0,90$	$27,91 \pm 0,83$	$27,70 \pm 1,14$
SI (-)	$0,33 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,00$	$0,38 \pm 0,01$

Kąt przesunięcia fazowego ulega obniżeniu w kontakcie MPS z modyfikatorami napięcia powierzchniowego (Rys. 10.50 po lewej). Dla obu badanych substancji stwierdzono, że niższe stężenie dodatku wywołuje większe zmiany. Najmniejszy spadek wartości parametru stwierdzono w przypadku escyny o stężeniu 0,035%. Obecność leucyny wpływa na (obserwowany również dla czystego MPS) nieliniowy spadek ϕ wraz ze wzrostem częstotliwości oscylacji. Przy wyższym stężeniu i przy $f < 250\text{mHz}$ zaobserwowano wzrost ϕ . Otrzymane dane SI i ϕ obrazują kierunek zmiany kształtu i wielkości pola histerezy w wyniku oddziaływań modyfikatorów napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego z surfaktantem płucnym. Obecność leucyny i escyny sprzyjała rozszerzeniu zakresu granicznych

wartości napięcia powierzchniowego (σ_{min} i σ_{max}) oraz zbliżaniu się do siebie krzywej ekspansji i kompresji. W konsekwencji wielkość pola histerezy uległo zmniejszeniu. Wyjątkiem jest układ o największym stężeniu escyny, w którym doszło do wzrostu wielkości pola histerezy. Przyczyną takiej zmiany jest znacznie mniejszy w porównaniu do pozostałych badanych próbek spadek wartości ϕ . Wiąże się to także ze wzrostem indeksu stabilności przy 100 mHz. Wzrost energii powierzchniowej, układu można ocenić jako pozytywny efekt interakcji pomiędzy molekułami potencjalnej substancji pomocniczej a MPS, wzmacniający aktywność biofizyczną surfaktantu płucnego.



Rys. 10.50. Porównanie parametrów HAn (po lewej) przy 100 mHz oraz ϕ (po prawej) charakteryzujących wybrane modyfikatory napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego

Biorąc pod uwagę wszystkie przedstawione w tym podrozdziale wyniki, można stwierdzić, że żadna z dwóch badanych substancji modyfikujących napięcie powierzchniowe (tj. leucyna i escyna) w badanym zakresie stężeń nie osłabiła natywnych dynamicznych właściwości powierzchniowych modelowego surfaktantu płucnego w sposób, który mógłby wskazywać na możliwe pogorszenie jego funkcji *in vivo*. Niewielkie różnice w kryteriach ilościowych obliczone z krzywych $\sigma(A)$, zwłaszcza HAn , nie wykazały istotnej utraty aktywności funkcji biofizycznych. W kontekście potencjalnego zastosowania leucyny i escyny jako zamienników syntetycznych surfaktantów w lekach inhalacyjnych należy dokonać, obok ogólnej oceny ich bezpieczeństwa, ocenę porównawczą z powszechnie stosowanymi substancjami tj. BAC czy związkami z grupy polisorbatów. Porównując wyniki z podrozdziału 10.3.3.1 zauważono bliźniaczo podobne przebiegi zmian pomiędzy BAC a escyną. Jednakże ilościowa analiza kryteriów jednoznacznie wskazuje na mniejszą ingerencję we właściwości dynamiczne surfaktantu płucnego przez substancję pochodzenia naturalnego.

10.3.3.3.2. *Modyfikatory lepkości pochodzenia naturalnego*

Analiza interakcji pomiędzy modyfikatorami lepkości pochodzenia naturalnego a modelowym surfaktantem płucnym jest podobnie jak w przypadku wpływu modyfikatorów napięcia powierzchniowego trudna. Jest to związane z różnorodnością czynników wpływających jednocześnie na właściwości fizykochemiczne modyfikatorów oraz ich zachowanie w mieszaninie z surfaktantem. Ponadto, badane polisacharydy o potencjalnym zastosowaniu farmaceutycznym w lekach będą narażone na kontakt oraz interakcje z niezbędnymi substancjami pomocniczymi np. regulującymi izotoniczność (NaCl), które mogą wpływać na zmianę ładunku powierzchniowego czy konformację przestrzenną molekuł^(291,302–304). Co więcej, w przypadku analizy wpływu XG, dodatkową trudność stwarza zmienna sztywność łańcuchów polisacharydu, co podczas prowadzonej kompresji lub ekspansji powierzchni międzyfazowej może stanowić dodatkowe źródło oporu przed odkształceniami^(304–306).

Omówienie wpływu biopolimerów na surfaktant płucny (w tym przypadku MPS Infasurf[®]) rozpoczęto od analizy indeksu stabilności w funkcji częstości oscylacji. We wszystkich badanych układach obserwowano nieliniowy wzrost SI , spowodowanym rozszerzeniem zakresu granicznych wartości napięcia powierzchniowego (spadek σ_{min} oraz wzrost σ_{max}) wraz ze wzrostem f (Rys. 10.51.-A). Odzwierciedla to także wzrost elastyczności powierzchni międzyfazowej ciecz-powietrze. Dodatek SH oraz jonów NaCl wywołał wahania wartości chwilowego napięcia powierzchniowego, natomiast nie wpłynął w istotny sposób na przebieg zależności $SI(f)$, choć spowodował nieznaczne zwiększenie wartości tego wskaźnika w porównaniu z próbką kontrolną (MPS). Wzrost wartości SI można uznać za pozytywny skutek fizjologiczny. Różnice pomiędzy wartościami SI uzyskanymi w przypadku próbki kontrolnej a XG były nieznaczne. Nie odnotowano tutaj również istotnej roli elektrolitu. Z kolei analizując, przy jednej częstotliwości oscylacji (100 mHz), indeks stabilności roztworów AG o różnych stężeniach i bez lub w obecności NaCl zauważono, że wartości SI są podobne, jednak krzywe $SI(f)$ przebiegały różnie przy wyższych wartościach f . Ogólnie, wszystkie wartości parametru SI były niższe niż w przypadku próbki kontrolnej. Wyjątek stanowił układ zawierający AG (3 mg/ml) w obecności NaCl, gdzie wartości indeksu stabilności były takie same jak w przypadku MPS. Sugeruje to, że AG może sprzyjać obniżaniu natywnych właściwości dynamicznych surfaktantu płucnego. Wyniki te są przeciwne do tych zaobserwowanych przy badaniu SH.

Kolejny parametr, który uległ zmianie w obecności modyfikatorów lepkości oraz jonów soli NaCl, to znormalizowane pole histerezy obliczone z zależności σ -A przy $f=100\text{mHz}$ (Rys.

10.51.-B.). Obecność hialuronianu sodu wraz ze wzrostem jego zawartości sprzyja wzrostowi pola powierzchni histerezy, a dodatek elektrolitu dodatkowo intensyfikuje tą tendencję. Oddziaływanie pomiędzy elektrolitem a składnikami lipidowymi monowarstwy omówione w podrozdziale 10.3.2.1 stoją u podstawy wyjaśnienia jego wpływu na dynamikę powierzchni międzyfazowej oraz parametr HAn . Do ważnych interakcji należą wiązania kationów sodowych z grupami karbonylowymi DPPC i tworzenie chmury jonowej anionów chlorkowych wokół grup cholinowych⁽¹⁴⁹⁾. W analizowanym układzie zachodzą również interakcje NaCl-SH, w wyniku których dochodzi do zmian przestrzennej konformacji molekuł biopolimeru, co wpływa na właściwości reologiczne jego roztworów^(291,302). Czynniki te mogą wpływać na wartości stosowanych kryteriów oceny histerezy σ . Z kolei, XG bez dodatku elektrolitu spowodował nieznaczne zwiększenie powierzchni pętli histerezy napięcia powierzchniowego, natomiast obecność NaCl znacznie zredukowała ten efekt. Przyczyn należy upatrywać, podobnie jak w przypadku SH, zarówno w oddziaływaniach MPS-NaCl⁽¹⁴⁹⁾ oraz XG-NaCl, będących przyczyną zmian przestrzennej konformacji cząsteczki polisacharydu^(306,307). Jednocześnie podobną zmianę w wartościach parametru HAn zauważono w przypadku AG. Obecność AG sprzyjała zmniejszeniu pola histerezy (zwężeniu pętli) w porównaniu do próbki kontrolnej. Jedynym wyjątkiem był układ zawierający 3 mg/ml AG + 0,9% NaCl, gdzie zaobserwowano niewielki wzrost HAN. Różnice między czystym MPS a układem MPS+3 mg/ml AG + 0,9% NaCl można jednak uznać za nieistotną, co potwierdza także znikomy efekt zaobserwowany przy analizie SI (Rys. 10.51.-A).

Analiza kąta przesunięcia fazowego pokazuje, że również ten parametr ulega zmianie w kontakcie MPS z polisacharydowymi modyfikatorami lepkości. Czysty MPS (Rys. 10.51.-C niebieski znacznik), co szczegółowo omówiono w podrozdziale 10.3.3, charakteryzuje się spadkową tendencją ϕ wraz ze wzrostem częstotliwości wymuszonych odkształceń GLI. Obecność SH nie wpływa na obserwowany trend, ale wywołuje nieznaczny spadek wartości przy każdej z mierzonych częstotliwości oscylacji. Oznacza to, że dodatek SH sprzyja zawężaniu pętli histerezy w wyniku zbliżania się krzywych ekspansji i kompresji w porównaniu z próbką kontrolną. Jest to związane ze wzrostem roli składowej elastycznej nad składową lepkości zgodnie z interpretacją modelu powierzchni lepkosprężystej (omówionej w podrozdziale 5.4.5). Z kolei, dodatek XG w porównaniu do SH ma znacznie silniejszy wpływ na mierzoną charakterystykę, zmieniając przebieg zależności $\phi(f)$. Również w tym przypadku zaobserwowano obniżenie wartości ϕ w stosunku do MPS, jednakże jego wartości nie zmieniały się lub nieznacznie wzrastały przy większych częstotliwościach oscylacji. Podobnie do wyników dla SH, nie zaobserwowano większej różnicy między próbkami z elektrolitem i

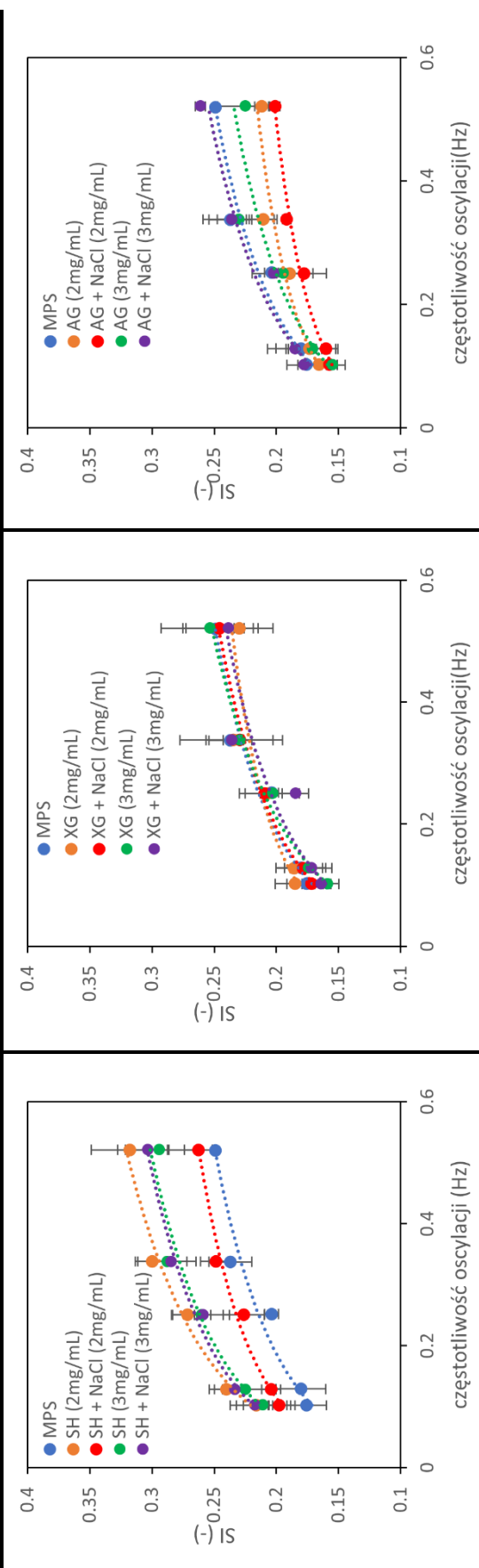
bez niego. Również obecność AG w większym stężeniu spowodowała spadek φ w stosunku do MPS, a mniej stężone roztwory cechowała niższa wartość φ przy małych f a większa przy deformacjach >330 mHz. Także i w tym przypadku nie odnotowano większych różnic spowodowanych obecnością elektrolitu.

Podsumowując, całościowa analiza zależności pomiędzy parametrami φ i SI , której podstawy przedstawiono w podrozdziale 5.4.5, wykazała, że są one ściśle powiązane z HAn i z kształtem pętli histerezy. SI to parametr ściśle związany z amplitudą zmian napięcia powierzchniowego w pętli histerezy i opisuje maksymalny jej zakres, co wiąże się także z jej kształtem. Wskaźnik ten wynika z dynamicznych właściwości powierzchniowych i w przypadku modyfikatorów lepkości jest on bardziej zależny od sprężystości powierzchniowej niż składowej lepkościowej.

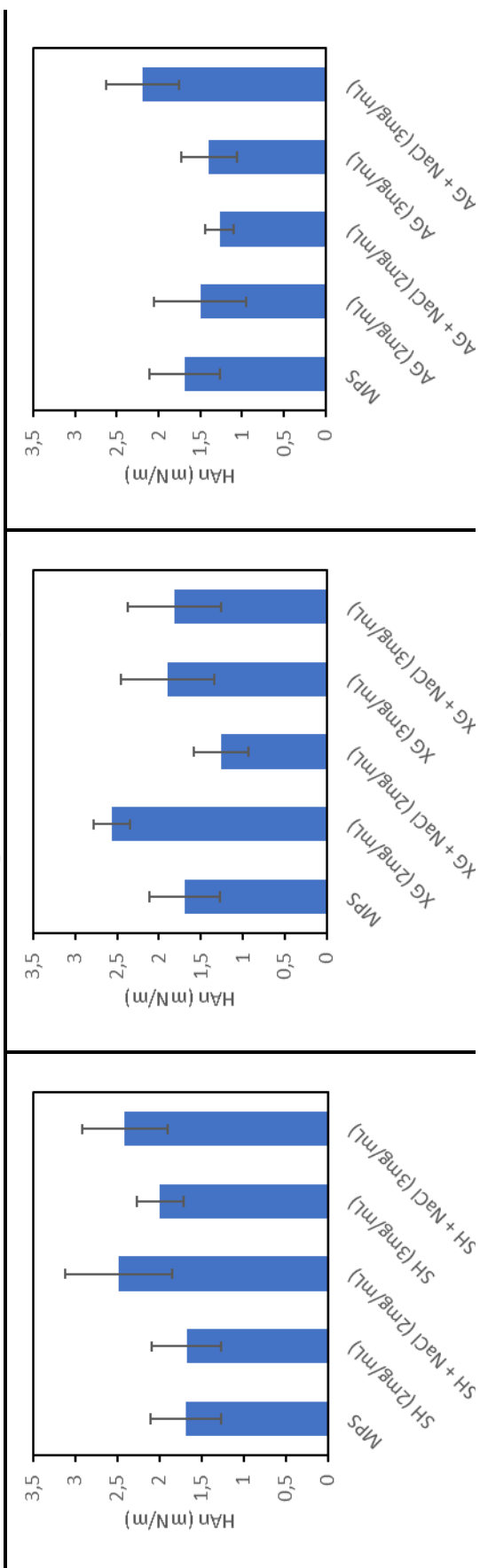
Na podstawie otrzymanych danych określono ogólne tendencje dotyczące interakcji pomiędzy polisacharydami a MPS. Stwierdzono, że wpływ XG na dynamikę MPS przejawia się w zwężaniu pętli histerezy, co jest bardziej widoczne przy wyższych częstotliwościach oscylacji. Efekt ten może zostać jednak zmieniony w obecności elektrolitu. Podobny trend stwierdzono w przypadku AG. Wykazano generalnie podobną zależność między kryteriami histerezy i parametrami reologii powierzchni. Podsumowując, dodatek AG niezależnie od stężenia i zawartości soli spowodował jednoczesny spadek φ i SI , ilustrując zwężenie pętli histerezy σ . Z kolei, SH stanowi przykład substancji, która wywołuje dwa przeciwstawne efekty tj. zwiększenie indeksu stabilności oraz zmniejszenie kąta fazowego. Stąd łączny wpływ na wielkość (pole) histerezy zależy od zakresu zmian każdego z tych kryteriów.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe dane można stwierdzić, że żaden z wybranych biopolimerów w badanym zakresie stężeń nie spowodował osłabienia natywnych dynamicznych właściwości powierzchniowo czynnych modelowego surfaktantu płucnego, w stopniu, który mógłby sugerować potencjalne upośledzenie jego funkcji w warunkach *in vivo*. W związku ze znikomymi różnicami w wartościach kryteriów liczbowych i właściwościach reologicznych nie należy spodziewać się istotnego zaburzenia biofizycznej funkcji surfaktantu płucnego, co stanowi dobry prognostyk w rozważaniach nad potencjalnym zastosowaniem tych modyfikatorów lepkości jako substancji pomocniczych w lekach inhalacyjnych.

A. Indeks stabilności SI (n=6)

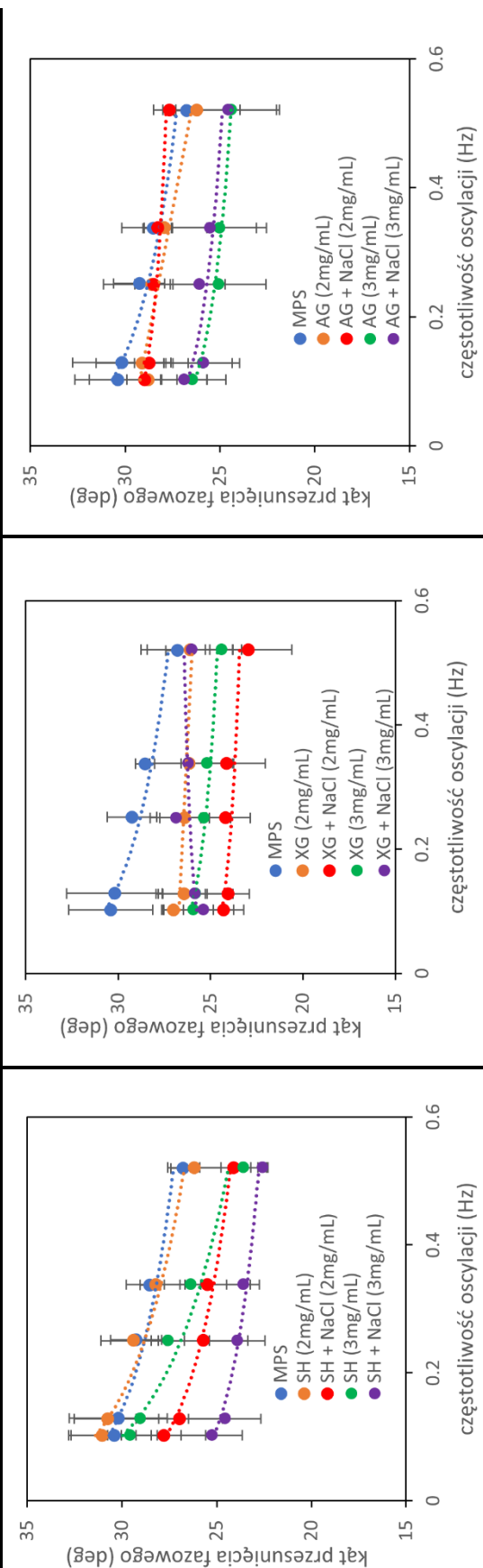


B. Znormalizowane pole histerezy HAn (f=0,1Hz; n=6)



Rys.10.51. Parametry charakterystyczne: indeks stabilności (A), znormalizowane pole histerezy (B), kąt przesunięcia fazowego (C) MPS w obecności modyfikatorów lepkości pochodzenia naturalnego: (i) SH, (ii) XG, (iii) AG.

C. Kąt przesunięcia fazowego φ (n=6)



Rys.10.51. Parametry charakterystyczne: indeks stabilności (A), znormalizowane pole histerezy (B), kąt przesunięcia fazowego (C) MPS w obecności modyfikatorów lepkości pochodzenia naturalnego: (i) SH, (ii) XG, (iii) AG.

