

Marcin Płaczek

**BIOADHEZYJNY LIOFILIZAT DOPOLICZKOWY
O PRZEDŁUŻONYM UWALNIANIU SUBSTANCJI LECZNICZEJ**

Praca wykonana

**w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej
Akademii Medycznej w Gdańsku**

i przedstawiona

Radzie Wydziału Farmaceutycznego

w celu uzyskania stopnia

doktora nauk farmaceutycznych

Promotor rozprawy:

prof. dr hab. Małgorzata Sznitowska

Badania częściowo finansowane przez:

**Fundację Rozwoju Nauk Farmaceutycznych
(Grant nr 4/FB/2004)**

Gdańsk 2008

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	6
I. WSTĘP	11
Jama ustna jako miejsce podania leku.....	12
Dopoliczkowe formy leku	16
Bioadhezja.....	18
Teorie mukoadhezji.....	19
Badania mukoadhezji.....	22
Polimery mukoadhezyjne	27
Liofilizaty doustne	32
Charakterystyka systemów mikrozbiorników	38
Nowoczesne formy leku z selegiliną	41
II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY	47
III. METODYKA	50
1. Wykaz używanych skrótów.....	50
2. Aparatura, odczynniki i materiały	52
2.1. Aparatura	52
2.2. Odczynniki.....	53
2.3. Materiały	54
3. Otrzymywanie mikrozbiorników z chlorowodorkiem selegiliny.....	56
3.1. Powlekane peletki	56
3.1.1. Otrzymywanie rdzeni peletek	56
3.1.2. Powlekanie rdzeni peletek	56
3.2. Mikrosfery.....	57
3.3. Sיעiowany mikrogranulat.....	57
3.3.1. Mikrogranulat z sieciowanego alginianu wapnia.....	57
3.3.2. Mikrogranulat z sieciowanej pektyny	58
3.4. Powlekany sieciowany mikrogranulat	59
4. Badania mikrozbiorników z chlorowodorkiem selegiliny	60
4.1. Badania mikroskopowe	60
4.2. Badanie zawartości chlorowodoru selegiliny.....	60
4.3. Badanie uwalniania substancji leczniczej z mikrozbiorników	61
5. Otrzymywanie krążków liofilizowanych	63
5.1. Krążki liofilizowane placebo.....	63

5.2. Krążki liofilizowane zawierające chlorowodorek selegiliny w formie substancji	64
5.3. Krążki liofilizowane zawierające mikrozbiorniki z chlorowodorkiem selegiliny	65
5.3.1. Liofilizaty zawierające powlekane peletki lub mikrosfery	65
5.3.2. Liofilizaty zawierające niepowlekany mikrogranulat sieciowany	65
5.3.3. Liofilizaty zawierające powlekany mikrogranulat z sieciowanej pektyny ..	66
5.4. Krążki liofilizowane zawierające zasadę selegiliny.....	66
5.4.1. Otrzymywanie zasady selegiliny	66
5.4.2. Liofilizaty zawierające zasadę selegiliny w formie wolnej	67
5.4.3. Liofilizaty zawierające zasadę selegiliny w mikrokapsułkach z etylocelulozy tworzonych „in situ”	67
6. Badania krążków liofilizowanych.....	69
6.1. Ocena wizualna krążków liofilizowanych	69
6.2. Badanie mukoadhezji w warunkach in vitro	69
6.2.1. Rodzaje badanych układów	69
6.2.2. Warunki badania mukoadhezji	71
6.2.3. Analiza danych pomiarowych.....	73
6.3. Badanie uwalniania selegiliny z krążków liofilizowanych.....	76
6.4. Badanie przenikania selegiliny przez błonę śluzową policzka świni w warunkach in vitro	78
6.4.1. Błona śluzowa.....	78
6.4.2. Komory dyfuzyjne	78
6.4.3. Faza donora.....	78
6.4.4. Badanie przenikania	80
7. Analiza ilościowa chlorowodorku selegiliny.....	81
7.1. Analiza ilościowa metodą spektrofotometryczną.....	81
7.2. Analiza ilościowa metodą HPLC.....	82
IV. WYNIKI.....	85
Ocena właściwości mikrozbiorników zawierających ChS.....	85
Peletki powlekane.....	85
Mikrosfery	87
Sieciowany mikrogranulat	87
Ocena właściwości mukoadhezyjnych polimerów tworzących matrycę krążka liofilizowanego.....	92
Właściwości krążków liofilizowanych zawierających ChS w formie substancji lub mikrozbiorników	98
Właściwości krążków liofilizowanych zawierających zasadę selegiliny	106

Przenikanie selegiliny przez błonę śluzową policzka świni	112
V. OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	117
VI. WNIOSKI.....	132
VII. PIŚMIENICTWO.....	135

STRESZCZENIE

Droga doustna wciąż pozostaje najpopularniejszym sposobem podania leków, co wynika zarówno z preferencji pacjentów (proste, szybkie, dyskretne i bezbolesne zażycie dawki leku), jak i lekarzy, którzy dzięki prostej aplikacji stosunkowo łatwo mogą kontrolować farmakoterapię i budować dobrą współpracę z leczonym.

Aktualnie coraz częściej proponuje się postaci leku, dla których miejscem wchłaniania może być jama ustna. Jest to szczególnie istotnie dla substancji leczniczych charakteryzujących się niską dostępnością biologiczną po podaniu doustnym na skutek silnego metabolizmu wątrobowo – jelitowego. Do takich substancji, zalicza się np. selegilinę, stosowaną w leczeniu choroby Parkinsona. W przypadku tej substancji większą skuteczność terapeutyczną można uzyskać stosując alternatywną drogę jej podania – przez skórę lub błony śluzowe.

Błona śluzowa jamy ustnej wyróżnia się jako korzystne miejsce podania leku. Charakteryzuje się ona bowiem nie tylko łatwym dostępem, ale także dobrym unaczynieniem, co pozwala na szybkie wchłanianie substancji leczniczej do krwiobiegu, najczęściej z ograniczeniem efektu pierwszego przejścia. Ta droga podania leku posiada jeszcze jedną istotną przewagę nad tradycyjnym podaniem doustnym, ponieważ eliminuje konieczność połykania tabletki lub kapsułki. Ma to olbrzymie znaczenie dla pacjentów cierpiących na dysfagię – częste powikłanie towarzyszące chorobie Parkinsona.

Chociaż w ciągu ostatnich kilku lat na rynku pojawiły się dwa nowoczesne preparaty selegiliny umożliwiające jej wygodną aplikację – szybko rozpadający się w jamie ustnej liofilizat (Otraseł, Zelapar) oraz system transdermalny (Emsam), w dalszym ciągu w leczeniu choroby Parkinsona brakuje formy doustnej zapewniającej przedłużone działanie tego leku. Podjęto więc próbę opracowania metody sporządzania adhezyjnego preparatu dopoliczkowego, w formie krążka liofilizowanego, który dozowałby selegilinę (w dawce ok. 10 mg) do błony śluzowej przez okres 4–6 h, ze stałą szybkością, niezależnie od składników użytych do utworzenia matrycy. Efekt ten można było uzyskać tylko poprzez wprowadzenie do krążka mikroziarników z substancją leczniczą.

Pierwszy etap pracy miał na celu wyłonienie grupy polimerów o odpowiednich właściwościach mechanicznych oraz mukoadhezyjnych, które mogłyby stanowić matrycę krążka liofilizowanego. Właściwości mukoadhezyjne krążków liofilizowanych badano w warunkach *in vitro*, używając analizatora tekstury wyposażonego w przystawkę A/Muc i warstwy żelatyny lub mucyny, jako substytutu błony śluzowej.

Konieczne było opracowanie metodyki prowadzenia badania, uwzględniającej specyfikę analizowanych preparatów oraz sposobu analizy danych pomiarowych uzyskiwanych w czasie testów. Wartością ilościowo określającą siłę wiązania polimeru z błoną śluzową była praca mukoadhezji [μJ], którą oznaczano nie tylko dla polimerów w formie krążków, ale także roztworów (żeli) i tabletkowanych dysków. Do badań wytypowano takie polimery jak: Carbopol, Gantrez MS 955, Orabase, pektyna, karmeloza sodowa, hydroksyetyloceluloza i alginian sodu.

Przeprowadzone badania wykazały, że niezależnie od postaci farmaceutycznej polimeru, do grupy o najlepszych właściwościach mukoadhezyjnych zaliczają się: karmeloza sodowa, Orabase i Carbopol, a najwyższe wartości pracy mukoadhezji oznaczano dla formy krążków przy pomiarach z zastosowaniem 10% mucyny. Zawieszenie w matrycy krążka mikrocząstek placebo, a także zgniatanie krążka przed pomiarem, symulujące warunki w trakcie aplikacji, nie ograniczało siły jego adhezji. Odpowiednie właściwości mukoadhezyjne krążków placebo z Carbopolu i Orabase zostały potwierdzone także w badaniu *in vivo* na 5 ochotnikach. Umieszczenie krążków w jamie ustnej zapewniało ich adhezję do błony śluzowej na czas do 6 h.

Z udziałem polimerów wytypowanych w badaniu mukoadhezji (Carbopol, karmeloza sodowa i Orabase oraz dodatkowo hypromeloza i metyloceluloza) przygotowano krążki, do których inkorporowano chlorowoderek selegiliny (ChS) w formie „wolnej” substancji. W wyniku liofilizacji otrzymano preparaty o zadowalających właściwościach mechanicznych (z wyjątkiem krążków, których matrycę stanowiła metyloceluloza i hypromeloza o dużej lepkości) oraz adhezyjnych. Tak, jak się spodziewano, szybkość uwalniania ChS z tej formy krążków zależała od polimeru tworzącego ich matrycę, a efekt przedłużonego uwalniania (4–6 h) uzyskano tylko dla form tworzonych z karmelozy sodowej i Orabase. Potwierdzono tym samym konieczność opracowania systemu wielokompartimentowego, w którym o kinetyce uwalniania będą decydowały mikroziorniki zawierające ChS. W trosce o komfort pacjenta ustalono, że cząstki te nie powinny przekraczać wielkości 200 μm .