11. Podsumowanie wyników badań

Atomizacja cieczy w urządzeniach medycznych jest zależna od konstrukcji urządzenia oraz od warunków procesowych. Jak wykazały zawarte w tej rozprawie badania, kluczową rolę odgrywa konstrukcja urządzenia, a więc mechanizm i sposób realizacji procesu atomizacji. Czynniki te istotnie wpływają na wielkość wytwarzanych kropel, strumień emitowanego aerozolu, masę leku pozostałą po ustaniu procesu (zawartą w objętości rezydualnej), zmiany temperatury cieczy w trakcie trwania procesu, czy możliwość rozdrobnienia agregatów cząstek stałych (w przypadku atomizacji zawiesin). Na podstawie przeprowadzonych badań, zauważono, że nebulizatory pneumatyczne wykazują większą masową wydajność emisji i mniejszą stabilność pracy (większe fluktuacje wydajności) niż nebulizatory siateczkowe. Atomizacja w nebulizatorach siateczkowych przebiega w warunkach niemal izotermicznych, podczas gdy w pneumatycznych ciecz ulega oziębieniu w trakcie procesu. W trakcie nebulizacji, w wyniku adiabatycznego odparowania kropel wewnątrz naczynia oraz ich częściowej recyrkulacji dochodzi do obniżenia temperatury cieczy o kilka, a nawet kilkanaście stopni. Przebieg spadku temperatury zależy od właściwości fizykochemicznych substancji, choć przede wszystkim od konstrukcji samego urządzenia pneumatycznego. Z drugiej strony zmiany temperatury są źródłem zmian w jakości aerozolu w miarę trwania nebulizacji, ponieważ wpływają na właściwości fizykochemiczne cieczy (lepkość i napięcie powierzchniowe), te zaś wpływają na przebieg procesu atomizacji.

Lepkość cieczy odgrywa tu dominującą rolę jako miara sił przeciwstawiających się deformacji i rozrywaniu cieczy. Rozpraszanie cieczy o podwyższonej lepkości wymaga większego rozkładu energii, który zapewnia jedynie nebulizacja z zastosowaniem sprężonego powietrza. Tylko w nebulizatorach pneumatycznych może dojść do atomizacji cieczy o właściwościach reologicznych silnie zmodyfikowanych w stosunku do wody. Badania zaprezentowane w rozprawie pokazały znaczenie tych właściwości (m.in. cech nieniutonowskich cieczy) dla lepszego zrozumienia i ilościowego opisu procesu. Wyniki pokazały m.in., że nebulizacja cieczy o stałej lepkości często prowadzi do powstania aerozolu o innych parametrach niż nebulizacja płynów rozrzedzanych ścinaniem. W przypadku cieczy rozrzedzanych ścinaniem uzyskuje się niższą efektywną lepkość ze względu na występowanie wysokich szybkości ścinania w obszarze rozpraszania cieczy. Takie zjawisko ma miejsce np. w przypadku wodnych roztworów polisacharydów pochodzenia naturalnego atomizowanych w nebulizatorach pneumatycznych, gdzie na skutek burzliwości w komorze nebulizatora dochodzi do reorganizacji struktury przestrzennej molekuł i zerwania słabych wiązań (np.

wodorowych). Rozpraszanie płynów niutonowskich o wyższej lepkości skutkuje obniżeniem szybkości emisji aerozolu i w konsekwencji wydłużeniem procesu. Wydajność emisji dawek można zweryfikować na podstawie objętości cieczy, która nie uległa atomizacji (objętości rezydualnej, RV). Dla roztworów o podwyższonej lepkości wartość RV wzrasta. Zaobserwowano jednak, że zwiększona lepkość stabilizuje emisję, zawężając zakres fluktuacji wartości wydajności w czasie procesu. W przypadku płynów rozrzedzanych ścinaniem uzyskuje się wyższe wartości wydajności. Zmienność parametrów reologicznych w czasie i w funkcji stężenia substancji zagęszczającej wymaga podejścia indywidualnego do każdego z biopolimerów badanych w tej pracy. Różnice w przebiegu atomizacji roztworów polisacharydów zaznaczają się w obecności NaCl, sugerując, że molekuły SH ulegają zmianom strukturalnym w obecności elektrolitu, a AG - nie.

Lepkość wpływa także na rozmiar kropeł oraz udział masowy kropeł o średnicy poniżej 5 μm (FPF). W przypadku płynów niutonowskich (roztwory glukozy i gliceryny) dochodzi do znacznego obniżenia wartości $Dv(50)$. Nie zaobserwowano wpływu lepkości na szerokość rozkładu średnic. W przypadku roztworów polisacharydów jako modyfikatorów lepkości pochodzenia naturalnego, ze względu na dynamikę procesu atomizacji i charakter płynów, istotnym elementem było zweryfikowanie stabilności właściwości aerodynamicznych mgieł podczas trwania procesu. Obecność tych modyfikatorów lepkości sprzyja wzrostowi wielkości średnic kropeł emitowanych, jednakże wraz z trwaniem procesu dochodzi do stopniowego zmniejszania wielkości kropeł, w odróżnieniu od atomizacji wody czy soli fizjologicznej, gdzie rozmiar kropeł jest stabilny. W przypadku biopolimerów nie zaobserwowano również większego ich wpływu na polidispersyjność aerozolu, ale odnotowano spadek udziału kropeł drobnych. Stabilność wielkości kropeł emitowanych z nebulizatorów pneumatycznych w procesie atomizacji roztworów agaru oraz brak tej stabilności w przypadku roztworów gumy ksantanowej wyjaśniono w oparciu o zmianę właściwości reologicznych cieczy atomizowanej.

O większym znaczeniu konstrukcji nebulizatora dla właściwości emitowanych aerozoli w porównaniu z lepkością świadczy wynik analizy wpływu spadku temperatury cieczy rozpylanej w nebulizatorze pneumatycznym na wielkość kropeł. Naturalne obniżenie temperatury w nebulizatorze wpływa na wzrost lepkości dynamicznej cieczy. Przedstawione badania pokazały, że wzrost lepkości związany z obniżeniem temperatury nie zwiększał znacząco emisji mniejszych kropeł wraz z trwaniem procesu atomizacji, w płynach niutonowskich (roztwory glukozy). W przypadku płynów nieniuonowskich obserwowane zmiany parametrów aerozolu w czasie procesu wynikają ze zmiany charakteru płynu na skutek restrukturyzacji a nie na skutek zmiany temperatury.

Kolejną właściwością fizykochemiczną, która ma wpływ na parametry mgły aerozolowej jest napięcie powierzchniowe. Roztwory wodne zawierające substancje powierzchniowoczynne mogą być efektywnie rozpraszane zarówno za pomocą nebulizatorów pneumatycznych, jak i siateczkowych. W procesie atomizacji obniżenie wartości napięcia powierzchniowego zmniejsza zapotrzebowanie na energię, potrzebną do rozpadu cieczy na krople. Wpływ ten uwidacznia się bardziej w przypadku nebulizatorów siateczkowych. W urządzeniach tych mamy do czynienia z mniej intensywnym mieszaniem wewnątrz komory, co zwiększa wpływ adsorpcji surfaktantu na proces formowania się kropeł niż w porównaniu z JN. Mechanizm powstawania kropeł w nebulizatorze pneumatycznym wiąże się z krótkim czasem życia kropeł, na powierzchni których nie dochodzi do równowagowej adsorpcji związku powierzchniowo czynnego, a więc nie jest osiąganego równowagowego napięcia powierzchniowego. Stąd wpływ równowagowej wartości napięcia powierzchniowego na działanie JN nie jest jednoznaczny.

Różnice we wpływie napięcia powierzchniowego na proces atomizacji, są widoczne już w wynikach badań wydajności emisji. Zastosowaniu dodatku surfaktantu w cieczy rozpylanej z użyciem nebulizatora pneumatycznego sprzyjało obniżeniu wydajności emisji, z kolei w VMN zaobserwowano niewielki wzrost lub brak zmian. Świadczy to także o tym, że w przypadku VMN napięcie powierzchniowe ma mniejszy wpływ na wydajność emisji niż przewodność elektrolityczna. Ogólnie, wpływ obniżenia napięcia powierzchniowego (uzależniony, poniżej CMC od zawartości związku powierzchniowoczynnego) na średnie wartości masowych wydajności emisji jest trudny do interpretacji nawet dla nebulizatorów siateczkowych. Potwierdza to potrzebę indywidualnego podejścia do oceny jakości aerozolu dla konkretnej cieczy rozpylanej (leku) w danym nebulizatorze (identyfikacja układu nebulizator-lek). Różnic w badanych zależnościach należy upatrywać w konstrukcji VMN, a także w możliwych oddziaływaniach pomiędzy materiałem membrany a rozpylaną cieczą, na co wskazywano także w innych badaniach. Natomiast, analizując dane uzyskane przy rozpraszaniu cieczy w nebulizatorze pneumatycznym zauważono generalną tendencję do spadku wydajności emisji aerozolu wraz ze spadkiem napięcia powierzchniowego. Istnieją jednak również pewne podobieństwa dotyczące wpływu napięcia powierzchniowego na działanie nebulizatorów. Przykładowo, obniżenie napięcia powierzchniowego wiąże się w obu rodzajach nebulizatorów ze spadkiem objętości rezydualnej, co pociąga za sobą mniejsze straty preparatu podczas inhalacji.

Wobec tak sformułowanych wniosków w pracy przeprowadzono charakterystykę jakości aerozolu dla dotąd niebadanego procesu nebulizacji roztworów wybranych modyfikatorów

napięcia powierzchniowego pochodzenia naturalnego. Duża zmienność i rozrzut wyników potwierdza wcześniejsze obserwacje. Zaobserwowano również wpływ napięcia powierzchniowego na rozkład wielkości kropeł aerozolu uwalnianych z nebulizatorów pneumatycznych i siateczkowych. W nebulizatorach siateczkowych powstają coraz mniejsze krople (spadek wartości $Dv(50)$) wraz ze wzrostem stężenia substancji powierzchniowoczynnej (tj. spadkiem σ). Wszystkie emitowane aerozole z dodatkiem surfaktantu mają charakter polidispersyjny. Jednakże, jak pokazały wyniki, obecność molekuł powierzchniowoczynnych przyczynia się do zwężenia szerokości rozkładu. Takie działanie pozytywnie wpływa na jakość uwalnianej chmury aerozolowej pod kątem terapeutycznego zastosowania. Zmiany są też widoczne w postaci wzrostu udziału kropeł drobnych w chmurze aerozolowej (FPF). Natomiast, w przypadku nebulizatorów pneumatycznych obserwowany wpływ na wielkość kropeł nie jest jednoznaczny. Otrzymane wyniki wyraźnie pokazują, że spadek temperatury podczas trwania procesu atomizacji w nebulizatorze pneumatycznym ma małe znaczenie pomimo ochłodzenia cieczy, które wpływa na wartość napięcia powierzchniowego. Jednocześnie dodatek modyfikatorów napięcia powierzchniowego zwiększa obniżenie temperatury w czasie trwania atomizacji w porównaniu z procesem rozpraszania soli fizjologicznej.

Właściwością fizykochemiczną mającą także wpływ na parametry aerozolu jest przewodność elektrolityczna. Roztwory wodne o podwyższonej zawartości łatwo dysocjujących soli mogą bez przeszkód być rozpraszane za pomocą nebulizatorów pneumatycznych, jak i siateczkowych. Obecność jonów takich soli nie wpływa w istotny sposób na wartości wydajności chwilowej emisji w porównaniu z atomizacją wody. Wartości wydajności fluktuują wokół wartości średniej, jednakże w obecności jonów dostrzega się niewielki efekt stabilizujący. Obecność jonów w większym stopniu wpływa na aerozol rozpylany z użyciem nebulizatorów siateczkowych niż pneumatycznych. Wzrost zawartości silnego elektrolitu takiego jak NaCl zwiększa zakres różnicy temperatur cieczy rozpylanej – temperatura obniża się o nawet o 2°C więcej niż w przypadku soli fizjologicznej. Z kolei, objętość rezydualna nebulizatora pneumatycznego praktycznie nie zmienia się przy wzroście przewodności elektrolitycznej rozpylanego roztworu. Niewielki wzrost parametru obserwowany jest jedynie przy bardzo dużym wzroście za (10% NaCl), co może być, powiązane z dużym odparowaniem próbki w wyniku zasolenia. Natomiast, dodatek soli do cieczy rozpylanych przez VMN sprzyja wzrostowi wartości wydajności emisji. W urządzeniach membranowych w obecności jonów może dojść do interakcji (wzajemne przyciąganie/odpychanie) pomiędzy materiałem membrany czy komory a cieczą rozpraszaną.

Niska wartość średniej emisji aerozolu uwalnianego podczas atomizacji wody ultraczystej może wynikać z faktu, że niektóre urządzenia membranowe potrzebują wzrostu przewodności cieczy do wydajniejszej pracy. Analizując zależność objętości rezydualnej od przewodności roztworów zauważono tendencję do jej spadku wraz ze wzrostem zawartości elektrolitu.

Na kolejnym etapie pracy posłużono się otrzymanymi wynikami, aby zbadać i pogłębić wiedzę odnośnie zjawisk, które rządzą procesem nebulizacji cieczy leczniczych w nebulizatorach. Wybrano w tym celu preparaty zawiesinowe oraz w postaci roztworów, które mają w przybliżeniu taką samą lepkość dynamiczną. Badania mogły posłużyć również dyskusji umożliwiającej porównanie jakości aerozoli rozpylanych z leków oryginalnych i generycznych. Analiza średniej wydajności emisji leków inhalacyjnych w postaci roztworów pokazuje, że dominujący wpływ na jakość aerozolu ma konstrukcja urządzenia atomizującego, a w drugiej kolejności napięcie powierzchniowe. Ogólnie, wyższymi wartościami wydajności emisji aerozoli preparatów farmaceutycznych charakteryzuje nebulizator pneumatyczny. Jednakże wartości te mogą być modyfikowane przez zmianę właściwości cieczy. Dominujący wpływ konstrukcji urządzenia został również potwierdzony w badaniach objętości rezydualnej, które wykazały, że w urządzeniu pneumatycznym RV jest dużo większa niż w VMN.

Kontynuując rozważania, przeanalizowano rozkłady wielkości kropeł w których zaobserwowano, że rozkłady wielkości kropeł otrzymanych z nebulizatorów siateczkowych są znacznie węższe niż w przypadku urządzenia pneumatycznego. W przypadku zawiesin, różnice w napięciu powierzchniowym odgrywa rolę drugorzędną i tylko w nieznacznym sposób wpływa na wielkość emitowanych kropeł. Analiza mgieł emitowanych przez VMN wykazała brak znaczących różnic pomiędzy lekami, w formie roztworów i zawiesin. Porównanie rozmiarów kropeł oraz udziału kropeł drobnych pokazuje, że korzystniejszymi właściwościami, pod względem terapeutycznym, charakteryzuje się aerozol emitowany z nebulizatora pneumatycznego, który pomimo większej polidispersyjności, oferuje większą potencjalną penetrację płuc przez inhalowany aerozol. Należy jednak zaznaczyć, że wyniki uzyskane dla nebulizatorów siateczkowych są dużo bardziej powtarzalne. Odnotowano również różnice w wielkości kropeł rozpylanych leków generycznych i oryginalnego, których przyczyn należy upatrywać w różnicach w składzie, a w konsekwencji - we właściwościach fizykochemicznych.

Obecność w lekach inhalacyjnych API w postaci cząstek nierozpuszczalnych oraz substancji pomocniczych zmieniających właściwości fizykochemiczne fazy wodnej wpływają na zakres spadku temperatur cieczy w czasie trwania nebulizacji, przy czym charakter i dynamika zmian jest jak dla surfaktantów. Zauważono również niewielkie różnice pomiędzy lekiem oryginalnym a generycznym i spowodowane różnicami w napięciu powierzchniowym.

Temperatura leków inhalacyjnych podczas nebulizacji pneumatycznej jest obniżana w większym stopniu niż w przypadku soli fizjologicznej.

Interesujące wnioski w kontekście różnic między lekami odtwórczymi a oryginalnym wpływają z oceny wpływu procesu atomizacji w nebulizatorach siateczkowych na agregację cząstek substancji aktywnej (tu: budezonidu) i szybkość ich sedymentacji. Morfologia cząstek API badanych zawiesin leczniczych pokazała, że mamy do czynienia z cząstkami niesferycznymi i charakteryzującymi się dużą nieregularnością w kształcie oraz niejednorodnością rozmiarów. We wszystkich zawiesinach mają oddziaływanie one między sobą i tworzą większe zespoły. Siły kohezji są tym silniejsze, im większy jest stopień rozdrobnienia cząstek. W niektórych formulacjach występują również większe cząstki pierwotne. Badania pokazały, że zawiesiny cechują się niestabilnością (tj. rozdziałem na drodze sedymentacji). Krzywe ilustrujące taki proces mają przebieg nieliniowy i różny dla poszczególnych leków. Różnice w szybkości sedymentacji wynikają z właściwości formulacji tj.: wielkości pojedynczych cząstek leku, ich tendencji do agregacji i różnego udziału masowego dodatków (stabilizatorów oraz konserwantów), będących przyczyną różnic we właściwościach fizykochemicznych pomiędzy lekami oryginalnymi a generycznymi. Analiza rozpadu agregatów cząstek API w wyniku prowadzonego procesu atomizacji zawiesin w VMN pokazała, że wibracje membrany powodują rozbicie skupisk cząstek i emisję drobnych kropel zawierających cząstki o rozmiarach do kilku mikrometrów. Do ostatecznego rozbicia skupisk cząstek może dochodzić wewnątrz otworów membrany, w których zawiesina poddana jest naprężeniom ścinającym. Jednocześnie może dojść do nierównomiernej emisji cząstek w trakcie trwania procesu atomizacji ze względu na różnice w rozmiarach (zbyt duże cząstki będą akumulować się w nebulizatorze).

W celu oszacowania przewidywanej dawki osadzającej się w płucach w trakcie nebulizacji, wyniki uzyskane z pomiarów rozkładu wielkości kropel aerozolu zostały zaimplementowane do modelu MPPD. Pozwoliło to na określenie depozycji inhalowanego aerozolu w układzie oddechowym, uwzględniające ułamki depozycji z trzech odcinków układu oddechowego: jama ustna-gardło (górne drogi oddechowe), rejon tchawiczo-oskrzelowy oraz obszar płucny wymiany oddechowej, obejmujący małe oskrzeliki i pęcherzyki płucne. Suma tych ułamków daje depozycję sumaryczną w układzie oddechowym. Duże znaczenie miały obliczenia wykonane dla cieczy rozpylanych w badanych nebulizatorach w terapii inhalacyjnej, tj. leków w postaci zawiesin i roztworów oraz soli fizjologicznej. Leki rozważane w pracy mają lokalny charakter działania i są kierowane do oskrzeli, jednak mogą także docierać do niepożądanych miejsc (część oddechowa). Inhalowany aerozol będzie także częściowo osadzał się w górnych

drogach oddechowych. Dawka zdeponowana nie ma działania leczniczego i ulega po połknięciu dezaktywacji w żołądku, ale może wywoływać lokalne efekty uboczne. Zauważono jedynie niewielkie różnice pomiędzy depozycją różnych leków emitowanych przy użyciu danego nebulizatora, natomiast były one większe przy porównaniu działania różnych nebulizatorów. Świadczy to ponownie o dominującej konstrukcji. Największymi ułamkami depozycji w obszarze oskrzeli cechowały się nebulizatory siateczkowe. Niepożądanym miejscem depozycji badanych leków jest obszar wymiany oddechowej, gdyż lek zdeponowany w tym obszarze może wpływać na płyn pęcherzykowy, zawierający surfaktant płucny. Jak wspomniano wcześniej, zmiany właściwości surfaktantu płucnego po kontakcie z aerozolem mają istotny wpływ na fizjologię układu oddechowego. Również w tym przypadku (tj. dla depozycji w obszarze pęcherzyków płucnych) dominującą rolę odgrywa konstrukcja urządzenia. Wobec braku znaczących różnic pomiędzy poszczególnymi lekami dostarczonymi z tego samego nebulizatora. Reasumując, przeprowadzone badania na modelu MPPD pokazują, że wszystkie testowane nebulizatory charakteryzują się stosunkowo dużą depozycją poza obszarem docelowym osadzania się leków. Odnotowano rozbieżności pomiędzy depozycją aerozoli z urządzenia pneumatycznego i siateczkowego. Różnice pomiędzy lekiem oryginalnym i jego odpowiednikiem odtwórczym dostarczonymi z tego samego nebulizatora są mało zauważalne. Otrzymane wyniki obliczeń pozwoliły na oszacowanie stężenia leku w obszarze pęcherzyków płucnych, które wyznaczono jako nominalny stosunek ilości cieczy zdeponowanej do ilości surfaktantu płucnego (przyjęto objętość równą 30 ml). Ze względu na niewielkie wahania otrzymanych wyników, do dalszych badań przyjęto wartość stężenia 0,018 ml dodatku (tj. leku lub modyfikatora)/ml surfaktantu.

Przeprowadzenie doświadczeń oceny jakościowej i ilościowej aerozolu oraz kalkulacji depozycji z zastosowaniem modelu MPPD umożliwiło analizę interakcji zainhalowanych substancji z powierzchnią płuc i wyścielającym je płynem biologicznym. Istnieje kilka możliwości oceny oddziaływań aerozolu na surfaktant płucny. Główne koncepcje są oparte na ocenie zmian dynamicznej aktywności surfaktantu płucnego, uwzględniając modele dynamiki obniżania napięcia powierzchniowego, a na potrzebę tej pracy wskazano dwa podejścia: **(i)** analiza powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz w obecności modelu surfaktantu płucnego LM podczas kompresji oraz **(ii)** analiza powierzchni międzyfazowej w obecności modelu surfaktantu płucnego MPS poddanej sinusoidalnym oscylacjom.

W badaniach wg pierwszego podejścia pokazano wpływ badanych substancji pomocniczych analizując izotermy kompresji oraz współczynnik ściśliwości powierzchni międzyfazowej woda-powietrze w obecności MPS. Monitorowanie kompresji samej

monowarstwy lipidowej pokazuje zmiany w jej organizacji wynikającej z oddziaływań między molekułami fosfolipidu DPPC a cząsteczkami cholesterolu. Potwierdzono także wpływ niektórych substancji pomocniczych leków inhalacyjnych na monowarstwę lipidową. Obecność jonów chlorkowych i sodowych wpływa na stan fizyczny monowarstwy, co jest spowodowane zmianą ładunku powierzchniowego jej składników. Oddziaływanie jonów z molekułami DPPC zmienia przebieg izotermy π -A. Obserwuje się wcześniejszy wzrost ciśnienia powierzchniowego przy mniejszej zmianie powierzchni oraz zanik tzw. obszaru *plateau* (wypłaszczenia). W tym przypadku kationy sodowe najprawdopodobniej tworzą wiązanie z grupami karbonyłowymi DPPC, a aniony chlorkowe tworzą tzw. chmurę jonową wokół grup cholinowych. Również obecność Tweenu 80, powszechnego stabilizatora w produktach inhalacyjnych, wpływa na rozmieszczenie cząsteczek lipidów w monowarstwie i tym samym na przebieg izotermy kompresji. Przeprowadzone badania dowodzą, że dużą rolę odgrywają właściwości powierzchniowo czynne dodatku. Przebieg interakcji sugeruje intensywną wymianę molekuł z filmu powierzchniowego (procesy adsorpcji/desorpcji). Wpływ ten może być korzystny w kontekście biofizycznej aktywności surfaktantu płucnego, ze względu na przesunięcie izotermy kompresji w kierunku obszarów o niższych π i A.

Szukając potwierdzenia tezy o możliwości oddziaływania składników leków inhalacyjnych na powierzchnię międzyfazową zawierającą modelowy surfaktant płucny (model lipidowy), przeprowadzono analizę wpływu zawiesin leków. Monitorując przebieg wartościach π -A odnotowano wyraźną zmianę w organizacji monowarstwy w wyniku oddziaływania między molekułami fosfolipidu lub lipidu obojętnego a składnikami leków inhalacyjnych. Zaobserwowano, że leki zawiesinowe zawierające z budezonid zmniejszają elastyczność monowarstwy LM w fizjologicznie istotnym zakresie ciśnień powierzchniowych (tj. powyżej 30 mN/m), co wiąże się z niezdolnością do tworzenia ciasno upakowanych monowarstw. Sprzyja to również intensywnej wymianie składników filmu powierzchniowego, podobnie jak zauważono wcześniej w obecności Tweenu 80. Wpływ leków zawierających budezonid (API) na monowarstwę może mieć różne źródła. Po pierwsze, zawiesina ta zawiera nierozpuszczalne cząstki steroidu o wielkości mikro- i submikrometrowej, które mogą zostać wbudowane w hydrofobową część monowarstwy (oddziaływanie z łańcuchami). Po drugie w preparacie są obecne aktywne powierzchniowo substancje pomocnicze (służące jako emulgatory), które mogą adsorbować się na granicy faz powietrze-ciecz, przez co dochodzi do ich interakcji z lipidami w monowarstwie. Powoduje to zmniejszenie dystansu między pojedynczymi cząsteczkami, a w wyniku działania sił ściskających (kompresja) następuje wzrost interakcji między cząstkami API i/lub substancjami pomocniczymi. Otrzymane dane pozwoliły również

na wskazanie różnic między lekiem oryginalnym a odtwórczymi, wynikających z różnej zawartości substancji pomocniczych, a być może także z różnic we właściwościach powierzchni cząstek API. Prowadząc obserwacje mikroskopowe BAM stwierdzono, że każdy rodzaj badanego leku wywołał nieco inny przebieg organizacji cząsteczek monowarstwy modelowego surfaktantu płucnego.

W niniejszej pracy przeprowadzono analizę wpływu substancji pomocniczych powszechnie stosowanych w lekach inhalacyjnych, charakteryzujących się właściwościami powierzchniowo czynnymi, tj. chlorku benzalkoniowego oraz Polisorbatu 80, na MPS. Otrzymane dane pokazują, że syntetyczne dodatki o silnych właściwościach powierzchniowo czynnych modyfikują w istotny sposób parametry numeryczne i reologię powierzchni modelowego surfaktantu płucnego. Przebieg zmian jest różny w zależności od użytego dodatku, co sugeruje, że budowa i rodzaj molekuł dodawanego surfaktantu m.in. wielkość łańcucha czy ładunek powierzchniowy odgrywa rolę w interakcjach z cząsteczkami tworzącymi monowarstwę powierzchniową. Stosowane w lekach syntetyczne surfaktanty, takie jak BAC czy Tween 80 oddziałują na surfaktant płucny lecz nie osłabiają w takim stopniu jego dynamicznych właściwości powierzchniowo czynnych, który wskazywałby na możliwe pogorszenie jego funkcji. Kolejnym przykładem zastosowania metody było badanie interakcji lek inhalacyjny-modelowy surfaktant płucny. Już spadek samej wartości *quasi*-równowagowej napięcia powierzchniowego, który rzutował na zmiany parametrów charakteryzujących pętlę histerezy, świadczył o istnieniu oddziaływań. Przebieg obserwowanych zmian jest różny w zależności od leku, co sugeruje, że skład formułacji i budowa molekuł odgrywa rolę w interakcjach z cząsteczkami filmu powierzchniowego. Zauważono, że większość leków w wyniku oddziaływań z warstwą modelowego surfaktantu płucnego przyczyniła się do znaczącej zmiany kształtu histerezy napięcia powierzchniowego w sposób ograniczający zakres jej pola. Świadczy to o zmniejszeniu energii powierzchniowej przeznaczonej m.in. na procesy wymiany masy i hydrodynamicznego procesu oczyszczania pęcherzyka płucnego z zaadsorbowanych elementów. Takie zmiany, mogą mieć wymiar utrudnień w poprawnym, fizjologicznym działaniu i upośledzenia niektórych funkcji surfaktantu płucnego. Interakcje pozostałych leków z MPSem skutkowały wzrostem stabilności pętli histerezy, co sprzyjało zmianie kształtu histerezy i w konsekwencji rozszerzeniu jej pola. Takie zmiany mają odwrotny skutek i sprzyjają kumulacji energii powierzchniowej. Obserwowane efekty w układzie MPS zależą od rodzaju leku nawet przy takim samym stężeniu substancji aktywnej. Przedstawione badania mogą stanowić początek do dyskusji na temat różnic między lekami generycznymi a produktami oryginalnymi, na co starano się zwrócić uwagę w niniejszej pracy.

Przeprowadzone badania na dobrze znanych substancjach pomocniczych oraz na mieszaninach stanowiących formułację farmaceutyków inhalacyjnych dały podstawy do skorzystania z niniejszej metody do analizy związków pochodzenia naturalnego cechujących się potencjałem zastosowania w lekach. Jednakże interpretacja takich pomiarów była obarczona szeregiem trudności m.in. związanymi ze złożonością składnikową mieszanin. Jest to związane z różnorodnością czynników wpływających jednocześnie na właściwości fizykochemiczne modyfikatorów oraz ich zachowanie w mieszaninie z surfaktantem. Przedstawiona charakterystyka dynamiczna powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz w obecności MPS oraz wybranych modyfikatorów napięcia powierzchniowego pokazała, że obecność escyny i leucyny wpływa na kształt histerezy napięcia powierzchniowego, która ulega rozszerzeniu. Zauważono, że dodatek substancji pochodzenia naturalnego sprzyja wzroście stabilności układu, a wzrost ten jest coraz większy wraz z przyspieszaniem oscylacji powierzchniowej. Obie substancje wykazywały podobne tendencje a różnice wynikające z zawartości są niewielkie w przypadku escyny a zauważalne w przypadku leucyny. Wzrost stabilności histerezy oraz energii powierzchniowej, będącej odpowiednio wynikiem wzrostu kryteriów *SI* oraz *HAn*, stanowi pozytywny efekt interakcji pomiędzy molekułami potencjalnej substancji pomocniczej a MPS. Biorąc pod uwagę wszystkie przedstawione dane, można stwierdzić, że żadna z substancji modyfikujących napięcie powierzchniowe w badanym zakresie stężeń (tj. leucyna i escyna) nie osłabiła natywnych dynamicznych właściwości powierzchniowych modelowego surfaktantu płucnego w sposób, który mógłby wskazywać na możliwe pogorszenie jego funkcji *in vivo*. W kontekście potencjalnego zastosowania leucyny i escyny jako zamienników syntetycznych surfaktantów w lekach inhalacyjnych dokonano, obok ogólnej oceny ich bezpieczeństwa, ocenę porównawczą z rozpowszechnionymi substancjami tj. BAC czy substancje z grupy polisorbatów. Porównując wyniki, zauważono bliźniaczo podobne przebiegi zmian pomiędzy BAC a escyną. Jednakże ilościowa analiza kryteriów jednoznacznie wskazuje na mniejszą ingerencję we właściwości dynamiczne modelowego filmu przy zastosowaniu substancji pochodzenia naturalnego.

Całościowa analiza zależności pomiędzy parametrami ϕ i *SI*, dokonana na przykładzie wpływu biopolimerów na surfaktant płucny ukazała, że są one ściśle powiązane z *HAn* i z kształtem pętli histerezy. *SI* to parametr ściśle związany z amplitudą zmian napięcia powierzchniowego w pętli histerezy i wyznacza maksymalny jej zakres w ten sposób wpływając na kształt. Wskaźnik ten wynika z dynamicznych właściwości powierzchniowych i w przypadku modyfikatorów lepkości jest on bardziej zależny od sprężystości powierzchniowej niż składowej lepkościowej. Na podstawie otrzymanych danych opracowano ogólne tendencje

dotyczące przebiegu interakcji pomiędzy polisacharydami a MPS. W pracy wykazano, że żaden z trzech badanych związków nie zmieniał dynamicznych właściwości międzyfazowych MPS, gdy był stosowany w stężeniach odpowiednich do oczekiwanej dawki zdeponowanej w płucach oszacowanej przy pomocy modelu matematycznego. Stąd można przyjąć założenie, że każdy z tych biopolimerów można uznać za bezpieczny dodatek do płynnych preparatów do nebulizacji, gdy jest stosowany do wpływania na rozkład wielkości aerozolu generowanego w nebulizatorach i poprawiania depozycji w płucach. Wykazano, że możliwe oddziaływanie wdychanych związków na powierzchnię płuc może wynikać z właściwości fizykochemicznych danego polisacharydu, ale także może zależeć od obecności NaCl. Jednocześnie, zastosowanie modyfikatorów lepkości pochodzenia naturalnego może pomóc w dostosowaniu właściwości wdychanego aerozolu leczniczego emitowanego z nebulizatorów, bez modyfikacji konstrukcji inhalatora, a tym samym może być wykorzystane do optymalizacji dostarczania aerozolu do układu oddechowego.

Podsumowując istotnym wydaje się połączenie wiedzy z inżynierii chemicznej i inżynierskiego podejścia do procesów fizjologicznych z wiedzą o funkcjonowaniu systemu i konsekwencjach zdrowotnych. W aktywnej fazie oddychania (wdech) energia wydatkowana jest na rozprężenie płuc (proces ekspansji powierzchni) w celu wymuszenia przepływu powietrza do płuc. Częściowo energia ta pokrywa zapotrzebowanie na pokonanie sił pochodzących od napięcia powierzchniowego w pęcherzykach płucnych. Z kolei, w biernej fazie cyklu oddechowego (wydech) powstaje nadwyżka energii w układzie (w tym układu energii powierzchniowej), co prowadzi do histerezy napięcia powierzchniowego. Zgodnie z przedstawionymi teoriami, skumulowana energia może zostać częściowo przekształcona w zjawiska hydrodynamiczne np. efekty Marangoniego, przyczyniające się do wymiany masy w płucach tj. wymiany gazowej czy procesów *klirensu*. Stąd, porównawcza ilościowa ocena wpływu wybranych substancji zaadsorbowanych, w tym leków, na powierzchni międzyfazowej zawierającej modelowy surfaktant płucny dostarcza szeregu informacji istotnych z punktu bezpieczeństwa terapii.

12. Wnioski końcowe

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było przeanalizowanie procesu powstawania aerozolu w nebulizatorach medycznych oraz ilościowe scharakteryzowanie wpływu konstrukcji urządzenia atomizującego i właściwości fizykochemicznych cieczy rozpylanej na parametry wdychanej mgły, decydujące o depozycji inhalowanego aerozolu w układzie oddechowym. W pracy zaproponowano także sposób modyfikacji właściwości aerozolu przez dodatek substancji wpływających na właściwości cieczy, co pozwala na bardziej precyzyjne kierowanie aerozolu do wybranych obszarów dróg oddechowych. Dodatkowo, oceniono bezpieczeństwo dla zdrowia ww. składników poprzez przebadanie ich oddziaływań z modelowym surfaktantem płucnym.

W przeprowadzonych badaniach położono nacisk na:

- szczegółową charakterystykę właściwości fizykochemicznych wyselekcjonowanych płynów będących substancjami modelowymi, lekami inhalacyjnymi lub substancjami pochodzenia naturalnego posiadającymi zdolność do modyfikacji napięcia powierzchniowego lub lepkości;
- charakterystykę aerozolu wytwarzanego przez wybrane nebulizatory i prowadzonego w nich procesu atomizacji (m.in. wpływ konstrukcji urządzenia i właściwości cieczy na wydajność emisji i rozkład wielkości kropeł, stabilność procesu w czasie, zmianę temperatury cieczy, rozpad agregatów cząstek leku, objętość rezydualną),
- obliczenie ilości aerozolu osadzającego się w różnych obszarach układu oddechowego i wykorzystanie wyników w badaniach *in vitro* dotyczących wpływu inhalowanych substancji na surfaktant płucny.

W wyniku realizacji pracy doktorskiej:

- udowodniono, że odpowiednie zaprojektowanie procesu atomizacji przebiegającego w nebulizatorach poprzez modyfikację właściwości fizykochemicznych rozpraszanej cieczy (lepkości, napięcia powierzchniowego, przewodności elektrolitycznej), przy uwzględnieniu zasady działania oraz budowy danego nebulizatora, umożliwia wzrost efektywności depozycji inhalowanego aerozolu w płucach;
- wykazano, że zasada działania i konstrukcja nebulizatora wpływają silniej na parametry emitowanego aerozolu niż właściwości fizykochemiczne atomizowanych cieczy;
- wykazano konieczność testowania konkretnych układów lek (lub inna substancja)-nebulizator. Takie podejście oraz zindywidualizowana formuła ciekłych preparatów do inhalacji (roztworów lub zawiesin) zapewnia lepszą kontrolę jakości mgły leczniczej, potencjalnie zwiększając efektywność aerozoloterapii;

- zaproponowano i zastosowano metodykę pomiarową umożliwiającą dynamiczną analizę wielkości kropel aerozolu tuż przy wyjściu z ustnika w trakcie całego procesu nebulizacji, co stanowi przewagę nad metodami uśredniającymi pomiar właściwości aerozolu w czasie (m.in. metoda farmakopealna);
- wykazano różnice pomiędzy aerozolem wytwarzanym w wyniku atomizacji leków oryginalnych i odtwórczych, zwracając uwagę na istotny wpływ rodzaju i stężenia substancji pomocniczych obecnych w formulacji leczniczej;
- wyjaśniono potencjalne źródła różnic we właściwościach aerozoli generowanych w nebulizatorach pneumatycznych i membranowych, wskazując najkorzystniejsze warunki prowadzenia procesu atomizacji w każdym z ww. urządzeń;
- zaproponowano kilka biozgodnych substancji pochodzenia naturalnego modyfikujących napięcie powierzchniowe oraz lepkość, które mogą być użyte w roli dodatków zmieniających właściwości aerozolu i wpłynąć na efektywność aeroszoloterapii. Oceniono ich bezpieczeństwo dla zdrowia wykonując pomiary *in vitro* oddziaływań fizykochemicznych ze składnikami surfaktantu płucnego w warunkach dynamicznych symulujących cykl oddechowy.

Tematyka pracy doktorskiej lokuje się na pograniczu inżynierii chemicznej i procesowej (analiza układów rozproszonych i procesu atomizacji cieczy, wraz z elementami fizykochemii powierzchni w zakresie oddziaływania substancji adsorbujących się na powierzchni ciecz-gaz) i medycyny. W taki sposób wpisuje się ona we współczesne światowe trendy rozwojowe dyscypliny naukowej „inżynieria chemiczna”, która coraz częściej znajduje zastosowanie w analizie ilościowej procesów przebiegających w organizmie oraz wielu urządzeniach medycznych lub sztucznych narządach (np. sztuczna nerka, serce, wątroba, naczynia krwionośne, itd.). Zastosowanie narzędzi inżynierii chemicznej na etapie projektowania metodyki pomiarowej oraz analizy danych pozwoliło w niniejszej pracy na sformułowanie wniosków, które poszerzają aktualny stan wiedzy z zakresu inżynierskich aspektów aeroszoloterapii.

BIBLIOGRAFIA

1. Lefebvre AH, McDonnell VG. Atomization and Sprays. 2. wyd. CRC Press; 2017. 71–104 s.
2. Rothe H, Fautz R, Gerber E, Neumann L, Rettinger K, Schuh W, i in. Special aspects of cosmetic spray safety evaluations: Principles on inhalation risk assessment. T. 205, Toxicology Letters. 2011. s. 97–104.
3. Foo MY, Cheng YS, Su WC, Donovan MD. The influence of spray properties on intranasal deposition. J Aerosol Med: Deposition, Clearance, and Effects in the Lung. 2007;20(4):495–508.
4. Sosnowski TR, Rapiejko P, Sova J, Dobrowolska K. Impact of physicochemical properties of nasal spray products on drug deposition and transport in the pediatric nasal cavity model. Int J Pharm. 2020;574.
5. Le Brun PPPH, de Boer AH, Heijerman HGM, Frijlink HW. A review of the technical aspects of drug nebulization. Pharm World Sci. 2000;22(3):75–81.
6. Pirożynski M, Sosnowski TR. Inhalation devices: from basic science to practical use, innovative vs generic products. T. 13, Exp Opin Drug Deliv. Taylor and Francis Ltd; 2016. s. 1559–71.
7. Chandra S, Fauchais P. Formation of solid splats during thermal spray deposition. W: Journal of Thermal Spray Technology. 2009. s. 148–80.
8. Heo J, Choi M, Hong J. Facile Surface Modification of Polyethylene Film via Spray-Assisted Layer-by-Layer Self-Assembly of Graphene Oxide for Oxygen Barrier Properties. Sci Rep. 2019;9(1).
9. Hassani-Gangaraj SM, Moridi A, Guagliano M. Critical review of corrosion protection by cold spray coatings. T. 31, Surface Engineering. Maney Publishing; 2015. s. 803–15.
10. Biswas R, Hanania NA, Sabharwal A. Factors Determining in Vitro Lung Deposition of Albuterol Aerosol Delivered by Ventolin Metered-Dose Inhaler. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv. 2017;30(4):256–66.
11. Drzymała J. Mineral Processing. Foundations of Theory and Practice of Minerallurgy. Wrocław: Publishing House of Wrocław University of Technology; 2007.
12. Wang LK, Taricska JR, Hung Y-T, Eldridge JE, Hung Li K. Wet and Dry Scrubbing. W: Air Pollution Control Engineering. Totowa, USA: Humana Press Inc; 2004. s. 197–3005.
13. Grant G, Brenton J, Drysdale D. Fire suppression by water sprays. PECS. 2000;26:79–130.

14. Woo MW, Bhandari B. Spray Drying for Food Powder Production. W: Handbook of Food Powders. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; 2013. s. 29–56.
15. Krishnan S, Kshirsagar AC, Singhal RS. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. Carbohydr Polym. 2005;62(4):309–15.
16. Alvarez VA, Muñoz V, Gonzalez JS, Martinez MA. Functional Textiles for Skin Care by Active Substance Encapsulation. J. Text. Eng. Fash. Technol. 2017;2(6).
17. Gradon L, Sosnowski TR. Formation of particles for dry powder inhalers. T. 25, Advanced Powder Technology. Elsevier; 2014. s. 43–55.
18. Nani Guarieiro L, Nani Guarieiro AL. Vehicle Emissions: What Will Change with Use of Biofuel? W: Fang Z, redaktor. Biofuels - Economy, Environment and Sustainability. InTech; 2013.
19. Goode ML, Fink JB, Dhand R, Tobin MJ. Improvement in Aerosol Delivery with Helium-Oxygen Mixtures during Mechanical Ventilation. T. 163, Am J Respir Crit Care Med. 2001.
20. Dolovich MB, Ahrens RC, Hess DR, Anderson P, Dhand R, Rau JL, i in. Device selection and outcomes of aerosol therapy: Evidence-based guidelines: American College of Chest Physicians/American College of Asthma, Allergy, and Immunology. Chest. 2005;127(1):335–71.
21. Sosnowski T. Aerozole wziewne i inhalatory. Warszawa: WICHiP PW; 2012.
22. Vecellio L, Abdelrahim ME, Montharu J, Galle J, Diot P, Dubus JC. Disposable versus reusable jet nebulizers for cystic fibrosis treatment with tobramycin. Journal of Cystic Fibrosis. 2011;10(2):86–92.
23. Park C, Hayes D, Mansour H. Pulmonary inhalation aerosols for targeted antibiotics drug delivery. Eur Pharm Rev. 2011;16(1):32–6.
24. Vardakas KZ, Voulgaris GL, Samonis G, Falagas ME. Inhaled colistin monotherapy for respiratory tract infections in adults without cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. T. 51, Int J Antimicrob Agents. Elsevier B.V.; 2018. s. 1–9.
25. Restrepo RD. Use of Inhaled Anticholinergic Agents in Obstructive Airway Disease. Respir Care. 2007;52(7):833–51.
26. McElroy MC, Kirton C, Gliddon D, Wolff RK. Inhaled biopharmaceutical drug development: Nonclinical considerations and case studies. T. 25, Inhal Toxicol. 2013. s. 219–32.