W kolejnym etapie badań sporządzano więc mikroziorniki z ChS w formie powlekanych peletek, mikrosfer (w obu postaciach polimerem kontrolującym uwalnianie była etyloceluloza) oraz mikrogranulatów z polimerów sieciowanych: alginianu wapnia i pektynianu cynku. Chociaż otrzymane cząstki, niezależnie od metody ich przygotowania charakteryzowały się przedłużonym uwalnianiem substancji leczniczej (nawet do 24 h), okazało się, że nie wszystkie z nich mogą być pomyślnie inkorporowane do matrycy krążków liofilizowanych. Mikrogranulat z sieciowanej pektyny wykazywał niezgodność w trakcie łączenia z żelalem mukoadhezyjnym Carbopolu i Orabase, natomiast rozmiar powlekanych peletek (315 – 630 μm) był

przyczyną ich sedymentacji w matrycy mukoadhezyjnej oraz ograniczał możliwość ich zastosowania w postaci aplikacyjnej, z powodu wyczuwalnej ziarnistości. Krążki dobrej jakości otrzymano natomiast inkorporując w matrycy Carbopolu mikrosfery z etylocelulozy.

Badanie dostępności farmaceutycznej ChS z krążków zawierających mikroziorniki wykazało, że żaden z analizowanych układów nie spełnia założeń pracy, ponieważ szybkość uwalniania z matrycy mukoadhezyjnej nie była właściwie kontrolowana. Hydrożel utworzony z krążka z Carbopolu spowalniał szybkość uwalniania ChS zarówno z mikrosfer (w ciągu 24 h uwolniło się zaledwie ok. 40% dawki), jak również z powlekanych peletek, natomiast zjawisko odwrotne – wzrost szybkości uwalniania obserwowano dla wszystkich preparatów zawierających sieciowany mikrogranulat.

Niepowodzenia w otrzymywaniu krążków liofilizowanych zawierających ChS, w formie wolnej oraz mikroziorników, spowodowały, że zdecydowano o zmianie postaci chemicznej substancji leczniczej na zasadę (ZS). Z powodu jej właściwości fizykochemicznych (oleista ciecz o charakterystycznym zapachu) konieczne było opracowanie nowej techniki tworzenia mikroziorników izolujących selegilinę od liofilizowanego krążka. Zdecydowano, że etap tworzenia mikrokapsulek z ZS oraz ich inkorporacji w matrycy będzie odbywał się w jednym procesie liofilizacji („in situ”). W tym celu substancje wchodzące w skład mikroziorników (ZS i etyloceluloza, w stosunku 1:1 lub 1:2) rozpuszczano w chlorku metylenu, dyspergowano w roztworze polimeru mukoadhezyjnego (Carbopolu lub HEC) i suszono sublimacyjnie. Roztwór HEC okazał się korzystniejszą fazą zawieszającą, ponieważ zapewniał uzyskanie subtelniejszych (<200 μm) i bardziej homogennych dyspersji niż żel Carbopolu. W wyniku liofilizacji otrzymywano krążki o zadowalających właściwościach mechanicznych i mukoadhezyjnych. Istotną wadą tej metody otrzymywania krążków z selegiliną były duże straty substancji leczniczej na etapie suszenia, redukujące jej zawartość w liofilizatach nawet o ponad 50%, lecz straty były dużo większe (ok. 97%), gdy liofilizowano dyspersję ZS w hydrożelu, bez etylocelulozy. Pomimo tych problemów, odpowiedni dobór składników dyspersji, umożliwił sporządzenie krążków zawierających nawet ponad 30 mg selegiliny. Uzyskane układy charakteryzowały się przedłużonym uwalnianiem (40% dawki uwalniało się w ciągu 6 h), niezależnym od geometrii i gęstości krążków, jak założono w celu pracy.

Końcowym etapem pracy była ocena wpływu formy selegiliny (ChS lub zasada) oraz postaci farmaceutycznej (roztwór, dyspersja, krążek) na przenikanie tej substancji przez świńską błonę śluzową policzka w warunkach *in vitro*. Uzyskane wyniki wskazują, że przenikanie zasady selegiliny z matrycy hydrożelowej (postać dyspersji

lub zwilżonego krążka liofilizowanego) jest większe niż z form zawierających ChS. Największe przenikanie, a także największą zawartość selegiliny w błonie (ok. 370 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) oznaczano po aplikacji krążka Carbopolu zawierającego wolną formę zasady selegiliny. Inkorporacja ZS w mikrokapsułkach w niewielkim stopniu spowalniała szybkość przenikania przez błonę śluzową, nie zmniejszając jej wchłaniania do tkanki policzka (zawartość selegiliny mierzona w błonie wynosiła ok. 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Prezentowane wyniki badań wskazują, że istnieje możliwość otrzymania metodą liofilizacji krążka dopoliczkowego charakteryzującego się przedłużonym uwalnianiem selegiliny. System o najkorzystniejszych właściwościach składał się z matrycy zbudowanej z hydroksyetylocelulozy, umożliwiającej trwałą adhezję układu do błony śluzowej oraz z mikrokapsułek z substancją leczniczą w formie zasady, zapewniających odpowiedni profil jej uwalniania niezależny od matrycy mukoadhezyjnej. Zaproponowany model wymaga jednak udoskonaleń polegających m. in. na zmniejszeniu strat zasady selegiliny podczas liofilizacji i dalszej optymalizacji szybkości uwalniania, z uwzględnieniem szybkości wchłaniania *in vivo*. Opracowane rozwiązanie technologiczne może być zapewne zastosowane dla innych substancji leczniczych wymagających kontrolowanego uwalniania, przy aplikacji na błonę śluzową jamy ustnej.

I. WSTĘP

Podstawowym celem nauk farmaceutycznych jest rozwój nowych, bezpieczniejszych, a przede wszystkim skuteczniejszych farmakoterapii. Jednym z narzędzi, służących realizacji tego celu, jest opracowywanie doskonalszych postaci leku, zarówno dla nowo otrzymanych, jak i znanych w lecznictwie substancji czynnych. Nowa postać leku często oznacza niewykorzystywaną wcześniej, alternatywną drogę podania leku.

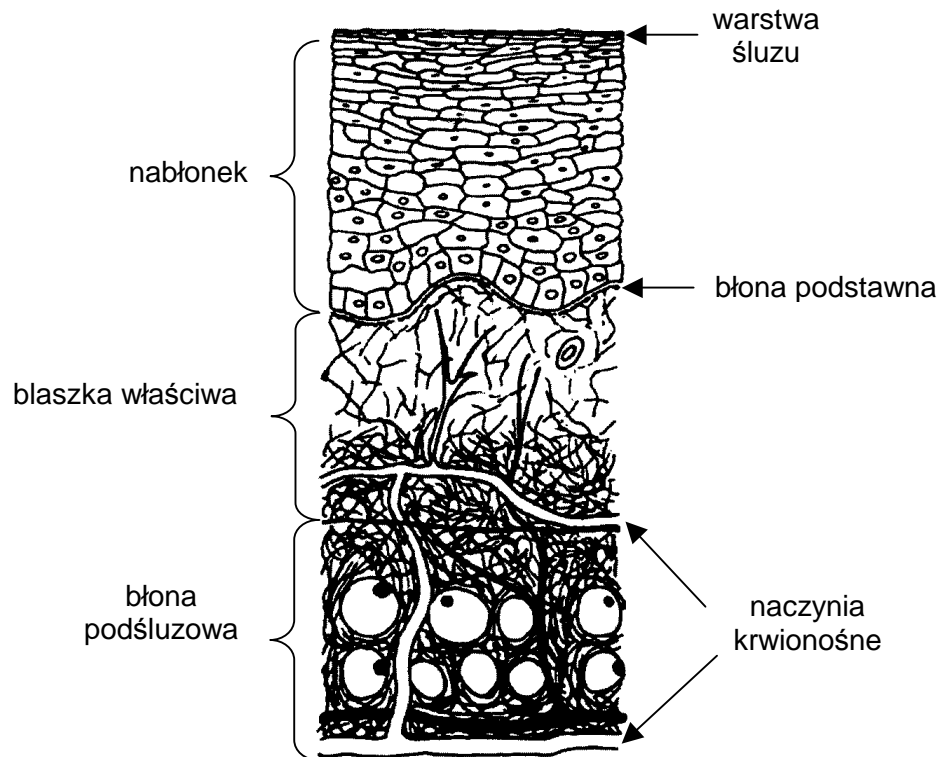
Pomimo dużej różnorodności w sposobach aplikacji leków, nadal najbardziej pożądaną i preferowaną drogą przyjmowania leków przez pacjentów pozostaje droga doustna, a tabletki lub kapsułki są najszerzej akceptowanymi postaciami leku. Również z punktu widzenia wytwórców leków proces tabletkowania jest stosunkowo prosty, powtarzalny i ekonomiczny, przez co postać tabletki jest zazwyczaj pierwszą formą, jaką rozważa się przy wprowadzeniu nowego produktu leczniczego na rynek [1–3].

Postęp dokonujący się w dziedzinie technologii postaci leku wymusza ciągłe zmiany, nawet w grupie tak powszechnych form doustnych jak tabletki, dla których poszukuje się zarówno nowych sposobów podania, jak również nowych sposobów produkcji – z zastosowaniem nowych substancji pomocniczych i nowych procesów wytwarzania.

Skalę tych zmian obrazują kolejne nowelizacje opracowań farmakopealnych, dotyczące tabletek. W monografiach preparatów do stosowania w jamie ustnej wyróżnia się: tabletki do ssania, tabletki podjęzykowe, tabletki podpoliczkowe oraz podpoliczkowe preparaty mukoadhezyjne – podawane na błonę śluzową policzka. Postacie te po aplikacji w jamie ustnej uwalniają substancje lecznicze, które połykane są ze śliną lub mogą wchłaniać się do krążenia przez błonę śluzową jamy ustnej, wywołując ogólny efekt leczniczy. Preparaty tego typu są coraz bardziej popularne, nie tylko z powodu łatwego i wygodnego sposobu aplikacji, ale przede wszystkim ze względu na odmienną kinetykę przenikania substancji leczniczej, umożliwiającą ominięcie metabolizmu wątrobowo – jelitowego. W przypadku substancji leczniczych, które podlegają silnemu efektowi pierwszego przejścia podanie podjęzykowe lub podpoliczkowe pozwala na osiągnięcie efektu terapeutycznego przy zastosowaniu mniejszych dawek leku, z jednoczesnym obniżeniem ryzyka wystąpienia działań niepożądanych.

Jama ustna jako miejsce podania leku

Jama ustna jest wysłana błoną śluzową (łac. *membrana mucosa*), która składa się z nabłonka (łac. *epithelium*) i łącznotkankowej blaszki właściwej błony śluzowej (łac. *lamina propria membranae mucosae*) (ryc. 1) [4].



Ryc. 1. Przekrój przez błonę śluzową jamy ustnej [5].

Błona śluzowa tych okolic jamy ustnej, które biorą udział w żuciu pokarmu (podniebienie twarde, dziąsła) ma grubość 100 – 200 μm i ze względu na możliwość uszkodzenia lub podrażnienia jest pokryta wielowarstwowym nabłonkiem płaskim rogowaciejącym [4, 6]. Nabłonek ten zawiera obojętne lipidy – ceramidy, przez co znacznie ograniczony jest transport wody [6]. Górną powierzchnię języka pokrywa wyspecjalizowana błona śluzowa (częściowo zrogowaciała), której zadaniem jest percepcja smaku [7]. Pozostała część (60%) błony śluzowej jamy ustnej, zlokalizowanej na wargach, policzkach, podniebieniu miękkim, spodniej stronie języka oraz na dnie jamy ustnej, ma grubość 500 – 800 μm i pokryta jest wielowarstwowym nabłonkiem płaskim nierogowaciejącym. Ten rodzaj nabłonka w przestrzeni międzykomórkowej zawiera tylko niewielkie ilości ceramidów, a w jego skład wchodzi

ponadto pewne ilości lipidów polarnych, np. siarczan cholesterolu, dzięki czemu, w porównaniu do nabłonka zrogowaciałego jest bardziej przepuszczalny dla wody [6–8].

Nabłonek leży na błonie podstawnej ciągłej (ryc. 1), pod którą znajduje się tkanka łączna blaszki właściwej. Na podniebieniu miękkim i na wewnętrznej powierzchni policzków znajduje się błona podśluzowa. W błonie śluzowej właściwej i w błonie podśluzowej całej jamy ustnej, z wyjątkiem podniebienia twardego i dziąseł, znajdują się części wydzielnicze i przewody odprowadzające gruczołów śluzowych, surowicznych i mieszanych śluzowo – surowicznych [4].

Komórki śluzowe gruczołów śluzowych produkują śluz (łac. *mucus*), który pokrywa błonę śluzową jamy ustnej warstwą grubości ok. 1 μm [9]. Śluz ma dużą lepkość. Jest to hydrożel składający się z wody (ok. 95%), lipidów, soli nieorganicznych oraz mucyny. Mucyna jest złożona z cząsteczek glikoprotein zbudowanych z białkowego rdzenia, od którego odchodzą boczne łańcuchy wielocukrów. Podstawowymi aminokwasami budującymi rdzeń są: seryna, treonina i prolina, natomiast łańcuch węglowodanowy zbudowany jest z takich monosacharydów jak: L-fukoza, N-acetyloglukozamina, D-galaktoza, N-acetylogalaktozamina i kwas sialowy [10, 11].

Śluz powleka i zapewnia odpowiednie nawilżenie błony śluzowej jamy ustnej oraz pełni rolę ochronną, biorąc udział w wytwarzaniu miejscowej, nieswoistej odporności, a także zabezpieczając tkankę przed szkodliwym wpływem ksenobiotyków [4, 12]. W fizjologicznym pH śliny (5,8–7,4) śluz posiada ładunek ujemny, co jest związane z obecnością w jego składzie kwasów sialowych ($\text{pK}_a=2,6$) i estrów siarczanowych wielocukrów. Właściwość ta ma olbrzymie znaczenie dla zjawiska mukoadhezji warunkującego kilkugodzinne utrzymanie dopoliczkowych form leku w jamie ustnej [6].

Cała błona śluzowa jamy ustnej zaopatrywana jest w krew dzięki kapilarom naczyń krwionośnych dochodzącym do blaszki właściwej (ryc. 1). Przepływ krwi w tkance zależy od rejonu jamy ustnej, a jego wartości są większe w porównaniu z przepływem mierzonym w skórze [7]. W tabeli 1 zaprezentowano dane dotyczące przepływu krwi w jamie ustnej u małp, lecz wartości te są zbliżone do obserwowanych w tkankach ludzkich. Odpływ krwi z błony śluzowej jamy ustnej odbywa się żyłami: zażuchwową, językową i twarzową, które uchodzą do wewnętrznej żyły szyjnej, dzięki czemu możliwe jest ograniczenie efektu pierwszego przejścia dla substancji wchłaniających się przez błonę śluzową jamy ustnej [7].

Przenikanie substancji leczniczej przez błonę śluzową jamy ustnej może odbywać się przez niezrogowaciałe tkanki błony podjęzykowej oraz przez błonę śluzową policzka i przyjmuje się, że intensywność tego procesu jest od 4 do 4000 razy

większa niż po podaniu leku na skórę. Przenikanie najłatwiej zachodzi drogą podjęzykową, trudniej przez błonę policzka, a stosunkowo najtrudniej przez tkankę podniebienia [6]. Potwierdzają to badania przeprowadzone dla diazotanu izosorbidu, który w formie tabletki aplikowany był przez 5 min na błonę śluzową podniebienia, policzka i podjęzykowo [13]. Po 1 min badania można było oznaczyć substancję leczniczą we krwi po podjęzykowym oraz podpoliczkowym podaniu tabletki. Wartość t_{max} wynosiła 5 min. W porównaniu z aplikacją podpoliczkową wyższe stężenia diazotanu izosorbidu oznaczono po podaniu podjęzykowym, natomiast u żadnego z 6 ochotników nie oznaczono substancji leczniczej po podaniu tabletki na błonę śluzową podniebienia.

Tab. 1. Szybkość przepływu krwi w błonie śluzowej i skórze małą [wg ref. 7]

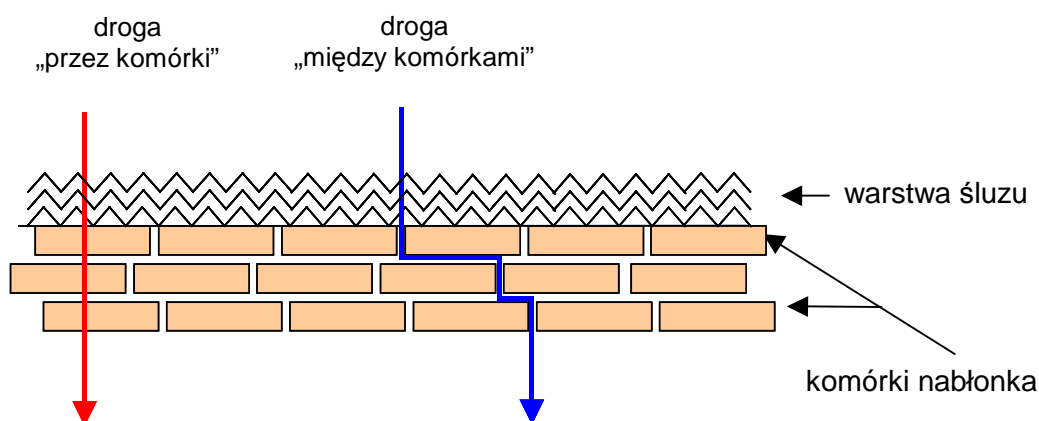
Lokalizacja tkanki	Średni przepływ krwi w 100 g tkanki [ml/min]
Górna powierzchnia języka	100,6
Czerwień ust	49,9
Warga	28,3
Policzek	20,3
Dziąsło zrośnięte ^z	19,5
Spodnia powierzchnia języka	13,9
Dno jamy ustnej	12,2
Skóra ^z	9,4
Podniebienie miękkie	9,2
Podniebienie twarde ^z	7,0

^z – tkanka zrogowaciała

Mimo że przenikanie substancji leczniczych podawanych podjęzykowo jest intensywniejsze i szybsze niż po podaniu na błonę śluzową policzka, to droga podpoliczkowa pozostaje dobrą alternatywą dla form charakteryzujących się przedłużonym uwalnianiem. Do niewątpliwych zalet tej drogi podania należą: wygodny dostęp do błony śluzowej, akceptacja miejsca aplikacji przez pacjentów, możliwość usunięcia formy w przypadku zbyt uciążliwych działań niepożądanych, zwiększenie biodostępności poprzez ograniczenie metabolizmu wątrobowo – jelitowego, zapobieganie rozkładowi substancji leczniczej w środowisku żołądka, a także pod wpływem enzymów przewodu pokarmowego oraz możliwość zastosowania tej drogi do podania leków o charakterze peptydów [14].

Intensywność przenikania substancji leczniczej z postaci leku przez błonę śluzową policzka może zależeć od wielu czynników. Do najważniejszych z nich należą: właściwości substancji leczniczej, czynniki fizjologiczne, czynniki technologiczne (odpowiedni dobór substancji pomocniczych w celu zaprojektowania optymalnej formy leku) oraz czynniki patologiczne [12].

Przenikanie substancji leczniczej przez nabłonek błony śluzowej jamy ustnej może odbywać się dwiema drogami: „przez komórki” oraz „między komórkami” (ryc. 2) [12].



Ryc. 2. Drogi przenikania substancji leczniczej przez błonę śluzową jamy ustnej [wg ref. 12].

Podstawową drogą przenikania substancji leczniczych jest droga „przez komórki”, chociaż całkowity transport substancji leczniczej przez błonę śluzową jest sumą przenikania dwiema drogami jednocześnie [6, 7]. Odpowiednia modyfikacja chemiczna substancji leczniczej, zwiększająca jej lipofilowość wpływa na zwiększenie przenikania substancji przez błonę śluzową drogą „przez komórki”.

Czynniki fizjologiczne decydują o tym, że ograniczona jest zarówno wielkość formy podawanej podpoliczkowo jak i zawartość substancji leczniczej w tej formie, z powodu stosunkowo niewielkiej powierzchni miejsca aplikacji. Przyjmuje się, że postać podpoliczkowa powinna mieć wielkość od 1 do 3 cm², a zawartość substancji leczniczej nie powinna przekraczać 25 mg. Maksymalny czas przylegania formy do błony śluzowej wynosi ok. 4–6 h i związany jest z koniecznością przyjmowania pokarmów i płynów. Istotnym czynnikiem fizjologicznym jest także pH środowiska jamy ustnej (pH śliny), które decyduje o przenikaniu zjonizowanych substancji leczniczych. Zwiększenie frakcji niezdysocjowanej substancji leczniczej nasila jej przenikanie przez barierę błony śluzowej jamy ustnej [12].