27. Akamine S, Katayama Y, Higenbottam T, Lock T. Developments in Inhaled Immunosuppressive Therapy for the Prevention of Pulmonary Graft Rejection. *BioDrugs*. 1998;9(1):49–59.
28. Jeyananthan V, Afkhami S, D’Agostino MR, Zganiacz A, Feng X, Miller MS. Differential Biodistribution of Adenoviral-Vectored Vaccine Following Intranasal and Endotracheal Deliveries Leads to Different Immune Outcomes. *Front Immunol*. 2022;13:1–9.
29. Liao Y, Li Z, Zhou Q, Sheng M, Qu Q, Shi Y. Saponin surfactants used in drug delivery systems: A new application for natural medicine components. T. 603, *Int J Pharm*. Elsevier B.V.; 2021.
30. Misra A, Hickey AJ, Rossi C, Borchard G, Terada H, Makino K. Inhaled drug therapy for treatment of tuberculosis. T. 91, *Tuberculosis*. 2011. s. 71–81.
31. Willis L, Hayes D, Mansour HM. Therapeutic liposomal dry powder inhalation aerosols for targeted lung delivery. T. 190, *Lung*. 2012. s. 251–62.
32. Decramer M, Janssens W. Mucoactive therapy in COPD. T. 19, *European Respiratory Review*. 2010. s. 134–40.
33. Brand P, Schulte M, Wencker M, Herpich CH, Klein G, Hanna K, i in. Lung deposition of inhaled α 1-proteinase inhibitor in cystic fibrosis and α 1-antitrypsin deficiency. *Eur Resp J*. 2008;34(2):354–60.
34. Gross N, Tashkin D, Miller R, Oren J, Coleman W, Linberg S. Inhalation by Nebulization of Albuterol-Ipratropium Combination (Dey Combination) Is Superior to Either Agent Alone in the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Combination Therapy in COPD. T. 65, *Respiration*. 1998.
35. Munos B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. T. 8, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009. s. 959–68.
36. Williams SJ, Winner SJ, Clark T. Comparison of inhaled and intravenous terbutaline in acute severe asthma. *Thorax*. 1981;36:629–31.
37. Patton JS, Byron PR. Inhaling medicines: Delivering drugs to the body through the lungs. T. 6, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007. s. 67–74.
38. Shaw RJS, Waller JF, Hetzel MR, Clark TJH. Do oral and inhaled terbutaline have different effects on the lung? T. 76, *Br. 3. Dis. Chest*. 1982.
39. Dahl R. Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. T. 100, *Respir Med*. 2006. s. 1307–17.

40. Newhouse M. Drug delivery: Pulmonary delivery. Dekker M, redaktor. New York: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; 2002.
41. Patton JS, Fishburn CS, Weers JG. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. T. 1, Proceed Am Thoracic Soc. 2004. s. 338–44.
42. Rau JL, Faarc R. The Inhalation of Drugs: Advantages and Problems. *Respir Care*. 2005;50(3):367–82.
43. Gagnadoux F, Hureauux J, Vecellio L, Urban T, Le Pape A, Valo I, i in. Aerosolized chemotherapy. T. 21, *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2008. s. 61–70.
44. Lewis JF, Jobe AH, Tabor B, Ikegami M, Aerosolized T. Aerosolized surfactant treatment of preterm lambs. *Physiol J*. 1991;869–79.
45. Robertson B, Halliday HL. Principles of surfactant replacement. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1408:346–61.
46. Shah S. Exogenous surfactant: Intubated present, nebulized future? *World Journal of Pediatrics*. 2011;7(1):11–5.
47. Gao J. Vaccination with CanSinoBIO's inhaled COVID-19 vaccine has begun in China. *J Biosaf Biosecur*. 2022;4(2):163.
48. WHO. 2023.
49. Pirożyński M. ABC nebulizacji. *Via Medica*; 2015.
50. Kuempel ED, Sweeney LM, Morris JB, Jarabek AM. Advances in Inhalation Dosimetry Models and Methods for Occupational Risk Assessment and Exposure Limit Derivation. T. 12, *J Occup Environ Hyg*. Taylor and Francis Inc.; 2015. s. S18–40.
51. Fernández Tena A, Casan Clarà P. Deposition of Inhaled Particles in the Lungs. *Arch Bronco*. 2012;48(7):240–6.
52. Hofmann W. Modelling inhaled particle deposition in the human lung-A review. T. 42, *J Aerosol Sci*. Elsevier Ltd; 2011. s. 693–724.
53. Hu J, Zhang R, Beng H, Deng L, Ke Q, Tan W. Effects of flow pattern, device and formulation on particle size distribution of nebulized aerosol. *Int J Pharm*. 2019;560:35–46.
54. Dennis J. Nebulizer Efficiency: Modeling Versus In Vitro Testing. *Respir Care*. 2007;52(8):984–8.
55. McCallion O, Taylor K, Thomas M, Taylor A. Nebulization of fluids of different physicochemical properties with air-jet and ultrasonic nebulizers. *Pharm Res*. 1995;12(11):1682–8.

56. Beck-Broichsitter M, Knuedeler MC, Seeger W, Schmehl T. Controlling the droplet size of formulations nebulized by vibrating-membrane technology. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;87(3):524–9.
57. Broniarz-Press L, Sosnowski TR, Matuszak M, Ochowiak M, Jabłczyńska K. The effect of shear and extensional viscosities on atomization of Newtonian and non-Newtonian fluids in ultrasonic inhaler. *Int J Pharm.* 2015;485(1–2):41–9.
58. Eedara BB, Alabsi W, Encinas-Basurto D, Polt R, Ledford JG, Mansour HM. Inhalation delivery for the treatment and prevention of covid-19 infection. *T. 13, Pharmaceutics.* MDPI; 2021.
59. Vecellio L. The mesh nebuliser: a recent technical innovation for aerosol delivery. *Breathe.* 2006;2(3):252–60.
60. Dave VS, Saoji SD, Raut NA, Haware R V. Excipient variability and its impact on dosage form functionality. *J Pharm Sci.* 2015;104(3):906–15.
61. Jakoniuk D. Biorównoważność w ocenie skuteczności terapeutycznej leków generycznych. *Biorównoważność.* 2009;65(12):834–8.
62. Chen L, Zhao X. Characterization of air flow and lung function in the pulmonary acinus by fluid-structure interaction in idiopathic interstitial pneumonias. *PLoS One.* 2019;14(3).
63. Dekker E. Transition between laminar and turbulent flow in human trachea. *Am Physiolog Soc.* 1961;1060–4.
64. Moskal A, Sosnowski TR. Dynamics of aerosol pulse in a simplified mouth-throat geometry and its significance for inhalation drug delivery. *Chem Proc Eng.* 2009;30:545–58.
65. Sosnowski TR, Moskal A, Gradoń L. Mechanims of aerosol particle deposition in the oro-pharynx under non-steady airflow. *Ann Occup Hyg.* 2007;51(1):19–25.
66. Maggiore SM, Brochard L. Pressure-volume curve: methods and meaning. *Minerva Anesthesiol.* 2001;67:228–65.
67. Escolar JD, Escolar A. Lung histeresis: a morphological view. *Histol Histopathol.* 2004;19:159–66.
68. Wüstneck R, Perez-Gil J, Wüstneck N, Cruz A, Fainerman VB, Pison U. Interfacial properties of pulmonary surfactant layers. *Adv Colloid Interface Sci.* 2005. s. 33–58.
69. Gradoń L, Podgórski A. Hydrodymical model of pulmonary clearance. *Chemcol Engineering Sewwe.* 1989;44(3):741–9.
70. Weibel E. *Morphometry of the human lung.* Berlin-New York: Springer; 1963.

71. Hess D. Nebulizers: Principles and Performance. *Respir Care*. 2000;45(6):609–12.
72. Sosnowski TR. Particles on the lung surface - physicochemical and hydrodynamic effects. T. 36, *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2018. s. 1–9.
73. Yeh HC, Schum GM. Models of human lung airways and their application to inhaled particle deposition. *Bull Math Biol*. 1980;42:461–80.
74. Choi J Il, Kim CS. Mathematical analysis of particle deposition in human lungs: An improved single path transport model. *Inhal Toxicol*. 2007;19(11):925–39.
75. Williams RO, Carvalho TC, Peters JI. Influence of particle size on regional lung deposition - What evidence is there? T. 406, *Int J Pharm*. 2011. s. 1–10.
76. Sosnowski T, Dobrowolska K. Wybrane zagadnienia fizykochemii koloidów w procesach inhalacyjnego dostarczania leków do płuc. *Wiad Chem*. 2021;75(9):1375–93.
77. Rostami AA. Computational modeling of aerosol deposition in respiratory tract: A review. T. 21, *Inhal Toxicol*. 2009. s. 262–90.
78. Zeng X, Martin G, Marriott C. Medicinal aerosols. W: Zeng XM, Martin GP, Marriott C., redaktorzy. *Particulate Interactions in Dry Powder Formulations for Inhalation*. New York: Taylor & Francis; 2001. s. 65–102.
79. Gonda I. Targeting by deposition. Hickey A. *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2004. s. 65–88.
80. Horsfield K, Cumming G. Morphology of the bronchial tree in man. *J Appl Physiol*. 1968;24:373–83.
81. O'Donnell K, Smyth H. Macro- and microstructure of the airways for drug delivery. W: Hickey A, Smyth H. *Controlled pulmonary drug delivery*. New York: Springer; 2011. s. 1–19.
82. Lourenco R, Cotromanes E. Clinical aerosols. I. Characterization of aerosols and their diagnostic uses. *Arch Intern Med*. 1982;142:2163–72.
83. Newhouse M, Sanchis J, Bienenstock J. Lung defense mechanisms. *Engl J Med*. 1976;295:990–8.
84. Heyder J. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. T. 1, *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2004. s. 315–20.
85. Widdicombe JH, Bastacky SJ, Wu DXY, Lee CY. Regulation of depth and composition of airway surface liquid. T. 10, *Eur Resp J*. 1997. s. 2892–7.
86. Patton JS. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. T. 19, *Adv Drug Deliv Rev*. 1996.

87. Smith DJ, Gaffney EA, Blake JR. A viscoelastic traction layer model of muco-ciliary transport. *Bull Math Biol.* 2007;69(1):289–327.
88. Edsbäcker S, Johansson CJ. Airway selectivity: An update of pharmacokinetic factors affecting local and systemic disposition of inhaled steroids. T. 98, *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology.* 2006. s. 523–36.
89. Majid H, Madl P, Khan A. Lung deposition predictions of airborne particles and the emergence of contemporary diseases Part-I. *The Health.* 2011;2(2):51–9.
90. King M, Brock G, Lundell C, Lun- C. Clearance of mucus by simulated cough. *Physiol J.* 1985;1776–83.
91. Zahm JM, King M, Duvivier C, Pierrot D, Girod S, Puchelle E, i in. Role of simulated repetitive coughing In mucus clearance. T. 4, *Eur Reeplr J.* 1991.
92. ICRP Press. International Commission on Radiological Protection (ICRP). *Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection.* Oxford: Pergamon Press; 1994.
93. Hansen J, Ampaya E. Human air space shapes, sizes, areas, volumes. *J Appl Physiol.* 1975;38:990–5.
94. Takano H, Nishida N, Itoh M, Hyo N, Majima Y. Inhaled Particle Deposition in Unsteady-State Respiratory Flow at a Numerically Constructed Model of the Human Larynx. T. 19, *J Aerosol Med.* 2006.
95. Dorosz A, Urbankowski T, Zieliński K, Michnikowski M, Krenke R, Moskal A. Modeling of Inhalation Profiles Through Dry Powder Inhaler in Healthy Adults and Asthma Patients As a Prerequisite for Further In Vitro and In Silico Studies. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2022;35(2):91–103.
96. Grgic B, Finlay WH, Heenan AF. Regional aerosol deposition and flow measurements in an idealized mouth and throat. *J Aerosol Sci.* 2004;35(1):21–32.
97. Cheng YS, Zhou Y, Chen BT. Particle deposition in a cast of human oral airways. *Aerosol Sci Tech.* 1999;31(4):286–300.
98. Sosnowski T, Moskal A, Gradoń L. Dynamics of oropharyngeal aerosol transport and deposition with the realistic flow pattern. *Inhalation Toxicology.* 2006. s. 773–80.
99. Swift D. The behavior of aerosols in the human nasal or oral airways, including the ultrafine size region. W: Marijnissen J, Gradoń L. *Aerosol.* Dordrecht–Boston–London: Kluwer Academic Publishers; 1996.
100. Asgharian B, Hofmann W, Bergmann R. Particle deposition in a multiple-path model of the human lung. *Aerosol Sci Tech.* 2001;34(4):332–9.

101. Asgharian B, Price OT, Hofmann W. Prediction of particle deposition in the human lung using realistic models of lung ventilation. *J Aerosol Sci.* 2006;37(10):1209–21.
102. Cheng KH, Swift DL. Calculation of total deposition fraction of ultrafine aerosols in human extrathoracic and intrathoracic regions. *Aerosol Sci Tech.* 1995;22(2):194–201.
103. Koblinger L, Hofmann W. Analysis of human lung morphometric data for stochastic aerosol deposition calculations. *Phys Med Biol.* 1985;30:541–56.
104. Raabe O, Yeh H, Schum G, Phalen R. Tracheobronchial Geometry: Human, Dog, Rat, Hamster. W: Lovelace Foundation Report LF-53. Albuquerque; 1976.
105. James A. Lung dosimetry. W: Nazaroff W, Nero A, redaktorzy. Radon and Its Decay Products in Indoor Air. New York: JohnWiley; 1988. s. 59–309.
106. Haefeli-Bleuer B, Weibel ER. Morphometry of the Human Pulmonary Acinus. T. 220, *The Anatomical Record.* 1988.
107. Yeh HC, Schum GM. Models of human lung airways and their application to inhaled particle deposition. *Bull Math Biol.* 1980;42:461–80.
108. Tena AF, Casan P, Marcos A, Barrio R, Blanco E. Analysis of the fluid dynamic characteristics of the obstructive pulmonary diseases using a three-dimensional CFD model of the upper conductive zone of the lung airways. *SIMBIO.* 2011;1–6.
109. De Backer JW, Vos WG, Gorlé CD, Germonpré P, Partoens B, F.L.Wuyts, i in. Flow analyses in the lower airways: Patient-specific model and boundary conditions. *Med Eng Phys.* 2008;30(7):872–9.
110. Jayaraju ST, Brouns M, Verbanck S, Lacor C. Fluid flow and particle deposition analysis in a realistic extrathoracic airway model using unstructured grids. *J Aerosol Sci.* 2007;38(5):494–508.
111. Moskal A, Gradoń L. Temporary and spatial deposition of aerosol particles in the upper human airways during breathing cycle . T. 33, *Aerosol Sci.* 2002.
112. Lopez-Rodriguez E, Pérez-Gil J. Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: From biophysics to therapy. T. 1838, *Biochim Biophys Acta Biomembr.* Elsevier; 2014. s. 1568–85.
113. Sosnowski T. Efekty dynamiczne w układach ciecz-gaz z aktywną powierzchnią międzyfazową. Warszawa: OW. Pol. Warszawskiej; 2006.
114. Clements JA, Brown ES, Rudolph Johnson AP, Johnson RP. Pulmonary Surface Tension and the Mucus Lining of the Lungs: Some Theoretical Considerations. *Physiol J.* 1958;262–8.

115. Clements J, Hustead R, Johnson R. Pulmonary surface tension and alveolar stability. *J Appl Physiol.* 1961;16:444–50.
116. Gradoń L, Podgórski A, Sosnowski TR. Experimental and Theoretical Investigations of Transport Properties of DPPC Monolayer. *J Aerosol Med.* 1996;9(3):357–67.
117. Harishchandra RK, Saleem M, Galla HJ. Nanoparticle interaction with model lung surfactant monolayers. *J R Soc Interface.* 2010;7(SUPPL. 1).
118. Dobrowolska K, Jabłczyńska K, Kondej D, Sosnowski TR. Interactions of insoluble micro- and nanoparticles with the air-liquid interface of the model pulmonary fluids. *Physicochem Probl Mi.* 2018;54(1):151–62.
119. Sosnowski TR, Kubski P, Wojciechowski K. New experimental model of pulmonary surfactant for biophysical studies. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2017;519:27–33.
120. Parra E, Pérez-Gil J. Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films. *T. 185, Chem. Phys. Lipids.* 2015. s. 153–75.
121. Zuo YY, Veldhuizen RAW, Neumann AW, Petersen NO, Possmayer F. Current perspectives in pulmonary surfactant - Inhibition, enhancement and evaluation. *T. 1778, Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2008. s. 1947–77.
122. Hidalgo A, Cruz A, Pérez-Gil J. Barrier or carrier? Pulmonary surfactant and drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;95:117–27.
123. Zhang K, Liu L, Bai T, Guo Z. Interaction between hydrophobic Au nanoparticles and pulmonary surfactant (DPPC) monolayers. *J Biomed Nanotechnol.* 2018;14(3):526–35.
124. Casals C. Role of Surfactant Protein a (SP-A)/Lipid Interactions for SP-A Functions in the Lung. *Fetal Pediatr Pathol.* 2001;20(4):249–68.
125. Serrano AG, Pérez-Gil J. Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system. *T. 141, Chem. Phys. Lipids.* 2006. s. 105–18.
126. Baumgart F, Ospina OL, Mingarro I, Rodríguez-Crespo I, Pérez-Gil J. Palmitoylation of pulmonary surfactant protein SP-C is critical for its functional cooperation with SP-B to sustain compression/expansion dynamics in cholesterol-containing surfactant films. *Biophys J.* 2010;99(10):3234–43.
127. Perez-Gil J, Weaver TE. Pulmonary surfactant pathophysiology: Current models and open questions. *T. 25, Physiology.* 2010. s. 132–41.

128. Lachmann B, Grossmann G, Nilsson R, Robertson B. Lung mechanics during spontaneous ventilation in premature and fullterm rabbit neonates. *Respir Physiol.* 1979;38:283–302.
129. Ross M, Krol S, Janshoff A, Galla HJ. Kinetics of phospholipid insertion into monolayers containing the lung surfactant proteins SP-B or SP-C. *Eur Biophys. J.* 2002; s. 52–61.
130. Walters RW, Jenq RR, Hall SB. Distinct Steps in the Adsorption of Pulmonary Surfactant to an Air-Liquid Interface. *Biophys J.* 2000;78:257–66.
131. Marsh D, King MD. Prediction of the critical micelle concentrations of mono- and diacyl phospholipids. *Chem Phys Lipids.* 1986;42:271–7.
132. Marsh D. Thermodynamics of phospholipid self-assembly. *Biophys J.* 2012;102(5):1079–87.
133. Haller T, Dietl P, Stockner H, Frick M, Mair N, Tinhofer I, i in. Tracing surfactant transformation from cellular release to insertion into an air-liquid interface. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:1009–15.
134. Sánchez-Barbero F, Strassner J, García-Cañero R, Steinhilber W, Casals C. Role of the degree of oligomerization in the structure and function of human surfactant protein A. *J Biol Chem.* 2005;280(9):7659–70.
135. Baoukina S, Monticelli L, Amrein M, Tieleman DP. The molecular mechanism of monolayer-bilayer transformations of lung surfactant from molecular dynamics simulations. *Biophys J.* 2007;93(11):3775–82.
136. Klenz U, Saleem M, Meyer MC, Galla HJ. Influence of lipid saturation grade and headgroup charge: A refined lung surfactant adsorption model. *Biophys J.* 2008;95(2):699–709.
137. Schürch D, Ospina OL, Cruz A, Pérez-Gil J. Combined and independent action of proteins SP-B and SP-C in the surface behavior and mechanical stability of pulmonary surfactant films. *Biophys J.* 2010;99(10):3290–9.
138. Boonman A, Machiels FHJ, Snik AFM, Egberts J. Squeeze-Out from Mixed Monolayers of Dipalmitoylphosphatidylcholine and Egg Phosphatidylglycerol. *J Colloid Interface Sci.* 1987;120(2):456–67.
139. Lykema J. Fundamentals of interface and colloid science. London-San Diego: Academic Press; 2005.
140. Dutkiewicz ET. Fizykochemia powierzchni. Warszawa : WNT; 1998.
141. Tomassi W, Jankowska H. Chemia fizyczna. Warszawa: WNT; 1980.