Istotnym zagadnieniem jest opracowanie odpowiedniego składu dopoliczkowej postaci leku, także pod kątem wpływu substancji pomocniczych na przenikanie substancji leczniczej. Rolę takich substancji pomocniczych pełnią m. in. promotory wchłaniania (np. laurylosiarczan sodu, sole kwasów żółciowych, kwasy tłuszczowe), które zmieniają właściwości błon komórkowych tkanek policzka (strukturę białek i/lub lipidów) lub strukturę i reologię śluzu, przez co zwiększają przepuszczalność nabłonka [15]. Inne wykorzystywane w tym celu substancje, o odmiennym mechanizmie działania, to inhibitory enzymów występujących w ślinie i błonie śluzowej policzka, zwiększające przede wszystkim przenikanie przez błonę śluzową leków peptydowych. Rolę takich substancji pomocniczych pełnią m. in.: aprotynina, bestatyna i puromycyna [15, 16].

Dopoliczkowe formy leku

O skuteczności działania dopoliczkowych postaci leku decydują nie tylko właściwości substancji leczniczej, właściwy dobór substancji pomocniczych i czynniki fizjologiczne, ale także odpowiednia konstrukcja formy leku. Wśród dopoliczkowych postaci leku wyróżnia się zarówno formy tradycyjne: płynne (roztwory, zawiesiny i emulsje), półstałe (hydrożele, pasty) lub stałe (tabletki), jak i formy nowoczesne – filmy adhezyjne [5, 12, 17].

Dopoliczkowe preparaty płynne i półstałe przeznaczone są przede wszystkim do leczenia schorzeń w obrębie jamy ustnej (leczenie przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe), a dzięki obecności w ich składzie polimeru mukoadhezyjnego mogą dłużej utrzymywać się na błonie śluzowej, wywołując miejscowy efekt leczniczy. Najczęściej wykorzystywanymi polimerami do sporządzania maści typu żeli stosowanych w jamie ustnej są: hydroksypropyloceluloza, karbomer i hypromeloza. Polimery te często występują w preparatach z takimi substancjami jak: chlorheksydyna, lidokaina, flurbiprofen, propolis, czy tetracyklina [5].

Mimo ok. 30 lat badań nad mukoadhezyjnymi stałymi dopoliczkowymi postaciami leku do produkcji udało się wdrożyć tylko kilka preparatów w formie tabletek. Zestawienie obecnie produkowanych leków tego typu przedstawia tabela 2. Chociaż preparaty te określane są jako dopoliczkowe, miejscem ich aplikacji wskazywanym przez producentów jest przestrzeń między dziąsłem a wargą, na wysokości górnego kła, prawego lub lewego.

Tab. 2. Skład i zastosowanie produkowanych obecnie stałych dopoliczkowych form leku

Substancja lecznicza	Zastosowanie	Nazwa handlowa (Producent)	Polimer warunkujący adhezję
Nitrogliceryna	Dusznicza bolesna	Suscard, Nitrogard (Forest Laboratories)	HPMC
Testosteron	Opóźniona dojrzałość płciowa	Striant (Columbia Laboratories)	Carbopol 934P, HPMC, polikarbofil
Prochloroperazyna	Nudności, wymioty, migrena	Buccastem M (Reckitt Benckiser)	guma ksantanowa, powidon
Mikonazol	Grzybica jamy ustnej	Loramyc (BioAlliance Pharma)	<i>Nie podano</i>
Fentanylu cytrynian	Ból nowotworowy	Fentora, Actiq (Cephalon)	Brak polimeru – inna technologia

HPMC – hydroksypropylometylceluloza

Tabletki z nitrogliceryną, testosteronem oraz prochloroperazyną zawierają w swoim składzie polimery mukoadhezyjne, które mają zapewnić utrzymanie formy leku na błonie śluzowej przez odpowiednio: 3–5 h, 12 h lub tylko 1–2 h. W przypadku preparatów z fentanylem mechanizm uwalniania substancji leczniczej jest odmienny. Preparat Fentora ma postać tabletek do ssania, natomiast preparat Actiq ma postać pastylki umieszczonej na patyczku (rodzaj lizaka). Producent zaleca, żeby patyczek ten umieścić między policzkiem a dziąsłem, albo żeby uwalnianie substancji leczniczej następowało w trakcie ssania lub pocierania patyczkiem o błonę śluzową policzka.

Tabletki dopoliczkowe otrzymuje się najczęściej metodą bezpośredniego prasowania, chociaż etap granulacji na mokro również może być etapem w procesie produkcji. Oprócz tradycyjnego tabletkowania mieszaniny proszków, prowadzone są także badania nad możliwością tworzenia mukoadhezyjnych mikrosfer z substancją leczniczą, które następnie byłyby prasowane do postaci tabletki [12, 18, 19].

W odróżnieniu od tabletek dopoliczkowych takie formy jak filmy polimerowe są elastyczne, dzięki czemu możliwe jest lepsze przyleganie formy do błony śluzowej a komfort pacjenta jest większy [17]. Filmy otrzymuje się albo metodą wylewania i odparowania rozpuszczalnika, albo metodą prasowania [5]. W metodzie pierwszej roztwór polimeru zawierający substancję leczniczą wylewa się na folię, która będzie stanowiła warstwę nieprzepuszczalną i po odparowaniu rozpuszczalnika wycina się plastry odpowiedniej wielkości. Metoda prasowania polega na uzyskaniu homogennej mieszaniny wszystkich składników filmu, sprasowaniu ich do cienkiej warstwy i wycięciu form aplikacyjnych, które dodatkowo można pokryć błoną nieprzepuszczalną.

Rolę zewnętrznej warstwy zabezpieczającej (nieprzepuszczalnej dla wody), może pełnić np. warstwa etylocelulozy, która ukierunkowuje uwalnianie substancji leczniczej w stronę błony śluzowej. Pozwala to na ograniczenie strat będących wynikiem połykania substancji leczniczej ze śliną, powszechnych w przypadku typowych stałych form dopoliczkowych [12]. Wadą takiego rozwiązania jest jedynie konieczność usunięcia warstwy polimerowej z błony śluzowej po zakończeniu aplikacji.

Bioadhezja

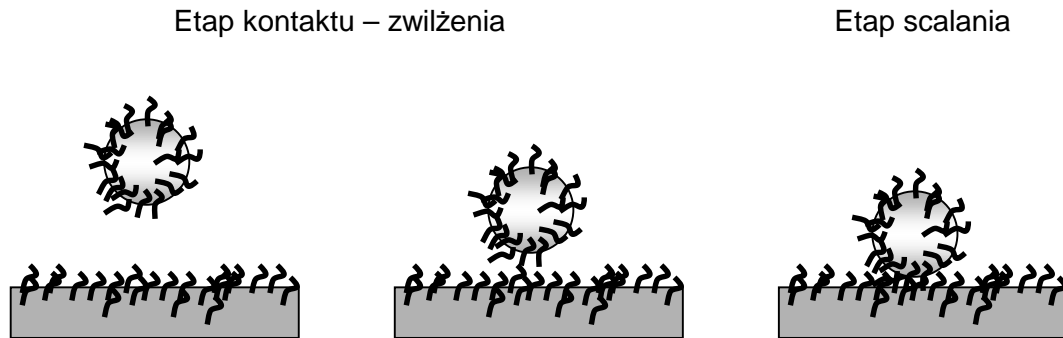
Substancjami pomocniczymi wykorzystywanymi w opracowywaniu dopoliczkowych form leku są polimery, które dzięki właściwościom bioadhezyjnym, mają zapewnić odpowiednio długie utrzymanie postaci leku w określonym miejscu jamy ustnej [12].

Definicja określa bioadhezję, jako stan łączenia się dwóch różnych materiałów, z których przynajmniej jeden jest substancją pochodzenia naturalnego. Do określenia oddziaływań różnych materiałów z błoną śluzową organizmów żywych używa się terminu mukoadhezja [20].

Odpowiednie zaprojektowanie dopoliczkowej postaci leku jest możliwe dopiero po zrozumieniu złożonych oddziaływań pomiędzy polimerem mukoadhezyjnym wchodzącym w skład postaci leku, a błoną śluzową jamy ustnej. Proces tworzenia wiązań bioadhezyjnych pomiędzy tymi dwoma materiałami obejmuje zawsze 3 kolejno następujące po sobie etapy [21]:

- zwilżenie i spęcznienie polimeru, co umożliwia ściśle jego przyleganie do błony śluzowej,
- wzajemne przenikanie i splątanie łańcuchów polimeru i śluzu (mucyny),
- wytworzenie słabych wiązań chemicznych pomiędzy łańcuchami polimerów.

Oddziaływania chemiczne pomiędzy łańcuchami polimeru i mucyny najczęściej mają charakter słabych wiązań wodorowych, Van der Waalsa i hydrofobowych, bądź silniejszych wiązań jonowych lub kowalencyjnych [9]. Każde oddziaływanie pomiędzy polimerem a błoną śluzową składa się z dwóch zasadniczych etapów: kontaktu (zwilżenia) obu warstw, a następnie ich pełnego połączenia (scalania) w wyniku tworzących się wiązań mechanicznych, fizycznych oraz chemicznych (ryc. 3) [9].



Ryc. 3. Kolejne etapy mukoadhezji [wg ref. 21].

Teorie mukoadhezji

Konsekwencją tak różnorodnych oddziaływań fizycznych, mechanicznych i chemicznych między przylegającymi do siebie materiałami jest problem z jednoznacznym wyjaśnieniem zjawiska mukoadhezji. Obecnie jest ono opisywane przez 4, a nawet 6 odrębnych teorii [9, 10, 21, 22].

Teoria elektrostatyczna opiera się na założeniu, że polimer adhezyjny i glikoproteiny mucyny posiadają odmienne struktury elektryczne. W wyniku połączenia obu warstw dochodzi do przepływu elektronów i utworzenia podwójnej warstwy ładunku elektrycznego na ich styku. System ten jest porównywany do kondensatora – naładowanego w czasie kontaktu polimeru i mucyny, lub rozładowanego po rozdzieleniu obu warstw [21]. Przykładem tego typu oddziaływań jest adhezja polimeru kationowego – chitozanu – do mucyny, obdarzonej ładunkiem ujemnym [5].

Według teorii adsorpcyjnej zjawisko adhezji możliwe jest dzięki wiązaniom wodorowym oraz oddziaływaniom Van der Waalsa i oddziaływaniom hydrofobowym. Mimo że pojedyncze wiązania tego typu są słabe, to ich suma stanowi o sile interakcji między polimerem a tkanką [10, 21].

Teoria zwilżania dotyczy przede wszystkim systemów płynnych i opiera się na oddziaływaniach powierzchniowych i międzypowierzchniowych zachodzących w trakcie swobodnego rozprzestrzeniania się płynnego polimeru na powierzchni tkanki. Powinowactwo cieczy do powierzchni można określić stosując analizę kąta zwilżania. Im niższy jest kąt zwilżania, tym większe powinowactwo cieczy do powierzchni stałej.

Liczbowo zależność tę opisuje współczynnik rozprzestrzeniania (S_{AB}) [9]:

$$S_{AB} = \gamma_B - \gamma_A - \gamma_{AB}$$

gdzie:

γ_A - napięcie powierzchniowe cieczy,

γ_B - napięcie powierzchniowe tkanki,

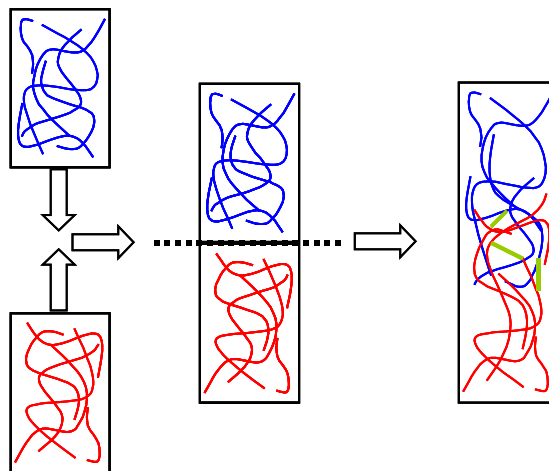
γ_{AB} - energia oddziaływania między cieczą a tkanką.

Praca adhezji (W_A) opisuje energię potrzebną do rozdzielania obu warstw:

$$W_A = \gamma_A + \gamma_B - \gamma_{AB}$$

Z zaprezentowanego wzoru wynika, że im większe energie posiadają powierzchnie płynnego polimeru i tkanki w stosunku do oddziaływań międzypowierzchniowych, tym większa praca adhezji potrzebna jest do rozdzielania obu warstw [9].

Według teorii dyfuzyjnej wzajemne przenikanie i splatanie łańcuchów polimeru z glikoproteinami mucyny prowadzi do utworzenia wiązań adhezyjnych, tym silniejszych im głębsza jest penetracja łańcuchów polimeru do tkanki (ryc. 4). Przyjmuje się, że efektywne wiązanie następuje wtedy, gdy głębokość wnikania obu oddziałujących warstw wynosi ok. 0,2 – 0,5 μm . Podobieństwo budowy (struktury) cząsteczki polimeru i mucyny zapewnia dobrą wzajemną rozpuszczalność i umożliwia utworzenie wiązań o odpowiedniej sile [21].



Ryc. 4. Etapy oddziaływań pomiędzy glikoproteinami mucyny i polimerem mukoadhezyjnym, według teorii dyfuzyjnej [wg ref. 9].

Teoria mechaniczna opisuje zjawisko adhezji jako oddziaływania cząsteczek polimeru „zazębiających się” w niejednorodnej powierzchni błony śluzowej, tak jak

układanka „puzzle”. Istota tego procesu związana jest nie tylko z bezpośrednim oddziaływaniem mechanicznym, ale także, a może przede wszystkim, polega na uwzględnieniu pewnej „szorstkości” powierzchni tkanki, co zapewnia większą powierzchnię kontaktu z polimerem [9, 23].

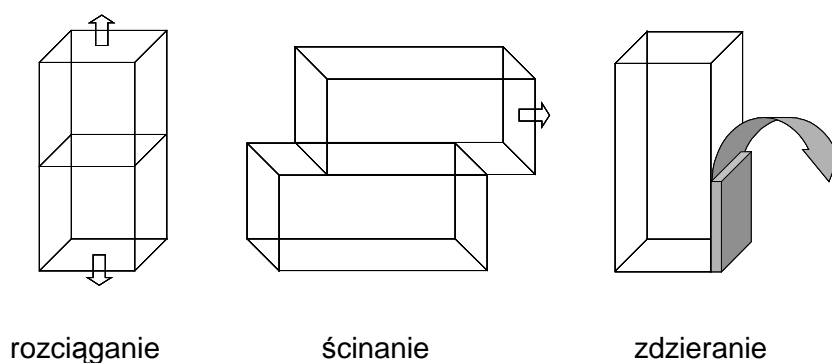
W odmienny sposób adhezję materiałów opisuje teoria złamania (ang. *fracture theory*), która odnosi siłę oddziaływania pomiędzy dwoma materiałami do siły, jaką trzeba przyłożyć, aby oddzielić obie powierzchnie, po uprzedniej adhezji [9]. Zauważono, że siła potrzebna do zniesienia wiązań jest proporcjonalna do długości łańcuchów polimeru i odwrotnie proporcjonalna do stopnia sieciowania cząsteczki polimeru [5].

Złożony mechanizm zjawiska mukoadhezji, a także różnorodność budowy i właściwości chemicznych polimerów sprawia, że istnieje wiele czynników, które decydują o sile adhezji polimeru do błony śluzowej. Najważniejsze z nich to [5, 9, 22]:

- masa molowa polimeru – siła adhezji zazwyczaj wzrasta wraz ze wzrostem masy molowej, a wartość optymalna to ok. $10^4 - 4 \times 10^6$ Da,
- elastyczność łańcuchów polimeru, umożliwiającą przeniknięcie do warstwy mucyny,
- zdolność tworzenia wiązań wodorowych,
- gęstość sieciowania polimeru – w połączeniu z masą molową oraz wielkością porów decyduje o strukturze sieci polimeru; zbyt duża gęstość sieciowania uniemożliwia właściwe pęcznienie i przenikanie do warstwy mucyny,
- ładunek elektryczny,
- stężenie – każdy z polimerów posiada charakterystyczne dla siebie stężenie optymalne; stężenie zbyt niskie nie zapewni utworzenia dostatecznej liczby połączeń polimeru i mucyny, natomiast stężenie zbyt wysokie może nie zapewnić odpowiedniego zwilżenia polimeru,
- pęcznienie polimeru zapewniające utworzenie przestrzennej sieci mukoadhezyjnej, mogącej przenikać mucynę, zdolnej do tworzenia wiązań wodorowych i do oddziaływań elektrostatycznych,
- czynniki fizjologiczne: pH śliny, odnowa warstwy mucyny, fizjologiczne ruchy policzka.

Badania mukoadhezji

Jednymi z podstawowych badań prowadzonych w trakcie opracowywania nowej mukoadhezyjnej postaci leku są badania mające na celu określenie siły wiązania formy leku z błoną śluzową. Intensywny rozwój różnych metod pomiaru właściwości mukoadhezyjnych rozpoczął się pod koniec lat 80-tych XX w. i dotyczył zarówno metod ilościowych, jak i jakościowych [10, 24]. Większość z ilościowych metod pomiaru siły adhezji/mukoadhezji opisywanych w literaturze opiera się na pomiarze siły potrzebnej do zerwania wiązań adhezyjnych utworzonych pomiędzy badanym polimerem (postacią leku) a modelową błoną śluzową. W zależności od kierunku działania sił odrywających wyróżnia się badania zdzierania, ścinania lub rozciągania (ryc. 5) [24].



Ryc. 5. Kierunek działania sił w trakcie badań mukoadhezji [wg ref. 24].

Badania tego typu wraz z badaniami reologicznymi należą do grupy technik mechanicznych, które łącznie z technikami spektroskopowymi zaliczane są do podstawowych metod badania mukoadhezji w warunkach *in vitro* [25]. Metody te wykorzystywane są w pracach o charakterze eksperymentalnym lub w badaniach rozwojowych, poprzedzających ewentualne testy *in vivo*.

Pomiar tensometryczny polega na pomiarze siły niezbędnej do oderwania testowanego materiału od naturalnej błony śluzowej pozyskiwanej od zwierząt. Można także posłużyć się prostszym modelem badawczym wykorzystującym zamiennik naturalnej błony śluzowej, naśladujący jej właściwości. Pozwala to na zastosowanie standardowej procedury badania, a uzyskiwane wyniki charakteryzują się większą powtarzalnością. Najczęściej jako zamiennik stosuje się warstwę żelatyny lub roztwory, żele i dyski mucyny (tabela 3) [26–49].

Przed pomiarem badany preparat nanosi się na odpowiednio zwilżoną błonę śluzową, następnie wywiera się określony nacisk na obie warstwy (zazwyczaj stosuje

się siły od 0,1 do 10,0 N, przez 30–300 s) i rozpoczyna się etap oddzielania testowanego materiału od błony lub jej substytutu. W trakcie badania rejestruje się zależność między siłą odrywania a czasem lub drogą przemieszczenia. Pole powierzchni pod wykresem tej zależności wyraża się w jednostkach pracy i określa jako pracę adhezji/mukoadhezji.

Tab. 3. Przykłady wykorzystania pomiarów tensometrycznych w badaniu mukoadhezji

Aparat	Model błony śluzowej	Badana postać leku (polimer)	Źródło
Zmodyfikowana waga szalkowa	Policzek wołowy	Tabletka (CMCNa+HPMC)	26
	Policzek wieprzowy	Tabletka (CP+HPMC)	27, 28
	Policzek królika	Tabletka (AlgNa lub CP + HPMC)	28, 29
	Jelito wieprzowe	Tabletka (PC-cysteina koniugat)	30
Waga Jolly'ego	Roztwór żelatyny 30%	Tabletka (CP+HPMC)	31, 32
	Roztwór mucyny 30%	Tabletka (CP+CPNa)	
Tensometr	Jelito królika	Tabletka (guma Hakea)	33, 34
	Policzek wieprzowy	Tabletka (kopolimer PAA-PEG)	35
		Film (kopolimer PAA-EHA)	36
	Błona śluzowa szczura	Tabletka (PC+HPMC)	37
	Przełyk wołowy	Hydrożel (CP)	38
	Roztwór mucyny 1% lub 5%	Tabletka (CP+CMCNa)	39
		Tabletka (PC+HPMC)	40
Analityczny	Roztwór mucyny 4%, 8%, 20%	Hydrożel (CMCNa, CP)	41–43
		Tabletka (MC, CP, AlgNa, CMCNa)	
	Dyski mucyny	Hydrożel (CMCNa, HEC)	44
	Policzek wołowy	Tabletka (PVP, CP, HPC)	45
	Policzek wieprzowy	Hydrożel (CP)	42, 46
		Tabletka i film (chitozan)	
	Świeża mucyna żołądka wieprzowego	Hydrożel (CP)	42
	Wołowa tkanka podjęzykowa, przełyk, dwunastnica	Tabletka (CP, HPMC)	47, 48
Filmy (CP, PC, CMCNa, PVP, guma karagenowa)			
Jelito wieprzowe	Tabletka lub proszek (AlgNa, X-PVP, X-CMCNa)	49	

CMCNa – karmeloza sodowa, HPMC – hypromeloza, CP – Carbopol, AlgNa – alginian sodu, PC – polikarbofil, CPNa – sól sodowa karbomeru, PAA-PEG – kopolimer kwasu poliakrylowego i makroglolu, PAA-EHA – kopolimer kwasu poliakrylowego i etyloheksyloakrylowego, MC – metyloceluloza, HEC – hydroksyetyloceluloza, HPC – hydroksypropyloceluloza, PVP – powidon, X-PVP – sieciowany powidon, X-CMCNa – sieciowana karmeloza sodowa

Jak dotąd nie opracowano jednego uniwersalnego schematu prowadzenia tego badania, a poszczególne parametry takie jak: sposób zwilżania, siła i czas docisku, szybkość odrywania, czy rodzaj użytej błony śluzowej dobiera się eksperymentalnie.