142. Guzmán E, Liggieri L, Santini E, Ferrari M, Ravera F. Effect of hydrophilic and hydrophobic nanoparticles on the surface pressure response of DPPC monolayers. *J Phys Chem C*. 2011;115(44):21715–22.
143. Kondej D, Sosnowski TR. Interfacial rheology for the assessment of potential health effects of inhaled carbon nanomaterials at variable breathing conditions. *Sci Rep*. 2020;10(1).
144. Ładniak A, Jurak M, Wiącek AE. Langmuir monolayer study of phospholipid DPPC on the titanium dioxide–chitosan–hyaluronic acid subphases. *Adsorption*. 2019;25(3):469–76.
145. Xie B, Hao C, Sun R. Effect of fluoxetine at different concentrations on the adsorption behavior of Langmuir monolayers. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020;1862(11):183418.
146. Dobrowolska K, Miros M, Sosnowski TR. Impact of Natural-Based Viscosity Modifiers of Inhalation Drugs on the Dynamic Surface Properties of the Pulmonary Surfactant. *Materials*. 2023;16(5):1975.
147. Schief WR, Antia M, Discher BM, Hall SB, Vogel V. Liquid-Crystalline Collapse of Pulmonary Surfactant Monolayers. *T. 84, Biophys. J*. 2003.
148. Valencia-Rivera DE, Básaca-Loya A, Burboa MG, Gutiérrez-Millán LE, Cadena-Nava RD, Ruiz-García J, i in. Interaction of N-nitrosodiethylamine/bovine serum albumin complexes with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine monolayers at the air-water interface. *J Colloid Interface Sci*. 2007;316(2):238–49.
149. Rodríguez JR, García AE. Concentration dependence of NaCl ion distributions around DPPC lipid bilayers. *Interdiscip Sci*. 2011;3(4):272–82.
150. Baer B, Souza LMP, Pimentel AS, Veldhuizen RAW. New insights into exogenous surfactant as a carrier of pulmonary therapeutics. *T. 164, Biochem. Pharmacol*. 2019. s. 64–73.
151. Sosnowski TR, Podgórski A. Assessment of the pulmonary toxicity of inhaled gases and particles with physicochemical methods. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics*. 1999;5(3):431–47.
152. Miller E, Pirożyński M, Jastrzębski J, Pawelec M, Sosnowski T. Pulmonary surfactant function in patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome treated by mechanical ventilation. *Crit Care*. 2005;9(Supl 1):P94.
153. Białecki J, Hołyst JA. Linear stability analysis in a liquid layer with a surface velocity gradient. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*. 2003;67(6):5.

154. Gradoń L, Sosnowski TR. Mass transfer through the gas-liquid interface at the presence of adsorbed active phospholipid monolayer. *Stud Surf Sci Catal.* 2001. s. 283–8.
155. Walters D. The role of pulmonary surfactant in transepithelial movement of fluid. Robertson B, van Golde L, Batenburg J. Amsterdam: Elsevier; 1992. 193–213 s.
156. Sosnowski TR, Gradoń L, Podgórski A. Influence of insoluble aerosol deposits on the surface activity of the pulmonary surfactant: A possible mechanism of alveolar clearance retardation? *Aerosol Sci Tech.* 2000. s. 52–60.
157. Sosnowski T. Sorption-induced Marangoni microflows in the pulmonary surfactant system. *Inż Chem Proc.* 2001;22:251–67.
158. Gradoń L, Podgórski A. Displacement of alveolar macrophages in air space of human lung. *Biol Eng & Comput.* 1995;33:575–81.
159. Kreyling W, Scheuch G. Particle-Lung Interactions. Gehr P, Heyder J, redaktorzy. New York-Basel: Marcel Dekker; 2000.
160. Podgórski A, Gradoń L. An improved mathematical model of hydrodynamical self-cleaning of pulmonary alveoli. *Ann Occup Hyg.* 1993;37(4):347–65.
161. Ravera F, Miller R, Zuo YY, Noskov BA, Bykov AG, Kovalchuk VI. Methods and models to investigate the physicochemical functionality of pulmonary surfactant. T. 55, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2021.
162. Yu LMY, Lu JJ, Chan YW, Ng A, Zhang L, Hoorfar M, i in. Constrained sessile drop as a new configuration to measure low surface tension in lung surfactant systems. *J Appl Physiol.* 2004;97(2):704–15.
163. Stachowicz-Kuśnierz A, Korchowiec B, Rogalska E, Korchowiec J. The lung surfactant activity probed with molecular dynamics simulations. T. 304, *Adv Colloid Interface Sci.* Elsevier B.V.; 2022.
164. Yan W, Piknova B, Hall SB. The collapse of monolayers containing pulmonary surfactant phospholipids is kinetically determined. *Biophys J.* 2005;89(1):306–14.
165. Tanaka Y, Takei T, Aiba T, Masuda K, Kiuchi A, Fujiwara T. Development of synthetic lung surfactants. *J Lipid Res.* 1986;27(5):475–85.
166. Piknova B, Schief WR, Vogel V, Discher BM, Hall SB. Discrepancy between Phase Behavior of Lung Surfactant Phospholipids and the Classical Model of Surfactant Function. *Biophys J.* 2001;81:2172–80.
167. Rojewska M, Tim B, Prochaska K. Interactions between silica particles and model phospholipid monolayers. *J Mol Liq.* 2022;345.

168. Guzmán E, Santini E, Ferrari M, Liggieri L, Ravera F. Effect of the Incorporation of Nanosized Titanium Dioxide on the Interfacial Properties of 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine Langmuir Monolayers. *Langmuir*. 2017;33(40):10715–25.
169. Dobrowolska K, Odziomek M, Ulatowski K, Kędziora W, Soszyńska K, Sobieszuk P, i in. Interactions between O₂ Nanobubbles and the Pulmonary Surfactant in the Presence of Inhalation Medicines. *Materials*. 2022;15(18):1–15.
170. Gong K, Feng SS, Lin Go M, Soew PH. Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air-water interface. T. 207, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2002.
171. Seurynck-Servoss SL, Brown NJ, Dohm MT, Wu CW, Barron AE. Lipid composition greatly affects the in vitro surface activity of lung surfactant protein mimics. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007;57(1):37–55.
172. Morrow MR, Temple S, Stewart J, Keoughy KMW. Comparison of DPPC and DPPG environments in pulmonary surfactant models. *Biophys J*. 2007;93(1):164–75.
173. Zhang H, Fan Q, Wang YE, Neal CR, Zuo YY. Comparative study of clinical pulmonary surfactants using atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2011;1808(7):1832–42.
174. Czyzewski AM, McCaig LM, Dohm MT, Broering LA, Yao LJ, Brown NJ, i in. Effective in vivo treatment of acute lung injury with helical, amphipathic peptoid mimics of pulmonary surfactant proteins. *Sci Rep*. 2018;8(1).
175. Notter RH, Wang Z, Egan EA, Holm BA. Component-specific surface and physiological activity in bovine-derived lung surfactants. T. 114, *Chemistry and Physics of Lipids*. 2002.
176. Kramek-Romanowska K, Odziomek M, Sosnowski TR. Dynamic tensiometry studies on interactions of novel therapeutic inhalable powders with model pulmonary surfactant at the air-water interface. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2015;480:149–58.
177. Schüer JJ, Arndt A, Wölk C, Pinnapireddy SR, Bakowsky U. Establishment of a Synthetic in Vitro Lung Surfactant Model for Particle Interaction Studies on a Langmuir Film Balance. *Langmuir*. 2020;36(17):4808–19.
178. Van Den Tempel M. Surface Rheology. *J Non-Newton Fluid*. 1977;2:205–19.
179. Benjamins J, Cagna A, Lucassen-Reynders EH. Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered by proteins. T. 114, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp*. 1996.

180. Lucassen-Reynders EH, Cagna A, Lucassen J. Gibbs elasticity, surface dilational modulus and diffusional relaxation in nonionic surfactant monolayers. *T. 186, Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 2001.
181. Pawelec M. Zastosowania tensjometrii dynamicznej w inżynierii procesowej i medycynie. Politechnika Warszawska; 2007.
182. Dervichian DG. Changes of phase and transformations of higher order in monolayers. *J Chem Phys.* 1939;7(10):931–48.
183. Paul R, Banik H, Alzaid M, Bhattacharjee D, Hussain SA. Interaction of a Phospholipid and a Coagulating Protein: Potential Candidate for Bioelectronic Applications. *ACS Omega.* 31 maj 2022;7(21):17583–92.
184. Davies J, Rideal E. Properties of Monolayers. *Interfacial Phenomena.* 2. Nowy Jork: Academic Press; 1963. s. 217–81.
185. Notter RH, Taubold R, Mavis RD. Hysteresis in Saturated Phospholipid Films and Its Potential Relevance for Lung Surfactant Function In Vivo. *Exp Lung Res.* 1982;3:109–27.
186. Ravera F, Ferrari M, Santini E, Liggieri L. Influence of surface processes on the dilational visco-elasticity of surfactant solutions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2005. s. 75–100.
187. Wüstneck R, Wüstneck N, Moser B, Karageorgieva V, Pison U. Surface dilatational behavior of pulmonary surfactant components spread on the surface of a pendant drop. 1 - Dipalmitoyl phosphatidylcholine and surfactant protein C. *Langmuir.* 2002;18(4):1119–24.
188. Bykov AG, Loglio G, Miller R, Milyaeva OY, Michailov A V., Noskov BA. Dynamic properties and relaxation processes in surface layer of pulmonary surfactant solutions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2019;573:14–21.
189. Dalmoro A, Barba AA, D’Amore M. Analysis of size correlations for microdroplets produced by ultrasonic atomization. *Sci. World J.* 2013;2013.
190. Mc Callion ONM, Patel MJ. Viscosity effects on nebulisation of aqueous solutions. *Int J Pharm.* 1996;130:245–9.
191. Ashgriz N. *Handbook of Atomization and Sprays: Theory and Applications.* 2011.
192. Feng ZG, Michaelides EE. Drag coefficients of viscous spheres at intermediate and high reynolds numbers. *J. Fluids Eng.* 2001;123(4):841–9.
193. Podvysotsky AM, Shraiber AA. Coalescence and break-up of drops in two-phase flows. *Int J Multiphase Flow.* 1984;10(2):195–209.

194. Podgórska W. Drop coalescence in a turbulent flow factors affecting film drainage. *Chem. Process Eng.* 2008;29:257–69.
195. Bąk A, Podgórska W. Rozpad i koalescencja kropeł w obecności aktywnego powierzchniowo polimeru PVA 88 % (85000-124000). *Inż Ap Chem.* 2015;54(6):304–5.
196. Ochowiak M, Bielecki Z, Bielecki M, Włodarczak S, Krupińska A, Matuszak M, i in. The D2-Law of Droplet Evaporation When Calculating the Droplet Evaporation Process of Liquid Containing Solid State Catalyst Particles. T. 15, *Energies*. MDPI; 2022.
197. Sirignano WA. Fluid dynamics and transport of droplets and sprays. Cambridge University Press; 2010. 462 s.
198. Orzechowski Z, Prywer J. Preparation and Application of the Sprayed Liquid. Warszawa: Scientific and Technical Publishing House (WNT); 2008.
199. Bellan J, Harstad K. The details of the convective evaporation of dense and dilute clusters of drops. T. 30, *Heat Mass Transf.* 1987.
200. Porstendoerfer J, Gebhart J, Roebig G. Effect of evaporation on the size distribution of nebulized aerosols. *J Aerosol Sci.* 1977;8:371–80.
201. Ari A. Jet, Ultrasonic, and Mesh Nebulizers: An Evaluation of Nebulizers for Better Clinical Outcomes. *Eurasian J. Pulmonol.* 2014;16(1):1–7.
202. Martin AR, Finlay WH. Nebulizers for drug delivery to the lungs. T. 12, *Expert Opinion on Drug Delivery*. Informa Healthcare; 2015. s. 889–900.
203. Denyer J, Dyche T. The Adaptive Aerosol Delivery (AAD) Technology: Past, Present, and Future. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2010;23(1):S1–10.
204. Ari A, Rubin BK, Fink JB. Mesh nebulizers enabling transnasal pulmonary delivery of medical aerosols to infants and toddlers: Roles, challenges, and opportunities. *Frontiers in Drug Delivery*. 2022;2:1–9.
205. Finlay W. The Mechanics of inhaled pharmaceutical aerosols: an introduction. London: Academic Press; 2001.
206. Yeo LY, Friend JR, McIntosh MP, Meeusen EN, Morton DA. Ultrasonic nebulization platforms for pulmonary drug delivery. T. 7, *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2010. s. 663–79.
207. Cipolla D, Gonda I, Chan HK. Liposomal formulations for inhalation. T. 4, *Therapeutic Delivery*. Newlands Press Ltd; 2013. s. 1047–72.

208. Lelong N, Vecellio L, Sommer De Gélécourt Y, Tanguy C, Diot P, Junqua-Moullet A. Comparison of numerical simulations to experiments for atomization in a jet nebulizer. *PLoS One*. 2013;8(11).
209. Topp MN. Ultrasonic atomization-a photographic study of the mechanism of disintegration. *J Aerosol Sci*. 1973;4:17–25.
210. Najlah M, Parveen I, Alhnan MA, Ahmed W, Faheem A, Phoenix DA, i in. The effects of suspension particle size on the performance of air-jet, ultrasonic and vibrating-mesh nebulisers. *Int J Pharm*. 2014;461(1–2):234–41.
211. Pritchard JN, Hatley RHM, Denyer J, Von Hollen Di. Mesh nebulizers have become the first choice for new nebulized pharmaceutical drug developments. *Ther Deliv*. 2018;9(2):121–36.
212. Lass JS, Sant A, Knoch M. New advances in aerosolised drug delivery: Vibrating membrane nebuliser technology. *Expert Opin Drug Deliv*. 2006;3(5):693–702.
213. Knoch M, Keller M. The customised electronic nebuliser: A new category of liquid aerosol drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*. 2005;2(2):377–90.
214. Dalby R, Tiano S. Medical devices for the delivery of therapeutic aerosols to the lungs. Hickey A. *Inhalation aerosols: physical and biological basis for therapy*. New York: Marcel Decker; 1996. s. 441–73.
215. Niven R. Atomization and nebulizers. Hickey A. *Inhalation aerosols: physical and biological basis for therapy*. New York: Marcel Decker; 1996. s. 273–312.
216. Lang Y, Zhang J. Influence of piezoelectric atomizer pores on ultrasonic atomization effect. W: *Proceedings of the 2014 Symposium on Piezoelectricity, Acoustic Waves and Device Applications*. SPRAWDA 2014; 2014. s. 287–90.
217. Hochrainer D, Hölz H, Kreher C, Scaffidi L, Spallek M, Wachtel H. Comparison of the Aerosol Velocity and Spray Duration of Respimat® Soft Mist™ Inhaler and Pressurized Metered Dose Inhalers. *J Aerosol Med*. 2005;18(3):273–82.
218. Sosnowski TR, Marczyk K, Dobrowolska K, Moskal Politechnika Warszawska A, Inżynierii Chemicznej Procesowej W, Inżynierii Procesów Zintegrowanych K. Wpływ wybranych parametrów procesu nebulizacji na skuteczność celowanego dostarczania leków inhalacyjnych do płuc. Kawalec-Pietrenko B. *Przepływy wielofazowe i operacje mechaniczne inżynierii procesowej*. Gdańsk: Wyd. PG; 2022. s. 101–6.
219. Dobrowolska K, Antonowicz A, Sosnowski TR. Two-dimensional LDA anlysis of droplet velocity in aerosol clouds emittedfrom medical nebulizers. Sosnowski TR,

- Szwast M. Chemical and process engineering for the environment and health. Radom: Sieć Badaw; 2020. s. 155–62.
220. Dobrowolska K, Sosnowski TR. Evolution of droplet size distribution in selected nebulizers. *Physicochem Probl Mi.* 2020;56(6):32–40.
 221. Podgórski A, Gradoń L, Moskal A. Evolution of the Initial Size Distribution of Aerosol Particles in a Nebulizer System Used in the Lung Therapy. *Inż Chem Proc.* 2006;27:519–34.
 222. Finlay WH. Estimating the Type of Hygroscopic Behavior Exhibited by Aqueous Droplets. *J Aerosol Med.* 1998;11(4):221–9.
 223. Steckel H, Eskandar F. Factors affecting aerosol performance during nebulization with jet and ultrasonic nebulizers. *Eur J Pharm Sci.* 2003;19(5):443–55.
 224. Sosnowski T, Żołądkowicz J. Charakterystyka procesu atomizacji cieczy w układach z wibrującą membraną (VM) stosowanych w wybranych inhalatorach medycznych. *Inż Ap Chem.* 2011;50(5):100–1.
 225. Biswas R, Hanania NA, Sabharwal A. Factors Determining in Vitro Lung Deposition of Albuterol Aerosol Delivered by Ventolin Metered-Dose Inhaler. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2017;30(4):256–66.
 226. Pritchard JN. Nebulized drug delivery in respiratory medicine: What does the future hold? *Ther Deliv.* 2017;8(6):391–9.
 227. Dolovich MB, Kuttler A, Dimke TJ, Usmani OS. Biophysical model to predict lung delivery from a dual bronchodilator dry-powder inhaler. *Int J Pharm X.* 2019;1:100018–27.
 228. Lentz YK, Worden LR, Anchordoquy TJ, Lengsfeld CS. Effect of jet nebulization on DNA: Identifying the dominant degradation mechanism and mitigation methods. *J Aerosol Sci.* 2005;36(8):973–90.
 229. Hertel SP, Winter G, Friess W. Protein stability in pulmonary drug delivery via nebulization. T. 93, *Advanced Drug Delivery Reviews.* Elsevier B.V.; 2015. s. 79–94.
 230. Hess D, Fisher D, Williams P, Pooler S, Kacmarek RM. Medication nebulizer performance: Effects of diluent volume, nebulizer flow, and nebulizer brand. *Chest.* 1996;110(2):498–505.
 231. Beck-Broichsitter M, Oesterheld N. Electrolyte type and nozzle composition affect the process of vibrating-membrane nebulization. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;119:11–6.
 232. Mercer TT, Tillery MI, Chow H V. Operating Characteristics of Some Compressed-Air Nebulizers. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1968;29(1):66–78.

233. Beck-Broichsitter M, Prüfer N, Oesterheld N, Seeger W, Schmehl T. Nebulization of active pharmaceutical ingredients with the eFlow®rapid: Impact of formulation variables on aerodynamic characteristics. *J Pharm Sci.* 2014;103(8):2585–9.
234. Ghazanfari T, Elhissi AMA, Ding Z, Taylor KMG. The influence of fluid physicochemical properties on vibrating-mesh nebulization. *Int J Pharm.* 2007;339(1–2):103–11.
235. Rosell J, Schuster J, Liu K. Suppression of electrostatic charging of AERx aerosols. *J Aerosol Med.* 2001;14(3):405–405.
236. Deshpande D, Blanchard J, Srinivasan S, Fairbanks D, Fujimoto J, Sawa A, i in. Aerosolization of lipoplexes using AERx pulmonar delivery system. *AAPS PharmSci.* 2002;4(3):1–10.
237. Garrett BC. Ions at the Air/Water Interface. T. 303, *Science.* 2004. s. 1146–7.
238. Najlah M, Vali A, Taylor M, Arafat BT, Ahmed W, Phoenix DA, i in. A study of the effects of sodium halides on the performance of air-jet and vibrating-mesh nebulizers. *Int J Pharm.* 2013;456(2):520–7.
239. Broniarz-Press L, Ochowiak M, Matuszak M, Włodarczak S. The effect of shear and extensional viscosity on atomization in medical inhaler. *Int J Pharm.* 2014;468(1–2):199–206.
240. Beck-Broichsitter M, Oesterheld N, Knuedeler MC, Seeger W, Schmehl T. On the correlation of output rate and aerodynamic characteristics in vibrating-mesh-based aqueous aerosol delivery. *Int J Pharm.* 2014;461(1–2):34–7.
241. Arzhavitina A, Steckel H. Surface active drugs significantly alter the drug output rate from medical nebulizers. *Int J Pharm.* 2010;384(1–2):128–36.
242. Mc Callion A' ONM, Taylor KMG, Thomas M, Taylor AJ. The influence of surface tension on aerosols produced by medical nebulisers. *Int J Pharm.* 1996;129:123–36.
243. Rajan R, Pandit AB. Correlations to predict droplet size in ultrasonic atomisation. *Ultrasonics.* 2001;235–55.
244. Coates AL, MacNeish CF, Meisner D, Kelemen S, Thibert R, MacDonald J, i in. The choice of jet nebulizer, nebulizing flow, and addition of albuterol affects the output of tobramycin aerosols. *Chest.* 1997;111(5):1206–12.
245. Mandato S, Rondet E, Delaplace G, Barkouti A, Galet L, Accart P, i in. Liquids' atomization with two different nozzles: Modeling of the effects of some processing and formulation conditions by dimensional analysis. *Powder Technol.* 2012;224:323–30.