W miarę roztworu technik analitycznych wprowadzano także zmiany w sposobie rejestracji interakcji między polimerem a błoną śluzową w pomiarach tensometrycznych (tabela 3). Początkowo do tego celu używano zmodyfikowanej wagi szalkowej lub wagi Jolly'ego, wykorzystywanej standardowo do pomiaru napięcia powierzchniowego cieczy. Kolejną modyfikacją było wprowadzenie tensometrów, a obecnie najczęściej wykorzystuje się w tym celu analizatory tekstury, które wyposażone są w specjalistyczne przystawki, umożliwiające pomiar w warunkach zbliżonych do środowiska fizjologicznego [6, 10]. Mimo technicznego zaawansowania, analizatory tekstury są urządzeniami prostymi w obsłudze, a przede wszystkim umożliwiają powtarzalną analizę różnorodnych materiałów mukoadhezyjnych. Dzięki połączeniu z komputerem i współpracy z dedykowanym oprogramowaniem pomiar jest w pełni automatyczny a uzyskane wyniki archiwizuje się i raportuje w formie wykresów, z których łatwo można odczytać zarówno maksymalną siłę jak i pracę mukoadhezji [50].

Przykłady różnorodnych testów wykorzystujących pomiary tensometryczne zebrano w tabeli 3.

Właściwości mukoadhezyjne roztworów polimerów lub hydrożeli (formy płynne lub półstałe), otrzymanych z polimerów rozpuszczających się lub pęczniejących w wodzie, można oceniać także w oparciu o pomiary reologiczne. Podstawę tych badań stanowi teoria dyfuzyjna adhezji, według której oddziaływanie polimeru z błoną śluzową polega na wzajemnym przenikaniu łańcuchów polimerowych i glikoprotein mucyny. W wyniku dalszych oddziaływań dochodzi do zmiany właściwości fizykochemicznych połączenia tworzącego się na granicy obu powierzchni, w tym właściwości reologicznych [51].

Metodologia badania mukoadhezji przy użyciu reometrów polega na pomiarze zmian właściwości reologicznych, którym ulegają hydrożele po połączeniu ze śluzem lub mucyną błony śluzowej [51]. Zmiany dotyczące lepkości η_b utworzonego połączenia można obliczyć ze wzoru:

$$\eta_b = \eta_t - \eta_m - \eta_p$$

gdzie:

η_t - współczynnik lepkości układu polimer – mucyna,

η_m - współczynnik lepkości mucyny,

η_p - współczynnik lepkości polimeru.

Uzyskane w ten sposób dane pozwalają także na obliczenie siły bioadhezji F [dyna/cm²] ze wzoru:

$$F = \eta_b \times \gamma$$

gdzie: γ - szybkość ścinania.

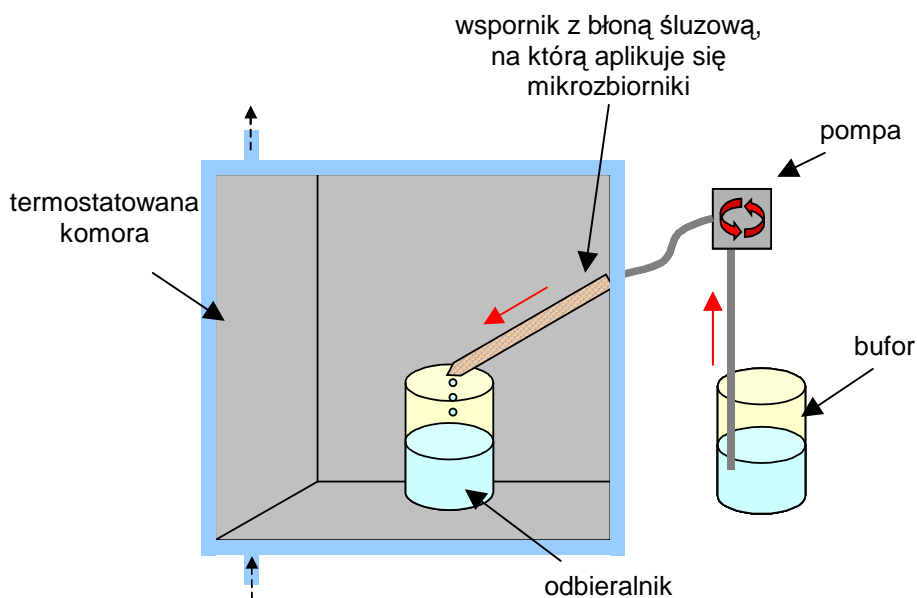
Wskaźnikiem siły oddziaływań polimeru z mucyną mogą być również parametry pomiaru lepkości dynamicznej – moduł sprężystości (magazynowania) G' oraz moduł strat G'' . Wzrost wartości tych parametrów mierzonych dla połączenia polimer – mucyna, w porównaniu do wartości parametrów uzyskanych dla samego polimeru, świadczy o wystąpieniu oddziaływań mukoadhezyjnych między warstwami [51]. Wykazano, że zarówno stężenie polimeru, jego masa molowa, jak i rodzaj mucyny mają wpływ na wynik pomiaru właściwości viskoelastycznych badanych układów [41, 51, 52]. Chociaż reologiczne metody pomiaru mukoadhezji nie dają pełnych i bezpośrednich informacji na temat oddziaływań polimeru z błoną śluzową, to w pełni nadają się do przesiewowych badań polimerów przeznaczonych do wytwarzania dopoliczkowych form leku [12].

W badaniach mukoadhezji stosuje się także techniki spektroskopowe, przy czym najczęściej wykorzystuje się oznaczenia kolorymetryczne. Technika barwienia złotem koloidalnym polega na utworzeniu połączenia złota koloidalnego z roztworem mucyny i pomiarze absorbancji utworzonego układu przy długości fali 525 nm. Następnie koniugat mucyny i złota łączy się z roztworem polimeru i oznacza się zmianę wartości absorbancji. Przydatność tej metody określenia interakcji między pochodnymi kwasu akrylowego i metakrylowego a mucyną wykazano wyłącznie w przypadku pomiarów w środowisku kwaśnym [53].

Pomiar bioadhezji płynnych postaci leku do tkanek jamy ustnej, w warunkach in vitro i in vivo, umożliwia technika bezpośredniego barwienia [54]. Roztwory polimerów po połączeniu z błoną śluzową wybarwia się za pomocą błękitu alcjanu (polimery anionowe np. pochodne kwasu akrylowego) lub eozyny (polimery kationowe np. chitozan). Stopień adhezji polimeru określa się ilościowo metodą mikroskopową, na podstawie porównania intensywności zabarwienia tkanki poddanej działaniu polimeru i próby kontrolnej.

Inna technika mikroskopowa wykorzystuje mikroskop sił atomowych [55]. Obraz uzyskany z tego aparatu wskazuje, że w wyniku kontaktu z polimerem zmienia się struktura powierzchni komórek nabłonka. Pod wpływem polimeru komórki tracą swoją charakterystyczną gładkość, natomiast zanikają typowe naturalne pęknięcia i szczeliny.

W odmienny sposób próbuje się oznaczyć właściwości mukoadhezyjne mikrozbiorowych form leku, np. mikrosfer. Najczęściej w takim przypadku proponuje się metody płukania lub wymywania modelowych substancji leczniczych, po wcześniejszej adhezji badanych mikrozbiorników do zwierzęcej błony śluzowej (ryc. 6). W tym celu na błonie śluzowej, przymocowanej do odpowiedniego wspornika (np. w kształcie rynienki, w termostатовanej komorze) umieszcza się mikrosfery i opłukuje spływającą cieczą (buforem). W wyniku przepływu płynu następuje uwalnianie substancji leczniczej z mikrozbiorników, a jej stężenie w płynie akceptorowym oraz w tkance służy ocenie kinetyki uwalniania, wchłaniania i pośrednio ocenie adhezji [56, 57].



Ryc. 6. Model badania mukoadhezji z płukaniem [wg ref. 56, 57].

Podstawowymi technikami wykorzystywanymi w ocenie mukoadhezji polimerów i postaci leków w warunkach *in vivo* są: gamma-scyntygrafia, technika izolowanej pętli oraz metody fluorescencyjne lub radioizotopowe [22]. Umożliwiają one śledzenie pasażu bioadhezyjnych form leku w organizmach ludzi i zwierząt. Technika izolowanej pętli zastosowana u szczura posłużyła do badań nad mechanizmem mukoadhezji mikrosfer do błony śluzowej jelita [10], natomiast znakowanie chitozanu izocyjanianem fluoresceiny, umożliwiło poznanie oddziaływań między tym polimerem a mucyną błony śluzowej [58].

Polimery mukoadhezyjne

Opracowanie nowego systemu adhezyjnego wymaga uwzględnienia zarówno właściwości substancji leczniczej jak i miejsca aplikacji. Kluczowym zagadnieniem jest także dobór polimeru o optymalnych właściwościach mukoadhezyjnych zapewniających umocowanie leku na błonie śluzowej z odpowiednią siłą i przez odpowiedni czas tak, aby wystąpił miejscowy lub ogólny efekt terapeutyczny.

Używane obecnie polimery mukoadhezyjne są najczęściej hydrofilowymi makrocząsteczkami zawierającymi w swojej budowie ugrupowania zdolne do tworzenia wiązań wodorowych: karboksylowe, hydroksylowe i aminowe. Polimery te zaliczane są do tzw. I generacji i charakteryzują się tym, że w wyniku aktywacji (przez zwilżenie) wykazują niespecyficzną adhezję do różnorodnych powierzchni [9, 22].

Nową generację polimerów mukoadhezyjnych stanowią polimery tiolowane (tiomery) – substancje wiążące się z błoną śluzową wiązaniem kowalencyjnym [24, 59]. Polimery te powstają w wyniku koniugowania polimeru mukoadhezyjnego I generacji z aminokwasami lub peptydami posiadającymi wolne grupy tiolowe, warunkujące ich właściwości adhezyjne [60, 61].

Istnieje wiele różnych sposobów klasyfikacji polimerów mukoadhezyjnych. Kryterium podziału może stanowić np.: źródło pochodzenia (polimery naturalne i syntetyczne), rodzaj błony śluzowej, do której przylegają (np. polimery dopoliczkowe, dopochwowe), rozpuszczalność (rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie) oraz budowa chemiczna (pochodne celulozy, pochodne kwasu akrylowego). W zależności od sposobu łączenia się polimeru z błoną śluzową wyróżnia się polimery tworzące wiązania niekowalencyjne lub kowalencyjne. Dla pierwszej z tych grup istotny jest ładunek, jakim obdarzone są ich cząsteczki, warunkujący sposób oddziaływań z błoną śluzową. Wśród polimerów wiążących się niekowalencyjnie wyróżnia się: polimery anionowe, kationowe, niejonowe [22, 59].

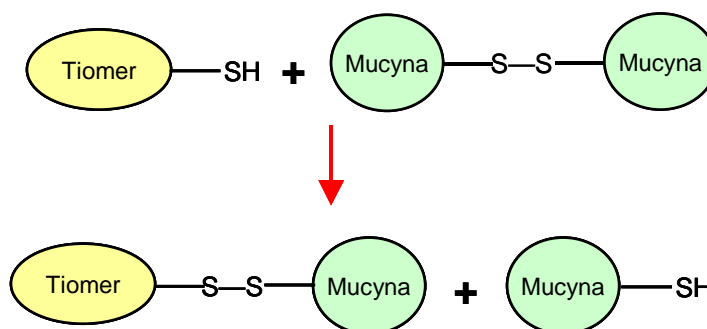
Polimery anionowe posiadają grupę karboksylową, która decyduje o ich mukoadhezji, wiążąc się z grupami hydroksylowymi glikoprotein mucyny. Z powodu dużej gęstości ładunku cząsteczki, polimery te posiadają pewne właściwości buforujące, natomiast ich zdolność do pęcznienia zależy od pH. W niektórych przypadkach, w środowisku kwaśnym, polimery w ogóle mogą nie ulegać pęcznieniu, co znacznie redukuje ich zdolność do adhezji. Ponadto, mogą one wykazywać niezgodności z jonami wielowartościowymi, np. Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , ulegając w ich obecności wytrąceniu lub koagulacji, tracąc jednocześnie właściwości mukoadhezyjne. Do grupy polimerów anionowych zalicza się: polikarbofil, karbomer, karmelozę sodową, pektyny, alginiany i kwas hialuronowy [59].

Adhezja polimerów kationowych do błony śluzowej wynika z oddziaływań grup aminowych tych polimerów z kwasem sialowym, będącym jednym ze składników mucyny. Przykładami stosowanych obecnie polimerów tej grupy są: chitozan i polilizyna. Ich zdolność pęcznienia, podobnie jak polimerów anionowych, silnie zależy od pH, ale zależność ta jest odwrotna: chitozan doskonale pęcznieje w środowisku żołądka, natomiast przy pH przekraczającym wartość 6,5 całkowicie traci zdolności mukoadhezyjne [59].

Mukoadhezja polimerów niejonowych nie jest zależna od pH i nie wynika także z oddziaływań elektrostatycznych, chociaż niektóre z polimerów tej grupy mogą tworzyć wiązania wodorowe. Najpełniej przyleganie polimerów niejonowych do błony śluzowej tłumaczy teoria dyfuzyjna, uzależniając siłę wiązania od penetracji obu warstw i splątania łańcuchów polimeru i mucyny. Mimo że zazwyczaj polimery niejonowe nie zapewniają tak silnej adhezji jak polimery jonowe, to ich oddziaływania nie zależą od obecności jonów w otaczającym środowisku. Na przykład dodatek 0,9% roztworu chlorku sodu powoduje gwałtowny spadek siły adhezji karbomeru, natomiast nie wpływa zupełnie na przyleganie polimerów niejonowych. Przykładem polimerów tej grupy są: makrogol, hypromeloza, hydroksypropyloceluloza, hydroksyetyloceluloza, powidon i alkohol poliwinylowy [59].

Mechanizm mukoadhezji polimerów tiolowanych jest odmienny i wynika z wiązania się tych substancji z mucyną w sposób kowalencyjny. Tiomery łączą się najczęściej z cysteiną obecną w glikoproteinie, w wyniku reakcji wymiany pomiędzy grupami sulfhydrylowymi i wiązaniami dwusiarczkowymi, podobnie jak w warunkach fizjologicznych glikoproteiny łączą się w warstwie śluzu (ryc. 7) [5, 59]. Tak utworzone połączenia są znacznie silniejsze niż połączenia niekowalencyjne, przez co polimery te charakteryzują się znacznie lepszymi właściwościami mukoadhezyjnymi, a ponadto czas rozpadu form leku utworzonych z tych polimerów jest znacznie dłuższy [62].

Przykładem ilustrującym to zjawisko może być tiolowany kwas poliakrylowy, powstały z połączenia z cysteiną. Właściwości tego polimeru porównano z niemodyfikowanym kwasem poliakrylowym i okazało się, że dla nowego polimeru oznaczono ponad 2-krotnie wyższą pracę adhezji (odpowiednio 280 i 104 μJ). Tabletki zawierające tiolowany polimer ulegały rozpadowi w ciągu kilku dni, podczas gdy tabletki z kwasem poliakrylowym rozpadały się już po 2 h. Podobnymi właściwościami charakteryzują się inne połączenia, np.: chitozanu i cysteiny, chitozanu i kwasu tioglikolowego, karmelozy sodowej i cysteiny, alginianu i cysteiny czy kwasu poliakrylowego i homocysteiny [5, 59]. Siła adhezji tych polimerów jest nawet 250 razy większa niż adhezja polimerów użytych do ich syntezy [63].



Ryc. 7. Mechanizm tworzenia połączeń pomiędzy tiomerami i glikoproteinami mucyny [wg ref. 24].

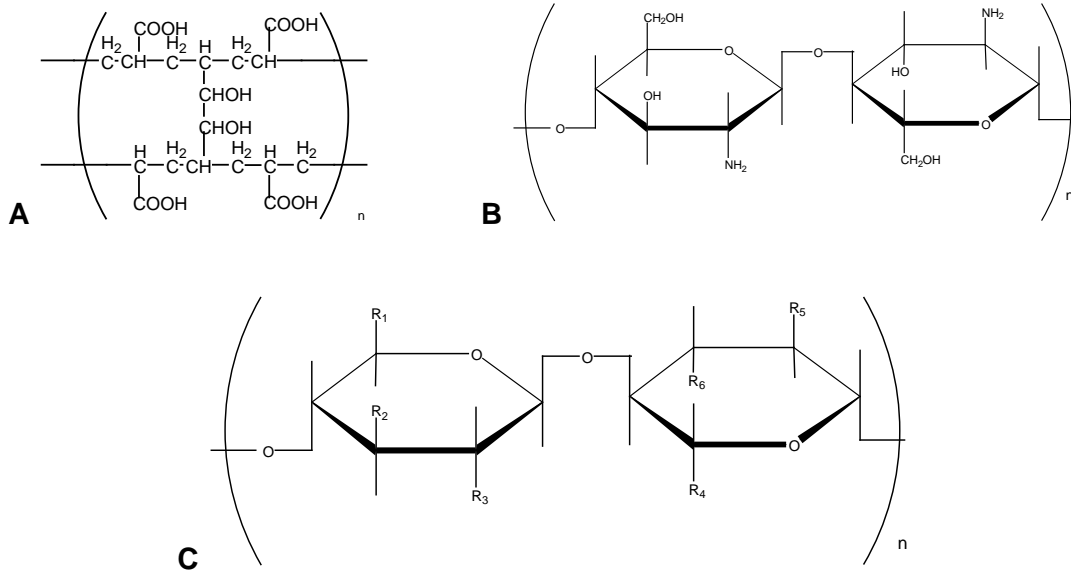
Obecnie w produkcji form mukoadhezyjnych oraz w większości prac badawczo – rozwojowych, korzysta się z polimerów I generacji, będących w użyciu od wielu lat. Niektóre z tych substancji, np. pochodne celulozy i pochodne kwasu poliakrylowego, posiadają swoje monografie farmakopealne, co gwarantuje ich wysoką jakość i bezpieczeństwo stosowania, a ponadto ułatwia wdrożenie nowej formy do produkcji.

Informacje o właściwościach fizykochemicznych najpowszechniej używanych obecnie polimerów mukoadhezyjnych podano w tabeli 4, natomiast ich wzory strukturalne zaprezentowano na ryc. 8.

Tab. 4. Właściwości fizykochemiczne polimerów mukoadhezyjnych [17, 22, 24]

Polimer	Masa molowa	pH	Lepkość [mPaxs]	Rozpuszczalność
Polikarbofil	$2,2 \times 10^5$		2000 – 22500 (roztwór 1%)	W wodzie pęcznieje
Karbomer	$1 \times 10^6 - 4 \times 10^6$	2,5 – 3,0	29400 – 39400 (roztwór* 0,5%)	W wodzie, etanolu i glicerolu
CMCNa	$9 \times 10^4 - 7 \times 10^5$	6,5 – 8,5	1200 (roztwór 1%)	W wodzie
HPC	$6 \times 10^4 - 1 \times 10^6$	5,0 – 8,0	4 – 6500 (roztwór 1%)	W wodzie o temp. $<38^\circ\text{C}$
HPMC	$8,6 \times 10^4$		15 – 4000 (roztwór 2%)	W zimnej wodzie

* – roztwór zobojętniony; CMCNa – karmeloza sodowa, HPC – hydroksypropyloceluloza, HPMC – hypromeloza



	R1	R2	R3	R4	R5	R6
HPC	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{OCH}_2\text{CHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	$\text{---OCH}_2\text{CHCH}_3$	$\text{---OCH}_2\text{CHCH}_3$	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{OCH}_2\text{CHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	$\text{---OCH}_2\text{CHCH}_3$	---OH
CMCNa	$\text{---CH}_2\text{OH}$	---OH	---OH	$\text{---CH}_2\text{OH}$	---OH	$\text{---OCH}_2\text{CO}_2^-\text{Na}^+$
HPMC	$\text{---CH}_2\text{OCH}_3$	---OH	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{---OCH}_2\text{CHCH}_3 \end{array}$	$\text{---CH}_2\text{OH}$	---OCH_3	---OCH_3
HEC	$\begin{array}{c} \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	---OH	---OH	$\begin{array}{c} \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	$\text{---O}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	---OH

Ryc. 8. Wzory strukturalne wybranych polimerów mukoadhezyjnych (A – polikarbofil, B – chitozan, C – pochodne celulozy: HPC – hydroksypropyloceluloza, CMCNa – karmeloza sodowa, HPMC – hypromeloza, HEC – hydroksyetyloceluloza) [22].