246. Dailey LA, Schmehl T, Gessler T, Wittmar M, Grimminger F, Seeger W, i in. Nebulization of biodegradable nanoparticles: impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features. *J Control Release*. 2003;86:131–44.
247. Phipps PR, Gonda I. Droplets produced by medical nebulizers. Some factors affecting their size and solute concentration. *Chest*. 1990;97(6):1327–32.
248. European Pharmacopoeia. X. Strasbourg; 2019.
249. Dobrowolska K, Emeryk A, Janeczek K, Krzosa R, Pirożyński M, Sosnowski TR. Influence of Physicochemical Properties of Budesonide Micro-Suspensions on Their Expected Lung Delivery Using a Vibrating Mesh Nebulizer. *Pharmaceutics*. 2023;15(3):752–69.
250. European Committee for Standardization CEN: EN 13544-1:2007+ A1:2009. Respiratory Therapy Equipment: Nebulizing Systems and Their Components. CEN: EN 60. London; 2010.
251. FDA. PULMICORT RESPULES® (budesonide) inhalation suspension. 2000.
252. ŁĄCzkowska-Przybylska J, Szmeja Z. Usefulness of aerosolotherapy in treatment of otolaryngological diseases. *Otolaryngologia Polska*. 2008;62(5):598–600.
253. Loffert DT, Ikle D, Nelson HS. A comparison of commercial jet nebulizers. *Chest*. 1994;106(6):1788–92.
254. Husby S, Agertoft L, Mortensen S, Pedersen S. Treatment of croup with nebulised steroid (budesonide): a double blind, placebo controlled study. *Arch Dis Child*. 1993;68:352–5.
255. Ann Lieben M, Stapleton K, Finlay W. Errors in Characterizing Nebulized Particle Size Distributions with Cascade Impactors. T. 11, *J Aerosol Med*. 1998. Dostępne na: www.liebertpub.com
256. Kwong WTJ, Ho SL, Coates AL. Comparison of Nebulized Particle Size Distribution with Malvern Laser Diffraction Analyzer Versus Andersen Cascade Impactor and Low-Flow Marple Personal Cascade Impactor. T. 13, *J Aerosol Med*. Mary Ann Liebert, Inc. Pp; 2000.
257. Finlay WH, Stapletons KW. Undersizing of droplets from a vented nebulizer caused by aerosol heating during transit through an anderson impactor. *J Aerosol Sci*. 1999;30(1):105–9.
258. Corcoran TE, Hitron R, Humphrey W, Chigier N. Optical measurement of nebulizer sprays: a quantitative comparison of diffraction, phase doppler interferometry, and time of flight techniques. *J Aerosol Sci*. 2000;31(1):35–50.

259. Traczyk T, Mączyński M. Matematyka stosowana w inżynierii chemicznej. Warszawa: PWN; 1970.
260. Finlay WH, Darquenne C. Particle Size Distributions. T. 33, J Aerosol Med Pulm Drug Deliv. Mary Ann Liebert Inc.; 2020. s. 178–80.
261. Newman S. Respiratory drug delivery : essential theory and practice. Respiratory Drug Delivery Online. Richmond (VA); 2009.
262. EWP. Guideline on the investigation of bioequivalence CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr **. London; 2010.
263. Sznitowska M. Methods for evaluation of generic drug products-from dissolution test to bioequivalence. Choroby Serca i Naczyń. 2011;8(4):209–14.
264. Federal Food Drug and Cosmetic Act at Section 505(j), Part A, Sec. 355. 2008.
265. Dobrowolska K, Sosnowski T. Depozycja i oddziaływanie leków inhalacyjnych z powierzchni ą płuc – badania modelowe. Ap Chem. 2018;57(3):53–4.
266. IPEC-Europe. The IPEC ExcipientComposition Guide. 2009.
267. Patel R, Barker J, Elshaer A. Pharmaceutical excipients and drug metabolism: A mini-review. T. 21, Int J Mol Sci. MDPI AG; 2020. s. 1–21.
268. Pifferi G, Restani P. The safety of pharmaceutical excipients. Farmaco. 2003;58(8):541–50.
269. Thorat S. Formulation and Product Development of Nebuliser Inhaler: An Overview. Int. J. Pharm. Sci. Res. 2016;1(5):30–5.
270. Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. T. 392, Int J Pharm. 2010. s. 1–19.
271. Lindenberg F, Sichel F, Lechevrel M, Respaud R, Saint-Lorant G. Evaluation of Lung Cell Toxicity of Surfactants for Inhalation Route. J Toxicol Risk Assesst. 2019;5(2).
272. Świercz R, Hałatek T, Majcherek W, Grzełińska Z, Wąsowicz W. Toxic effect of benzalkonium chloride on animals and humans. Med Pr. 2007;58(2):139–42.
273. Bergh M, Magnusson K, Nilsson L, Karlberg AT. Contact allergenic activity of Tween 80 before and after air exposure. Contact Derm. 1997;37:9–18.
274. Lechien J, Araujo P, Marrez L, Halloy JL, Khalife M, Saussez S. Contact allergy to benzalkonium chloride in patients using a steroid nasal spray : A report of 3 cases Case reports. APPS J. 2018;97(1–2):E20-2.
275. Al-Hallak MHDK, Azarmi S, Sun C, Lai P, Prenner EJ, Roa WH. Pulmonary toxicity of polysorbate-80-coated inhalable nanoparticles; In vitro and in vivo evaluation. AAPS Journal. 2010;12(3):294–9.

276. Isoda H, Shinmoto H, Matsumura M, Nakahara T. Succinoyl trehalose lipid induced differentiation of human monocytoid leukemic cell line U937 into monocyte-macrophages. T. 19, Cytotechnology. Kluwer Academic Publishers; 1996.
277. Wu P, Qi B, Zhu H, Zheng Y, Li F, Chen J. Suppression of staurosporine-mediated apoptosis in Hs578T breast cells through inhibition of neutral-sphingomyelinase by caveolin-1. *Cancer Lett.* 2007;256(1):64–72.
278. Cao X hong, Wang A hua, Wang C ling, Mao D zhi, Lu M fang, Cui Y qian, i in. Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. *Chem Biol Interact.* 2010;183(3):357–62.
279. Krasowska A. Biomedical activity of biosurfactants. *Postepy Hig Med Dosw.* 2010;64:310–3.
280. Sirtori CR. Aescin: Pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacol Res.* 2001;44(3):183–93.
281. Scholfield CR. Composition of Soybean Lecithin. American Oil Chemists' Society. 1981;58(10):889–92.
282. Gliński J, Chavepeyer G, Platten JK. Surface properties of aqueous solutions of L-leucine. *Biophys Chem.* 2000;84:99103.
283. Lange CF, Finlay WH. Liquid Atomizing: Nebulizing and Other Methods of Producing Aerosols. *J AEROSOL MED.* 2006;19(1):28–35.
284. Sousa A, Rocha C, Gonçalves M. Agar. W: Phillips G, Williams P. Handbook of Hydrocolloids. 3. wyd. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; 2021. s. 731–65.
285. BeMiller JN. Carrageenans. W: Carbohydrate Chemistry for Food Scientists. Elsevier; 2019. s. 279–91.
286. Tripodo G, Trapani A, Torre ML, Giammona G, Trapani G, Mandracchia D. Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges. T. 97, *Eur J Pharm Biopharm.* Elsevier; 2015. s. 400–16.
287. Vasvani S, Kulkarni P, Rawtani D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. T. 151, *International Journal of Biological Macromolecules.* Elsevier B.V.; 2020. s. 1012–29.
288. Garg H, Hales C. Medical application of hyaluronan. Chemistry and biology of hyaluronan. Boston, USA: Elsevier Science; 2004.

289. Takahashi R, Al-Assaf S, Williams PA, Kubota K, Okamoto A, Nishinari K. Asymmetrical-flow field-flow fractionation with on-line multiangle light scattering detection. 1. Application to wormlike chain analysis of weakly stiff polymer chains. *Biomacromolecules*. 2003;4(2):404–9.
290. Cowman MK, Matsuoka S. Experimental approaches to hyaluronan structure. T. 340, *Carbohydrate Research*. Elsevier BV; 2005. s. 791–809.
291. Musilová L, Kašpárková V, Mráček A, Minařík A, Minařík M. The behaviour of hyaluronan solutions in the presence of Hofmeister ions: A light scattering, viscometry and surface tension study. *Carbohydr Polym*. 2019;212:395–402.
292. Mazzone M, Peri O, Moschetti V. Evaluation of Mucoadhesive Properties of Xanthan Gum Hydrogels versus Marketed Ophthalmic Gel Formulations Using a Tensile Strength Method. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(13):1966.
293. Jindal N, Singh Khattar J. Microbial Polysaccharides in Food Industry. *Biopolymers for Food Design*. Elsevier Inc.; 2018. s. 95–123.
294. sinterface.com.
295. Dziubiński M, Kiljański T, Sęk J. Podstawy teoretyczne i metody pomiarowe reologii. *Monografie Politechniki Łódzkiej*; 2015.
296. Sznitowska M. *Farmacja stosowana technologia postaci leku*. Warszawa: PZWL; 2017.
297. Hirota K, Terada H. Particle-manufacturing technology-based inhalation therapy for pulmonary diseases. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*. Elsevier Inc.; 2014. s. 103–19.
298. Normy dotyczące wody demineralizowanej. *Czysta Woda Śląsk*; 2018.
299. Współczynnik lepkości dynamicznej wody w zakresie temperatur 20°C - 75°C. *Wydział Inżynierii Materiałowej i Fizyki Politechnika Krakowska*; 2017.
300. Wan L, Poon P. Effect of Salts on the Surface /Interfacial Tension and Critical Micelle Concentration of Surfactants. *J Pharm Sci*. 1969;58(12):1562–7.
301. Qazi MJ, Liefferink RW, Schlegel SJ, Backus EHG, Bonn D, Shahidzadeh N. Influence of Surfactants on Sodium Chloride Crystallization in Confinement. *Langmuir*. 2017;33(17):4260–8.
302. Kutáľková E, Hrnčířík J, Witasek R, Ingr M. Effect of solvent and ions on the structure and dynamics of a hyaluronan molecule. *Carbohydr Polym*. 2020;234.
303. Jeanes A, Pittsley JE, Senti FR. Polysaccharide B-1459: A New Hydrocolloid Polyelectrolyte Produced from Glucose by Bacterial Fermentation*. *J Appl Polym Sci*. 1961;(17):519–26.

304. Bezemer L, Ubbink JB, De Kooker JA, Kuil ME, Leyte JC. On the Conformational Transitions of Native Xanthan. *Macromolecules*. 1993;26:6436–46.
305. Holzwarth G. Conformation of the Extracellular Polysaccharide of *Xanthomonas campestris*. *Biochemistry*. 1973;31(2):902.
306. Wyatt NB, Liberatore MW. Rheology and viscosity scaling of the polyelectrolyte xanthan gum. *J Appl Polym Sci*. 2009;114(6):4076–84.
307. Zatz JL, Knapp S. Viscosity of Xanthan Gum Solutions at Low Shear Rates. *J Pharm Sci*. 1984;73(4):4076–84.
308. Asyakina L, Asyakina L, Dyshlyuk L, Dyshlyuk L. Study of viscosity of aqueous solutions of natural polysaccharides. *Science Evolution*. 2016;11–9.
309. MacLoughlin RJ, Higgins BD, Laffey JG, O'Brien T. Optimized aerosol delivery to a mechanically ventilated rodent. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2009;22(4):323–32.
310. Qazi MJ, Schlegel SJ, Backus EHG, Bonn M, Bonn D, Shahidzadeh N. Dynamic Surface Tension of Surfactants in the Presence of High Salt Concentrations. *Langmuir*. 2020;36(27):7956–64.
311. Alves AC, Nunes C, Lima J, Reis S. Daunorubicin and doxorubicin molecular interplay with 2D membrane models. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;160:610–8.
312. Guzmán E, Liggieri L, Santini E, Ferrari M, Ravera F. Mixed DPPC-cholesterol Langmuir monolayers in presence of hydrophilic silica nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;105:284–93.
313. Ruiz GCM, Pazin WM, do Carmo Morato LF, Oliveira ON, Constantino CJL. Correlating mono- and bilayers of lipids to investigate the pronounced effects of steroid hormone 17 α -ethynylestradiol on membrane models of DPPC/cholesterol. *J Mol Liq*. 2020;311.
314. Sosnowski T, Dobrowolska K. In vitro interactions of nebulized budesonide inhalation suspension with lung surfactant: the importance of drug formulation. Dalby R, Byron P. *Respiratory Drug Delivery 2020*. 3. wyd. Virginia Commonwealth University; 2020. s. 737–42.
315. Palmer D, Schurch S, Belik J. Effect of budesonide and salbutamol on surfactant properties. *J Appl Physiol*. 2000;89:884–90.
316. Kondej D, Sosnowski TR. Effect of clay nanoparticles on model lung surfactant: a potential marker of hazard from nanoaerosol inhalation. *Environ. Sci. Pollut. Res*. 2016;23(5):4660–9.
317. Spraytec - User Manual 3.0. 2007.

- 318. Krawczykowski D. Zastosowanie dyfrakcyjnej analizy laserowej do kontroli uziarnienia produktów przeróbki rud metali. INZ MINER. 2017;233–40.
- 319. Ye Z, Jiang X, Wang Z. Measurements of particle size distribution based on Mie scattering theory and Markov chain inversion algorithm. J. Softw. 2012;7(10):2309–16.
- 320. Wójtowicz R, Szatko W. Metodyka optycznej analizy cząstek ciała stałego. Mech Tech Trans. 2012;6:497–504.
- 321. KSV NIMA MicroBAM Manual 1.7. 2018.

OŚWIADCZENIA

Badania przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej były częściowo finansowane przez Narodowe Centrum Nauki:

- w ramach projektu badawczego PRELUDIUM o nr 2019/33/N/ST8/01181 „Badanie właściwości substancji pochodzenia naturalnego jako potencjalnych funkcjonalnych składników leków inhalacyjnych podawanych z nebulizatorów” (kierownik: K. Dobrowolska);
 - w ramach projektu badawczego OPUS o nr 2018/29/B/ST8/00273 pt. „Procesy atomizacji cieczy dla celowanego wprowadzania leków do układu oddechowego - mechanizmy powstawania, transportu i depozycji kropeł” (kierownik: T. Sosnowski);
- oraz w ramach grantu przyznanego przez Dziekana Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej pt. „Wpływ właściwości wybranych leków inhalacyjnych na ich depozycję i oddziaływanie z powierzchnią płuc” (kierownik: K. Dobrowolska).

Autor chce również podziękować firmie ONY Biotech (USA) za darowiznę Infasurfu[®], która umożliwiła wykonanie części badań w niniejszej pracy.

Autor zaznacza, że rysunki niebędące autorskimi zostały zamieszczone w niniejszej pracy za zgodą właścicieli praw autorskich.

ZAŁĄCZNIKI



a. LC SPRINT



b. Trio Jet



c. Aerogen Solo



d. Intec Twister
Mesh



e. Diagnostic Pro-
Mesh

Rys. 9.Z.1.a-e. Nebulizatory zastosowane w badaniach (widok z boku)

Z.9.1. Opis aparatury pomiarowej Spraytec oraz podstawy teoretyczne jej działania

Układ pomiarowy Spraytec składa się z dwóch modułów funkcjonalnych instrumentu – nadajnika (laser helowo-neonowy) oraz odbiornika, między którymi znajduje się przestrzeń pomiarowa. Nadajnik laserowy ma za zadanie wyemitować wiązkę światła o odpowiednich parametrach. W tym celu wiązka laserowa jest rozszerzana przez kolimator. Odbiornik składa się z tablicy 30 pojedynczych światłoczułych detektorów oraz umieszczonej przed nimi 300 mm soczewki skupiającej. Ich zadaniem, odpowiednio, jest skupianie rozproszonego światła i jego detekcja. Zasada działania układu dyfrakcyjnego opiera się na pomiarze intensywności widma światła, które uległo rozproszeniu na kroplach lub cząstkach zdyspergowanych (pomiar kąta dyfrakcji). Cząstki, bądź krople załamują skolimowaną wiązkę laserową pod różnym kątem, a następnie moduł optyczny odbiornika składający się z światłoczułego detektor rejestruje kąty załamania światła oraz intensywność sygnałów. Zgodnie z ogólną zasadą zjawiska - większe cząstki mają tendencję do załamывania wiązki laserowej pod mniejszym kątem niż małe cząstki. Generują one natomiast większą intensywność sygnału dla rozproszonej wiązki światła w porównaniu do mniejszych cząstek⁽³¹⁷⁾. Sygnał zarejestrowany przez detektor, zostaje poddany obróbce cyfrowej, a następnie przy wykorzystaniu modeli matematycznych, otrzymuje się objętościowy rozkład wielkości cząstek lub kropeł w emitowanym aerozolu⁽³¹⁸⁾.

Modele matematyczne (ISO 13320:2009 *Particle size analysis – Laser diffraction methods*), stosowane do obliczeń, opierają się na teoriach rozpraszania światła na cząstkach kulistych. Do cząstek większych - rzędu kilku mikrometrów stosuje się głównie model Fraunhofera, natomiast model Mie oraz teorie Rayleigha, bazujące na wyliczeniach Maxwella, przeznaczone są do cząstek o mniejszych średnicach⁽³¹⁹⁾. Ze względu na dużą dokładność w porównaniu do pozostałych algorytmów oraz wszechstronność zastosowania, szczególnie dużą rolę odgrywa teoria Mie. Model Mie opisuje zjawisko promieniowania na zewnątrz i wewnątrz cząstki osadzonej w jednorodnym i nieabsorbującym promieniowania świetlnego ośrodku. Co

istotne, promieniowanie to może rozchodzić się we wszystkich kierunkach w przestrzeni. Model uwzględnia rolę optyczną materiału tworzącego cząstkę – może on całkowicie absorbować promieniowanie lub całkowicie go nie pochłaniać. Dlatego też, w kalkulacjach stosuje się współczynnik załamania światła oraz współczynnik absorpcji światła przez sferyczną cząstkę (dokładniej materiał, który ją tworzy). Obliczenia modelowe polegają na analizie ilości energii rozproszonej w wyniku odbicia lub załamania na powierzchni cząstki oraz ilości energii pochłoniętej przez materiał, co wyrażone jest poprzez współczynnik transmisji. Współczynnik ten zależy m.in. od długości fali światła, materiału cząstki oraz temperatury ośrodka i jest on wyznaczany eksperymentalnie. Na jego podstawie wyznaczana jest wielkość cząstek. Ogólnie, model Mie powinno się stosować w przypadkach opisywanych przez niski współczynnik załamania światła lub niski współczynnik absorpcji, a także gdy długość fali światła jest porównywalna do rozmiaru średnic cząstek^(319,320).

Z.9.2. Opis aparatury pomiarowej mikroskopu BAM oraz podstawy teoretyczne jej działania

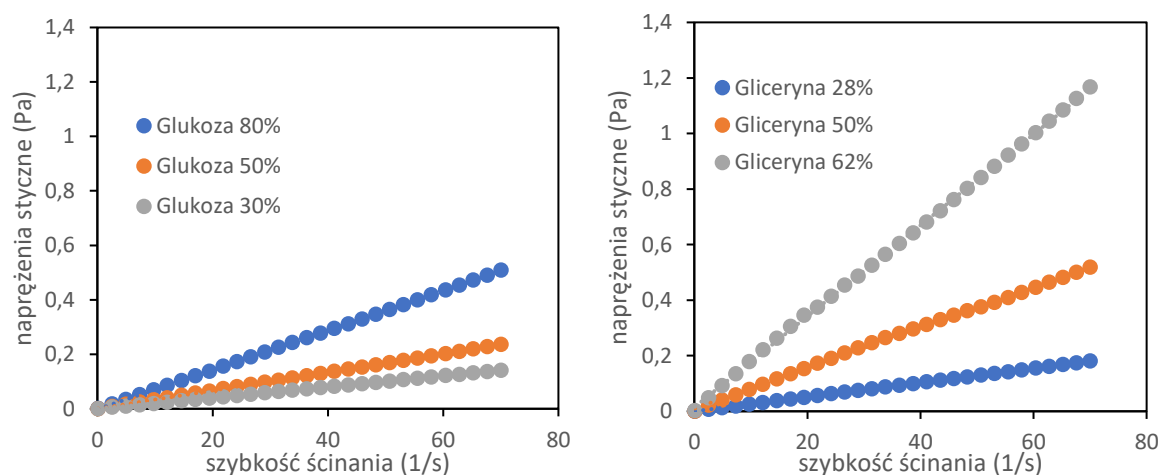
Podstawa mikroskopii kąta Brewster'a opiera się na właściwościach optycznych załamane światła od powierzchni subfazy (wody). Wykorzystane jest tu zjawisko, odkryte przez Davida Brewster'a, w którym światło padające na powierzchnię ulega odbiciu pod pewnym kątem i zostaje spolaryzowane w jedną płaszczyznę, tj. p-spolaryzowane. Dodatkowo, gdy p-spolaryzowana wiązka przechodzi przez granicę faz, brak odbicia (czarny obraz) zachodzi tylko pod jednym określonym kątem padania, zwanym kątem Brewster'a (w przypadku granicy faz powietrze-woda wynosi on 53°).



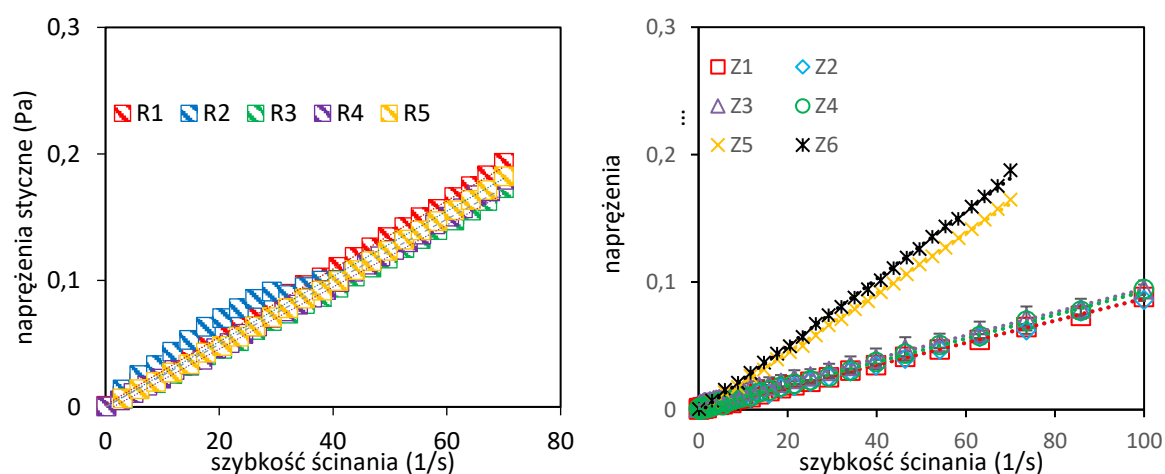
Rys. A. Stanowisko badawcze: waga Langmuir'a-Wilhelmy'ego i mikroskop kąta Brewster'a

Mikroskop BAM (Rys. A.) (Biolin Scientific, Wielka Brytania) współpracujący z wagą Langmuir'a-Wilhelmy'ego tworzy obraz powierzchni GLI poprzez rejestrację zmian współczynnika załamania światła. Gdy skondensowana faza – odpowiednio cienka monowarstwa, charakteryzująca się niezerowym (przeciwnie do wody) współczynnikiem załamania światła zaadsorbuje się na granicy faz, nastąpi mierzalna zmiana współczynnika

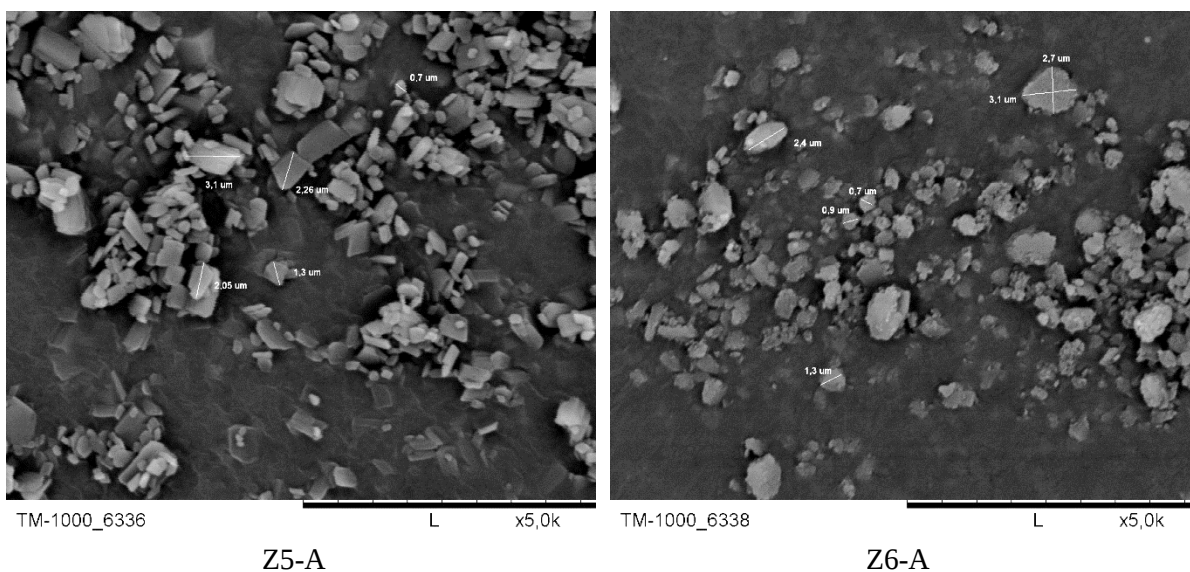
odbicia. W takim wypadku pewna część wiązki światła laserowego ulegnie odbiciu od powierzchni GLI, tworząc jasne punkty na obrazie z mikroskopu. Zmiana ta zachodzi w obecności molekuł zaadsorbowanych na GLI i może posłużyć do wizualizacji morfologii warstwy oraz dostarczyć informacji o jednorodności struktur czy dynamice zmian morfologicznych przy przejściu między kolejnymi stanami fizycznymi monowarstwy⁽³²¹⁾.



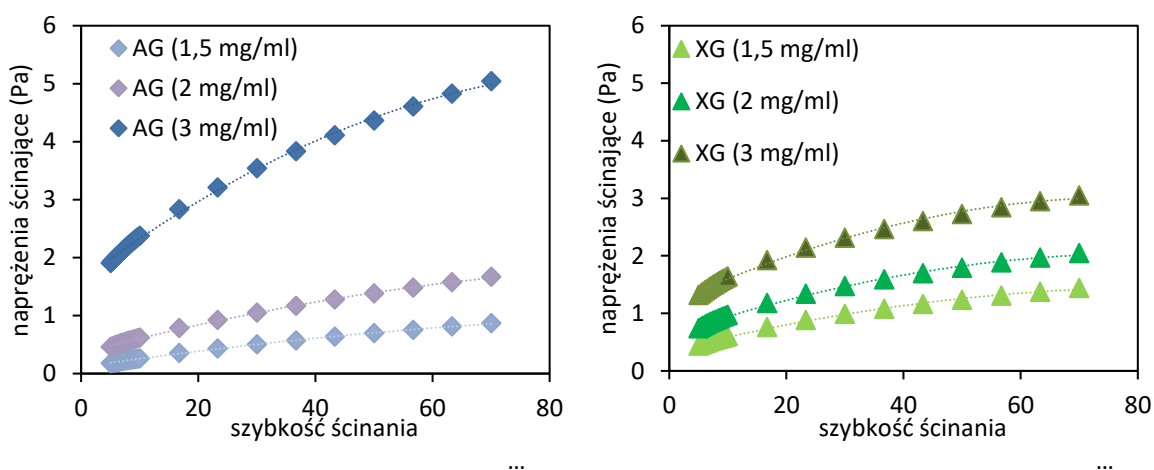
Rys. 10.Z.1. Krzywe płynięcia roztworów glukozy (po lewej) i gliceryny (po prawej) w 25°C.



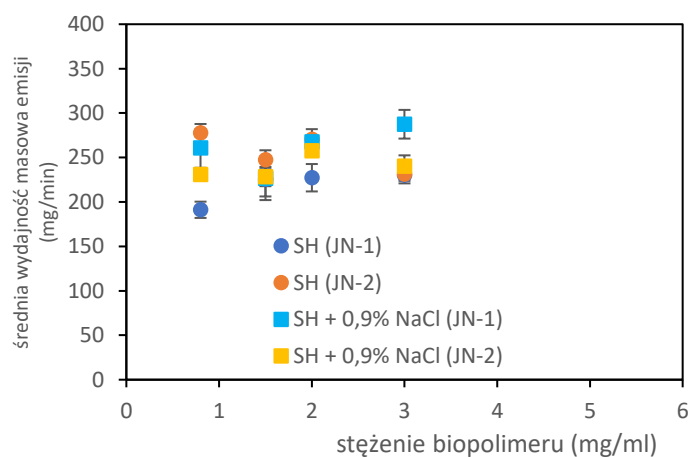
Rys. 10.Z.2. Krzywe płynięcia roztworów leków inhalacyjnych (po lewej) i ich zawiesin (po prawej) w 25°C.



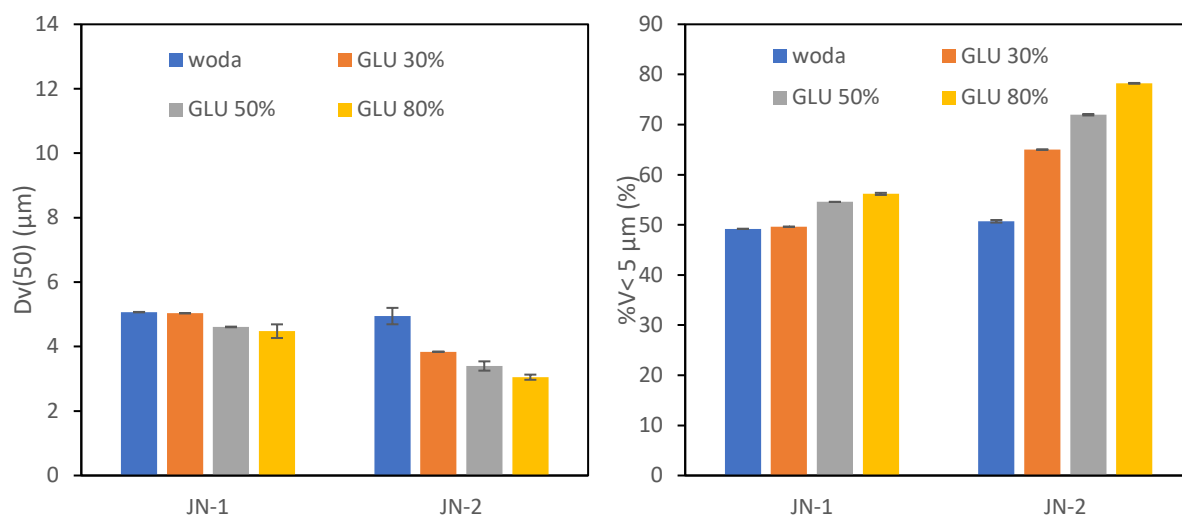
Rys. 10.Z.3. Badanie morfologii cząstek API w lekach oryginalnych Z5 i Z6



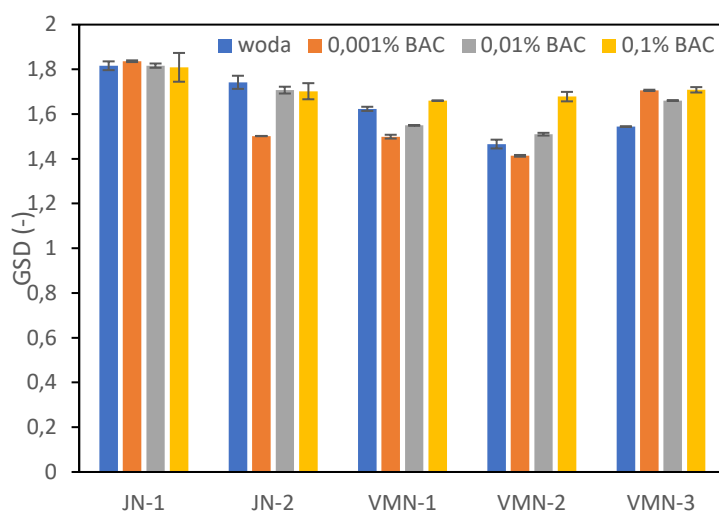
Rys. 10.Z.4. Krzywe płynięcia roztworów wodnych agaru (AG - po lewej) i gumy ksantanowej (XG - po prawej) w 25°C



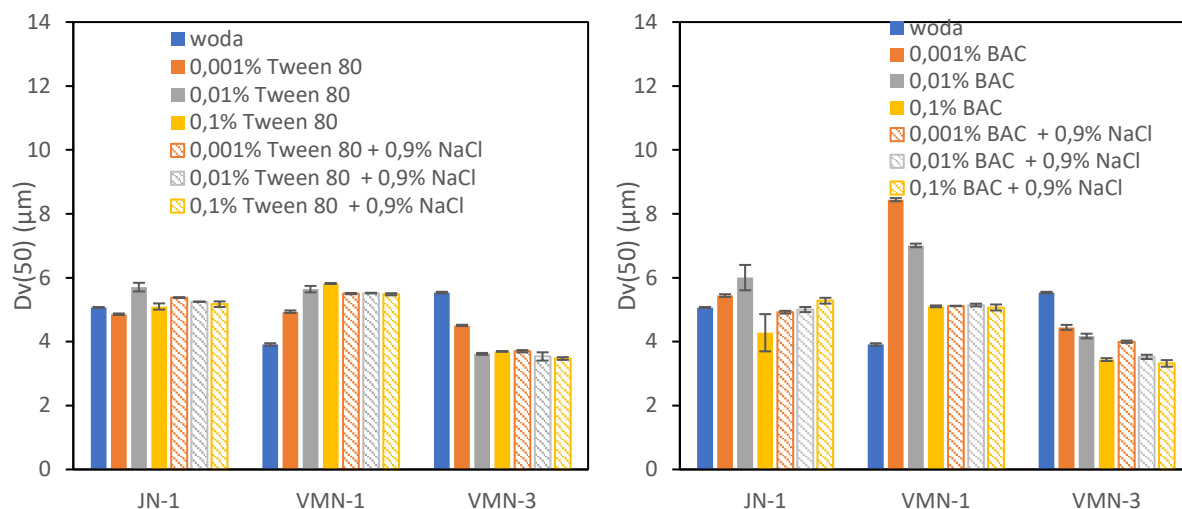
Rys. 10.Z.5. Średnia masowa wydajność wyemitowanej dawki podczas 4-minutowej nebulizacji w wybranych urządzeniach pneumatycznych w funkcji stężenia hialuronianu sodu



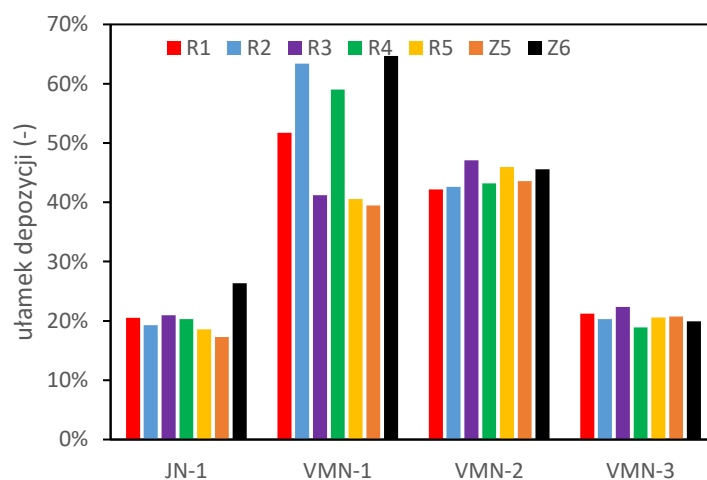
Rys. 10.Z.6. Średnica $Dv(50)$ kropeł (po lewo) i udział objętościowy frakcji kropeł drobnych (po prawo) emitowanych z dwóch nebulizatorów pneumatycznych na przykładzie roztworów glukozy.



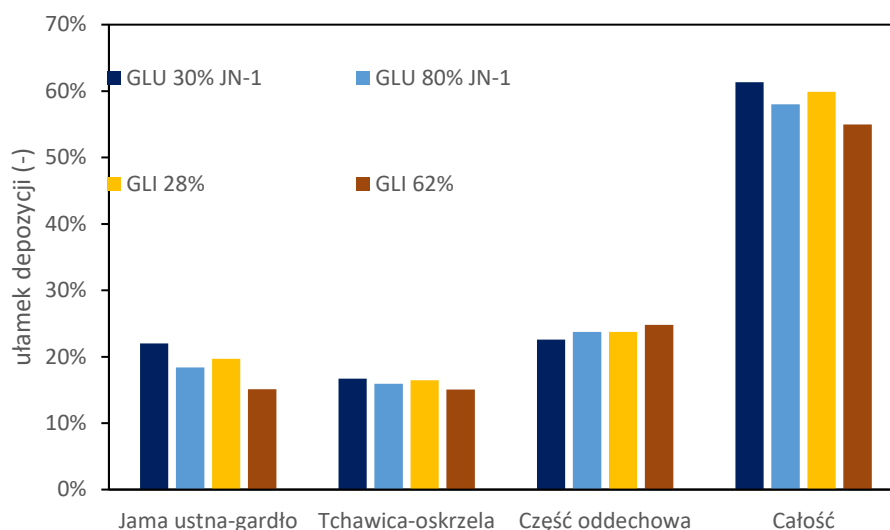
Rys. 10.Z.7. Geometryczne odchylenie standardowe rozkładu wielkości kropeł emitowanych z dwóch nebulizatorów pneumatycznych i trzech siateczkowych na przykładzie roztworów chlorku benzalkoniowego



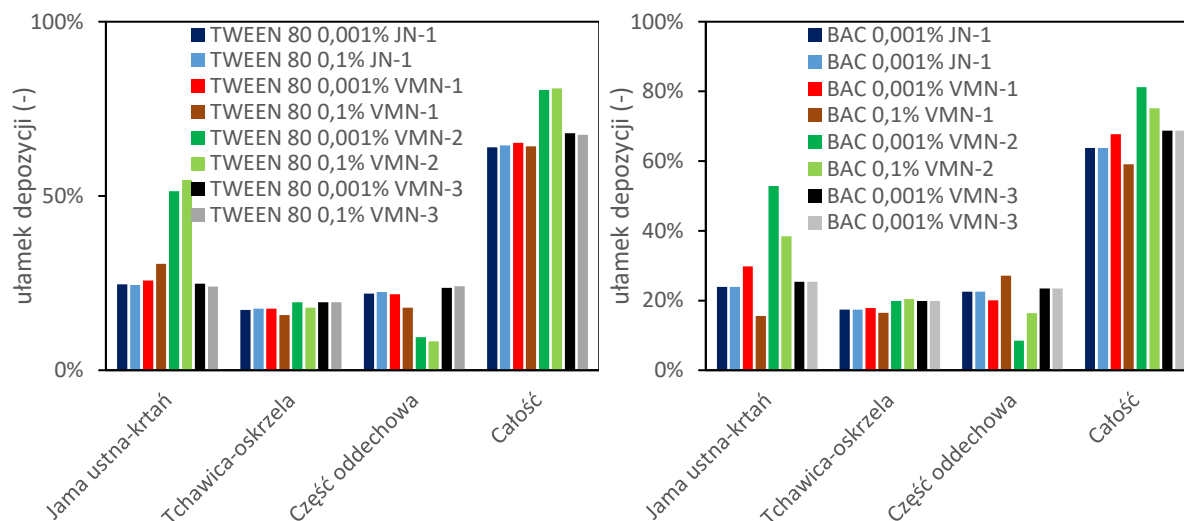
Rys. 10.Z.8. Średnica $Dv(50)$ kropeł emitowanych z nebulizatora pneumatycznego i dwóch nebulizatorów siateczkowych na przykładzie roztworów wodnych i w soli fizjologicznej Tweenu 80 (po lewej) i BAC (po prawej).



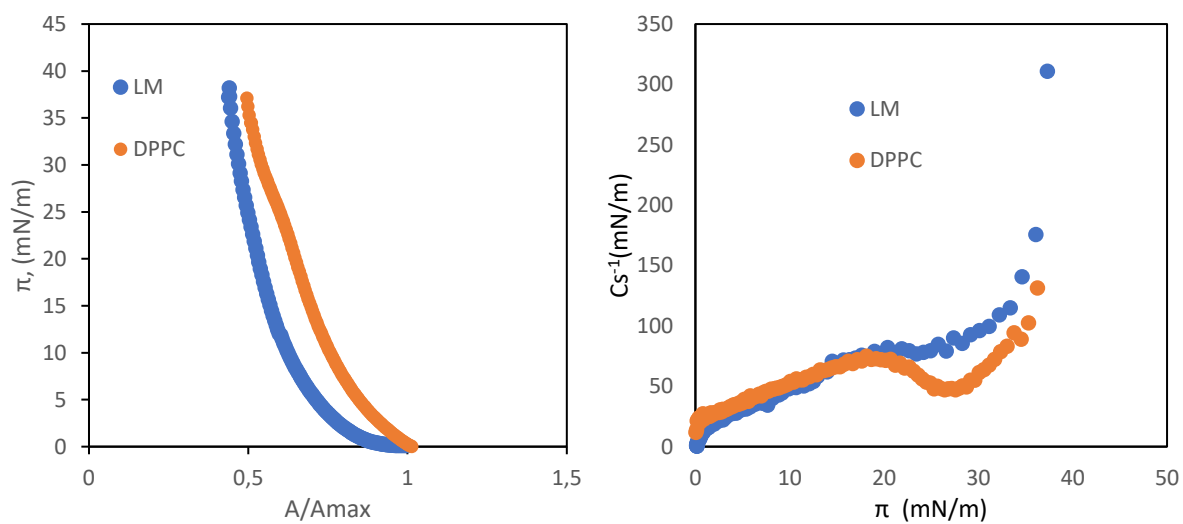
Rys. 10.Z.9. Ułamek depozycji kropeł zawierających leki inhalacyjne w postaci roztworu R1-R5 oraz zawiesiny Z5-Z6 przy użyciu wybranych nebulizatorów w odniesieniu do górnych dróg oddechowych.



Rys. 10.Z.10. Porównanie ułamków depozycji kropeł aerozolu substancji modyfikujących lepkość (glukozy i gliceryny) rozpraszanych w JN-1 w poszczególnych odcinkach układu oddechowego.



Rys. 10.Z.11. Porównanie ułamków depozycji kropeł aerozolu syntetycznych surfaktantów: Tween 80 (po lewej) i BAC (po prawej) rozpraszanych w nebulizatorach w poszczególnych odcinkach układu oddechowego



Rys. 10.Z.12. Izoterma kompresji (po lewej) i zależność współczynnika ściśliwości (po prawej) powierzchni międzyfazowej woda-powietrze w obecności DPPC oraz DPPC i cholesterolu (8:2) w temperaturze fizjologicznej

Tab. 10.Z.1. Średnie wartości parametrów aerozolowych ($Dv(50)$, GSD i $\%V<5\mu m$) mgieł wytworzonych poprzez rozpylanie wodnych roztworów i w soli fizjologicznej wybranych modyfikatorów lepkości przy pomocy JN-1 i JN-2

Hialuronian sodu (SH)						
stężenie polisacharydu (mg/ml)	JN-1			JN-2		
	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)
0,8	4,33±0,06	1,84±0,01	58,33±0,91	4,39±0,26	1,76±0,01	58,32±3,71
1,5	4,58±0,09	1,88±0,02	54,93±1,20	4,53±0,22	1,76±0,02	56,28±3,11
2	4,66±0,06	1,89±0,01	53,97±0,72	4,36±0,28	1,73±0,01	58,90±4,35
3	4,87±0,15	1,83±0,01	51,64±1,84	4,28±0,27	1,72±0,01	60,20±4,25
4	4,62±0,08	1,81±0,01	54,74±1,04	4,20±0,28	1,72±0,01	61,51±4,45
Hialuronian sodu (SH) + 0,9% NaCl						
stężenie polisacharydu (mg/ml)	JN-1			JN-2		
	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)
0,8	4,74±0,15	1,99±0,17	52,98±1,75	4,07±0,20	1,76±0,02	62,90±3,04
1,5	5,03±0,30	1,90±0,06	49,86±3,15	4,03±0,25	1,76±0,02	63,61±3,84
2	4,71±0,18	1,87±0,03	53,49±2,15	4,35±0,26	1,79±0,03	58,59±3,71
3	4,55±0,11	1,89±0,03	55,34±1,39	4,38±0,04	1,79±0,01	58,12±0,50
4	5,16±0,11	1,90±0,01	48,29±1,13	4,17±0,21	1,77±0,01	61,31±3,09
Agar (AG)						
stężenie polisacharydu (mg/ml)	JN-1			JN-2		
	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)
0,8	4,45±0,13	1,80±0,02	57,00±1,60	4,57±0,34	1,76±0,02	55,87±4,79
1,5	4,57±0,23	1,78±0,01	55,61±3,09	4,43±0,15	1,72±0,02	57,94±2,24
2	4,84±0,23	1,80±0,05	52,13±2,87	4,62±0,09	1,77±0,02	54,96±1,23
3	4,78±0,20	1,78±0,03	53,48±2,55	4,42±0,02	1,74±0,01	57,89±0,38
Agar (AG) + 0,9% NaCl						
stężenie polisacharydu (mg/ml)	JN-1			JN-2		
	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)
0,8	4,08±0,26	1,87±0,02	61,29±3,36	4,24±0,39	1,80±0,06	60,49±6,30
1,5	4,44±0,14	1,82±0,02	56,89±1,77	4,32±0,37	1,78±0,04	59,43±5,83
2	3,96±0,28	1,85±0,01	63,28±3,92	4,42±0,03	1,81±0,02	57,46±0,56
3	4,83±0,22	1,88±0,03	52,08±2,61	4,27±0,31	1,78±0,03	59,92±4,78
Guma ksantanowa (XG)						
stężenie polisacharydu (mg/ml)	JN-1			JN-2		
	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)
0,8	5,56±0,11	1,72±0,02	43,14±1,25	4,28±0,07	1,60±0,02	61,77±1,30
1,5	5,59±0,23	1,77±0,05	42,60±2,44	4,21±0,16	1,61±0,02	62,90±2,84
2	5,81±0,27	1,83±0,02	41,35±2,65	4,27±0,16	1,61±0,02	61,79±2,74
3	5,56±0,12	1,81±0,03	43,87±1,30	4,21±0,12	1,60±0,05	62,99±2,31
4	5,47±0,17	1,81±0,08	44,80±1,53	4,15±0,12	1,60±0,04	64,25±2,30
Guma ksantanowa (XG) + 0,9% NaCl						
stężenie polisacharydu (mg/ml)	JN-1			JN-2		
	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)	$Dv(50)$ (μm)	GSD (-)	$\%V<5\mu m$ (%)
0,8	5,26±0,12	1,84±0,03	47,16±1,25	4,25±0,25	1,69±0,02	61,08±4,04
1,5	5,32±0,19	1,88±0,05	46,66±2,44	3,84±0,05	1,66±0,01	67,84±0,80
2	5,60±0,05	1,80±0,01	43,22±2,65	4,16±0,16	1,66±0,02	62,74±2,76
3	4,55±0,03	1,83±0,02	55,48±1,30	3,87±0,14	1,69±0,03	66,99±2,79
4	4,39±0,04	1,88±0,01	57,21±1,53	3,89±0,22	1,67±0,02	67,13±4,15

Tab. 10.Z.2. Średnia masowa wydajność wyemitowanej dawki wodnych roztworów L-leucyny i escyny oraz roztworów w soli fizjologicznej podczas 4-minutowej nebulizacji w wybranych urządzeniach medycznych

substancja	napięcie powierzchniowe (mN/m)	JN-1	VMN-1	substancja	napięcie powierzchniowe (mN/m)	JN-1	VMN-1
woda	71,7±0,32	721,33 ±36,09	202,87 ±46,56	woda	71,7±0,32	721,33 ±36,09	202,87 ±46,56
0,004375% Esc	68,5±0,2	356,55 ±16,03	574,07 ±80,28	0,9% Leu	68,67±0,57	575,3± 91,13	389,83 ±59,28
0,0175% Esc	45,69±0,11	425,45 ±20,09	568,61 ±80,28	1,1% Leu	70,72±0,3	101,5± 8,04	276,08 ±7,02
0,9% NaCl	70,82±1,03	724,41 ±17,5	422,69 ±18,95	0,9% NaCl	70,82±1,03	724,41 ±17,5	422,69 ±18,95
0,004375% Esc + 0,9% NaCl	55,38±0,66	282,85 ±9,44	728,01 ±43,09	0,9% Leu + 0,9% NaCl	70,12±0,12	493,2± 47,17	250,97 ±19,85
0,0175% Esc + 0,9% NaCl	47,35±0,46	363,38 ±15,3	704,12 ±17,22	1,1% Leu + 0,9% NaCl	69,76±0,18	285,96 ±10,98	275,84 ±35,65

Tab. 10.Z.3. Właściwości aerodynamiczne chmur aerozolowych otrzymanych w wyniku rozpraszania wodnych mieszanin lecytyny sojowej i escyny oraz ich mieszanin w soli fizjologicznej emitowanych z dwóch nebulizatorów pneumatycznych i trzech siateczkowych

Lecytyna sojowa							
stężenie*	Nebulizator	Dv(50) (μm)		GSD (-)		%V<5μm (%)	
		woda	0,9% NaCl	woda	0,9% NaCl	woda	0,9% NaCl
0,025% (w/v)	JN-1	4,88±0,10	5,28±0,06	1,88±0,001	1,96±0,006	51,38±1,09	47,07±0,58
	JN-2	3,82±0,19	3,50±0,02	1,76±0,036	1,86±0,022	66,63±2,59	70,71±0,25
	VMN-1	7,40±0,14	6,28±0,04	1,60±0,006	1,72±0,008	23,40±0,81	35,79±0,25
	VMN-2	14,13±0,34	11,80±0,13	1,49±0,013	1,69±0,045	0,42±0,04	7,10±1,42
	VMN-3	6,63±0,69	5,68±0,13	1,56±0,021	1,57±0,011	29,45±7,30	40,15±1,73
0,03% (w/v)	JN-1	5,15±0,24	5,29±0,01	1,93±0,054	1,93±0,003	48,38±2,60	47,00±0,08
	JN-2	3,68±0,13	3,51±0,01	1,80±0,001	1,84±0,004	68,38±1,97	70,66±0,08
	VMN-1	7,69±0,25	6,22±0,06	1,58±0,012	1,74±0,020	20,78±2,13	36,59±0,70
	VMN-2	12,77±0,32	11,86±0,18	1,57±0,016	1,63±0,012	2,08±0,37	6,27±0,45
	VMN-3	6,01±0,17	5,65±0,07	1,58±0,073	1,56±0,002	36,13±3,45	40,51±0,86
0,05% (w/v)	JN-1	4,90±0,02	5,03±0,05	1,93±0,002	1,93±0,002	51,16±0,24	49,67±0,52
	JN-2	3,57±0,01	3,26±0,01	1,82±0,003	1,82±0,019	69,89±0,05	74,55±0,17
	VMN-1	8,48±0,07	6,28±0,01	1,57±0,022	1,72±0,008	15,55±0,49	35,82±0,14
	VMN-2	9,40±0,20	11,74±0,13	1,92±0,103	1,64±0,023	18,97±1,52	6,39±0,19
	VMN-3	5,99±0,19	5,47±0,03	1,56±0,102	1,55±0,018	36,32±2,44	42,64±0,37
0,3% (w/v)	JN-1	4,82±0,07	5,04±0,14	1,90±0,042	2,04±0,156	52,16±0,90	49,66±1,39
	JN-2	3,10±0,01	3,27±0,06	1,77±0,001	1,83±0,021	78,18±0,18	74,27±0,99
	VMN-1	8,46±0,05	6,22±0,03	1,55±0,006	1,73±0,002	15,15±0,09	36,46±0,24
	VMN-2	12,93±0,18	11,47±0,07	1,55±0,001	1,64±0,015	2,21±0,19	7,06±0,33
	VMN-3	6,09±0,16	5,52±0,04	1,57±0,013	1,55±0,001	35,04±1,87	42,08±0,49
Escyna							
stężenie*	Nebulizator	Dv(50) (μm)		GSD (-)		%V<5μm (%)	
		woda	0,9% NaCl	woda	0,9% NaCl	woda	0,9% NaCl
0,004375% (w/v)	JN-1	5,52±0,01	4,95±0,05	1,85±0,001	2,03±0,151	44,18±0,12	50,50±0,48
	JN-2	3,89±0,03	3,69±0,09	1,68±0,011	1,84±0,032	67,15±0,3	67,98±1,71
	VMN-1	9,10±0,03	6,30±0,04	1,59±0,001	1,74±0,002	12,94±0,12	35,95±0,38
	VMN-2	14,27±0,3	12,56±0,26	1,63±0,023	1,67±0,014	2,46±0,09	5,47±0,80
	VMN-3	7,62±0,06	5,61±0,40	1,54±0,014	1,67±0,114	19,40±0,89	41,83±5,64
0,00875% (w/v)	JN-1	5,46±0,01	4,73±0,02	1,86±0,003	1,93±0,014	44,86±0,16	52,95±0,25
	JN-2	4,10±0,03	3,43±0,02	1,71±0,009	1,80±0,006	63,22±0,69	72,02±0,28
	VMN-1	8,49±0,66	6,38±0,03	1,60±0,001	1,78±0,002	14,67±0,22	35,59±0,21
	VMN-2	14,62±0,11	12,42±0,01	1,64±0,002	1,64±0,003	2,25±0,02	5,16±0,14
	VMN-3	7,44±0,04	5,2±0,47	1,54±0,003	1,74±0,123	20,67±0,53	46,70±6,34
0,0175% (w/v)	JN-1	5,57±0,17	4,86±0,03	1,87±0,004	1,93±0,001	43,76±1,84	51,48±0,04
	JN-2	3,84±0,02	4,35±0,11	1,69±0,018	1,87±0,002	67,61±0,35	58,22±1,54
	VMN-1	9,38±0,09	6,49±0,03	1,57±0,020	1,78±0,002	11,59±0,71	34,84±0,21
	VMN-2	14,00±0,38	12,00±0,04	1,59±0,007	1,65±0,002	2,17±0,23	5,51±0,08
	VMN-3	7,46±0,11	5,46±0,36	1,54±0,006	1,67±0,13	20,46±0,63	43,65±5,05
0,035% (w/v)	JN-1	5,79±0,12	5,03±0,03	1,88±0,011	2,01±0,001	41,56±1,27	49,69±0,35
	JN-2	4,09±0,05	4,39±0,06	1,71±0,001	1,85±0,018	63,47±0,89	57,68±0,76
	VMN-1	9,09±0,03	6,48±0,09	1,58±0,001	1,79±0,049	12,92±0,09	34,88±0,91
	VMN-2	13,93±0,01	12,33±0,21	1,62±0,004	1,64±0,002	3,23±0,10	5,00±0,38
	VMN-3	7,01±0,28	5,72±0,05	1,53±0,038	1,60±0,008	24,42±3,46	40,11±0,44

* Wartość stężenia w mieszaninie dotyczy zawartości lecytyny sojowej i escyny

Tab. 10.Z.4. Oszacowane wartości stężeń zdeponowanych w obszarze pęcherzyków płucnych dawek leków, substancji modelowych i modyfikatorów lepkości pochodzenia naturalnego wyrażone w ml dodatku/ ml mieszaniny

Leki inhalacyjne							
Nazwa	R1	R2	R3	R4	R5	Z-5	Z-6
JN-1	0,016	0,016	0,015	0,016	0,017	0,016	0,014
VMN-1	0,006	0,003	0,010	0,004	0,011	0,011	0,002
VMN-2	0,010	0,009	0,008	0,009	0,008	0,009	0,009
VMN-3	0,017	0,017	0,016	0,018	0,017	0,017	0,017
Leki inhalacyjne							
Nazwa	Z-1		Z-2		Z-3		Z-4
JN-1	0,016		0,015		0,016		0,016
VMN-2	0,015		0,015		0,015		0,016
Substancje modelowe							
Nazwa	0,9% NaCl	5% NaCl	Tween 80 0,001%	Tween 80 0,1%	BAC 0,001%	BAC 0,1%	
JN-1	0,015	0,016	0,015	0,015	0,015	0,016	
VMN-1	0,017	0,016	0,015	0,012	0,013	0,018	
VMN-2	0,008	0,008	0,006	0,006	0,006	0,011	
VMN-3	0,017	0,017	0,016	0,016	0,016	0,018	
Modyfikatory lepkości							
początkowe stężenie biopolimeru w cieczy poddanej atomizacji			XG (JN-1)	XG+ 0,9% NaCl (JN-1)	XG (JN-2)	XG+ 0,9% NaCl (JN-2)	
0,8			0,018	0,018	0,019	0,018	
1,5			0,016	0,015	0,019	0,019	
2			0,015	0,015	0,019	0,019	
3			0,016	0,017	0,019	0,019	
4			0,016	0,017	0,019	0,019	
początkowe stężenie biopolimeru w cieczy poddanej atomizacji			AG (JN-1)	AG+ 0,9% NaCl (JN-1)	AG (JN-2)	AG+ 0,9% NaCl (JN-2)	
0,8			0,017	0,017	0,017	0,017	
1,5			0,017	0,017	0,018	0,017	
2			0,017	0,017	0,017	0,017	
3			0,017	0,016	0,018	0,018	
początkowe stężenie biopolimeru w cieczy poddanej atomizacji			SH (JN-1)	SH+ 0,9% NaCl (JN-1)	SH (JN-2)	SH+ 0,9% NaCl (JN-2)	
0,8			0,017	0,015	0,018	0,018	
1,5			0,016	0,016	0,017	0,018	
2			0,016	0,016	0,018	0,017	
3			0,016	0,016	0,018	0,017	

Tab. 10.Z.5. Quasi-równowagowa wartość napięcia powierzchniowego na granicy faz ciecz-gaz w obecności modelu surfaktantu płucnego MPS Infasurf® oraz wybranych leków inhalacyjnych

Substancja	Quasi-równowagowe napięcie powierzchniowe (mN/m)	Substancja	Quasi-równowagowe napięcie powierzchniowe (mN/m)
MPS Infasurf®	32,07±0,21		
R1	26,38±0,57	R5	26,16±0,52
R2	27,62±0,18	Z5	25,01±0,15
R4	24,49±0,12	Z6	26,67±0,56

SPIS PUBLIKACJI

Publikacje w czasopismach z listy filadelfijskiej:

1. Dobrowolska K., Jabłczyńska K., Kondej D., Sosnowski T.R., *Interactions of insoluble micro- and nanoparticles with the air-liquid interface of the model pulmonary fluids*, Physicochemical Problems of Mineral Processing, 54, 151-162 (2018)
2. Sosnowski T.R., Rapijko P., Sova J., Dobrowolska K.; *Impact of physicochemical properties of nasal spray products on drug deposition and transport in the pediatric nasal cavity model*; International Journal of Pharmaceutics, 574, 1-10 (2020)
3. Dobrowolska K., Sosnowski T.R., *Evolution of droplet size distribution in selected nebulizers*; Physicochemical Problems of Mineral Processing, 2020, 56, 6 Special Issue. In honour to Professor Zygmunt Sadowski, 32-40 (2020)
4. Odziomek M., Ulatowski K., Dobrowolska K., Górniak I., Sobieszuk P., Sosnowski T.R.; *Aqueous dispersions of oxygen nanobubbles for potential application in inhalation therapy*; Scientific Reports, 12:12455 (2022)
5. Dobrowolska K., Odziomek M., Ulatowski K., Kędziora W., Soszyńska K., Sobieszuk P., Sosnowski T.R.; *Interactions between O₂ nanobubbles and the pulmonary surfactant in the presence of inhalation medicines*; Materials, 15(18), 6353; (2022)
6. Dobrowolska K., Emeryk, A., Janeczek, K., Krzosa, R., Pirożyński, M., Sosnowski, T.R., *Influence of Physicochemical Properties of Budesonide Micro-Suspensions on Their Expected Lung Delivery Using a Vibrating Mesh Nebulizer*, Pharmaceutics, 15, 752 (2023).
7. Dobrowolska K., Miros M., Sosnowski T.R., . *Impact of Natural-Based Viscosity Modifiers of Inhalation Drugs on the Dynamic Surface Properties of the Pulmonary Surfactant*. Materials, 16, 1975 (2023).

Publikacje w czasopismach spoza listy filadelfijskiej:

1. Dobrowolska K., Sosnowski T.R., *Zmiany ściśliwości powierzchniowej w układzie woda-powietrze zawierającym DPPC i wielościennie nanorurki węglowe*, Inżynieria i Aparatura Chemiczna, 56, 114-115 (2017)
2. Dobrowolska K., Szamer K., Sosnowski T.R., *Badania właściwości reologicznych sztucznego śluzu oskrzelowego i ich wpływu na transport masy w układzie oddechowym*, Inżynieria i Aparatura Chemiczna, 57, 55-56 (2018)
3. Dobrowolska K., Sosnowski T.R., *Depozycja i oddziaływanie leków inhalacyjnych z powierzchnią płuc – badania modelowe*, Inżynieria i Aparatura Chemiczna, 57, 53-54 (2018)

4. Dobrowolska K., Sosnowski T.R.; *Sodium hyaluronate as a potential viscosity modifier of nebulization drugs – preliminary studies*; Chemical and process engineering for the environment and health, Radom, Instytut Technologii Eksploatacji - Państwowy Instytut Badawczy, 166-174, ISBN 978-83-7789-629-7 (2020)
5. Dobrowolska K., Antonowicz A., Sosnowski T.R., *Two-dimensional LDA analysis of droplet velocity in aerosol clouds emitted from medical nebulizers*; Chemical and process engineering for the environment and health, Radom, Instytut Technologii Eksploatacji - Państwowy Instytut Badawczy, 158-165, ISBN 978-83-7789-629-7 (2020)
6. Sosnowski T.R., Dobrowolska K.; *Aerodynamically driven translocation of non-Newtonian fluids: the relevance for intranasal drug delivery*; Chemical Engineering Transactions, 86, 1207-1212 (2021)
7. Sosnowski T.R., Dobrowolska K.; *Wybrane zagadnienia fizykochemii koloidów w procesach inhalacyjnego dostarczania leków do płuc*; Wiadomości Chemiczne, 75, 9-10, 1375-1393 (2021)
8. Sosnowski T.R., Dobrowolska K.; *Aerodynamically driven translocation of non-Newtonian fluids: the relevance for intranasal drug delivery*; Chemical Engineering Transactions, 86, 1207-1212 (2021)