Dobór matrycy dla systemów adhezyjnych odbywa się w oparciu o analizę właściwości mukoadhezyjnych polimerów, dokonywaną najczęściej metodą tensometryczną lub reologiczną. Choć często w piśmiennictwie spotyka się badania porównawcze siły adhezji, to ich interpretacja jest trudna. Problem stanowi brak jednolitej metodyki badania mukoadhezji (zastosowanie odmiennych parametrów

badania, różne jednostki stosowane w określaniu siły adhezji, różne cechy fizjologiczne stosowanych błon śluzowych) oraz brak prostych i jednoznacznych kryteriów oceny wyników uzyskanych w trakcie pomiarów. Mimo to badania te umożliwiają wybór grupy polimerów, które charakteryzują się dobrą adhezją. Wyróżniającymi się polimerami pod tym względem są: pochodne kwasu poliakrylowego oraz karmeloza sodowa, a także ich pochodne zawierające grupę sulfhydrylową (tabela 5).

Tab. 5. Ocena właściwości mukoadhezyjnych polimerów

Jednostka pomiaru	Uszeregowanie pod względem wzrastającej mukoadhezji	Źródło
Pomiar tensometryczny		
% siły adhezji	PEG<PVP<Pek<HPMC<AlgNa<Gantrez<GT<CP934<CMCNa	64
mN/cm ²	Pek<GX<HPC<CMCNa<CH<PC+CH<PC	22
mJ	*PCn<PCw<CP(k)<CMCNa/n<GX<CMCNa/ś<PCś<CP(alk)<CMCNa/w	65
mJ	CH<EudRS<EudRL<HPMC<CMCNa<GX<PVP<Żel<PC<CP	66
mJ	CP974<HPMC<CP-EX55<HPC<CMCNa<CP934	67
mJ	GC<CP<PC<CMCNa	48
μJ	▲ CP971(k)<PC(k)<CP974(k)<CP971(alk)<PC(alk)<CP974(k)	68
mN	▲ CP907(k)<PC<CP974	69
dyna/cm ²	PVA<PVP<HPMC<GA<CP<CMCNa	39
μJ	¹⁾ PC-cyst<CH<CP971<PC<CP974<CMCNa-cyst	70
	²⁾ CH<CMCNa<PC<CP971<CMCNa-cyst<PC-cyst<CH-TBA	
	³⁾ AlgNa<HEC<CMCNa<CP971<CP974<PC	
	⁴⁾ AlgNa<PC-cyst<HEC<CMCNa-cyst<PC<HPC<CP974<CMCNa<CP971<PC-cyst<PC	
Pomiar reologiczny		
ΔG'	PEG<MC<HPMC<AlgNa<CMCNa<GX<GT<GC<CP934<PC	71

* - masa cząsteczkowa polimeru: n – niska, ś – średnia, w – wysoka,

▲ – (k) – forma kwasu, (alk) – forma zobojętniona

PEG – makrogol, PVP – poliwinylpirolidon, Pek – pektyna, HPMC – hypromeloza, AlgNa – alginian sodu, GT – tragakanta, CP – Carbopol, SMC – karmeloza sodowa, GX – guma ksantanowa, HPC – hydroksypropyloceluloza, CH – chitozan, PC – polikarbofil, Eud – Eudragit, Żel – żelatyna, GC – guma karagenowa, GA – guma akacjowa, -cyst – cysteina, HEC – hydroksyetyloceluloza, MC – metyloceluloza, TBA - tiobutyramidyna

¹⁾ – polimery wytrącane z roztworu o pH 3; ²⁾ - polimery liofilizowane z roztworu o pH 3; ³⁾ - polimery wytrącane z roztworu o pH 7; ⁴⁾ – polimery liofilizowane z roztworu o pH 7;

Liofilizaty doustne

Liofilizacja (gr. *lyō* – rozpuszczam, *philéo* – lubię) to technika suszenia oparta na zjawisku sublimacji rozpuszczalnika (najczęściej wody) z zamrożonego materiału, w warunkach obniżonego ciśnienia. Początkowo tę metodę suszenia wykorzystywano przede wszystkim w przemyśle spożywczym, a obecnie coraz częściej znajduje ona zastosowanie w produkcji leków. Nie bez znaczenia jest fakt, że liofilizacja jest metodą suszenia ochronnego, a więc może być wykorzystywana do otrzymywania preparatów zawierających termolabilne substancje lecznicze, np. antybiotyki, cytostatyki, witaminy, hormony, czy leki peptydowe. W przemyśle farmaceutycznym stosując suszenie sublimacyjne sporządza się głównie proszki liofilizowane przeznaczone do podania pozajelitowego – w formie iniekcji i (rzadziej) płynów do wlewów. W ostatnich latach metodę suszenia sublimacyjnego wykorzystuje się także do otrzymywania tabletek szybko rozpuszczalnych w jamie ustnej [1, 72, 73].

Monografia dotycząca tabletek tego typu została po raz pierwszy wprowadzona do Farmakopei Europejskiej w 2002 r. Zgodnie z tą monografią tabletki szybko rozpuszczalne (rozpadające się) w jamie ustnej otrzymywane mogą być nie tylko poprzez suszenie sublimacyjne, ale także na drodze klasycznego prasowania lub inną odpowiednią technologią (ekstruzja, wylewanie – wytłaczanie). Czas ich rozpadu nie powinien przekraczać 3 min. Podobną definicję tego rodzaju tabletek podaje amerykańskie Centrum Badań i Rozwoju Leku (ang. *CDER – Center for Drug Evaluation and Research*), będące częścią FDA [74, 75]. Tabletki szybko rozpuszczalne w jamie ustnej, określane są w literaturze jako: FDDF (ang. *fast dissolving/ disintegrating dosage forms*), FMT (ang. *fast melting tablets*), ODT (ang. *orodispersible tablets*) lub RDT (ang. *rapid dissolve/rapidly disintegrating tablets*).

Największą zaletą tych form leku jest możliwość ich zażycia bez połykania stałej formy tabletki i bez konieczności popijania wodą. Tabletka szybko rozpuszczalna umieszczona na języku rozpada się w kontakcie ze śliną tworząc, w zależności od rozpuszczalności, łatwy do połknięcia roztwór lub zawiesinę substancji leczniczej [72].

Ułatwienie sposobu przyjęcia leku, związane z zastosowaniem postaci rozpuszczalnych w jamie ustnej, jest istotne dla pacjentów mających problemy z połykaniem wynikające z wieku (osoby starsze i dzieci) lub stanu chorobowego (dysfagia, nudności w przebiegu chemio- i radioterapii, zawał mięśnia sercowego, choroba Parkinsona, inne choroby neurologiczne) [76]. Ponadto, szybko rozpuszczalne formy doustne są korzystniejsze dla pacjentów, u których wymagany jest ścisły nadzór nad przyjmowaniem leków, np. w leczeniu chorób psychicznych, a także w przypadku,

gdy lek musi zostać przyjęty szybko, niezależnie od sytuacji, np. w podróży (substancje przeciwbólowe, przeciwmigrenowe, czy przeciwalergiczne) [72, 76].

Pierwszą metodą (opracowaną pod koniec lat 70. XX w. w laboratoriach firmy Wyeth w Wielkiej Brytanii) wykorzystywaną w produkcji tabletek szybko rozpuszczalnych w jamie ustnej była liofilizacja i do tej pory na bazie tej technologii opracowano najwięcej produktów, które zostały wdrożone do użytku (w sumie ponad 20 preparatów z różnymi substancjami leczniczymi) [72, 74]. Przykłady obecnie produkowanych tabletek liofilizowanych zaprezentowano w tabeli 6.

Technologia otrzymywania liofilizatów doustnych, polega na suszeniu zamrożonych roztworów, zawiesin lub emulsji (typu o/w) substancji leczniczej wraz z substancjami pomocniczymi, rozdozowanych uprzednio do gniazd blistra. Szybkie schładzanie blisterów powoduje zamrożenie układu z jednoczesną krystalizacją lodu w postaci drobnych kryształów, które przy obniżonym ciśnieniu sublimują, pozostawiając porowatą matrycę tabletki. Dzięki dużej porowatości liofilizaty doustne rozpraszają się w jamie ustnej w ciągu kilku sekund (najszybciej ze wszystkich form łatwo rozpuszczalnych) [73, 77–79].

Produkcja tabletek liofilizowanych zawierających substancję leczniczą w formie rozpuszczonej lub zawieszanej (technologia Zydis) jest wieloetapowa, czasochłonna i kosztowna (wymaga użycia specjalistycznego sprzętu), dlatego trwają prace nad modyfikacją technologii bazujących na procesie suszenia sublimacyjnego. Technologia Lyoc polega na sublimacyjnym suszeniu emulsji o/w, rozdozowanej do gniazd blistra w postaci cienkiej warstwy o konsystencji pasty [75], natomiast technologia Quicksolv wykorzystuje ekstrakcję wody z zamrożonego materiału etanolem lub innym rozpuszczalnikiem [74, 80]. W kolejnej metodzie LyoPan, proponuje się podzielenie składników tabletki na frakcje, w zależności od rozpuszczalności w wodzie. Substancje nierozpuszczalne układa się warstwowo w gniazdach blistra, a następnie wprowadza się substancje rozpuszczalne w formie roztworu. Ilość wody dobiera się tak, żeby roztwór wypełnił wszystkie wolne przestrzenie utworzone przez warstwę cząstek stałych. Pozwala to na ograniczenie o 40–70% ilości wody potrzebnej do przygotowania preparatu, a przez to umożliwia znaczne skrócenie procesu suszenia liofilizacyjnego i redukcję kosztów produkcji [81].

Tab. 6. Przykłady handlowych preparatów w formie tabletek szybko rozpuszczalnych

Technologia	Produkt leczniczy		
	Nazwa handlowa	Producent	Substancja lecznicza (dawka)
LIOFILIZACJA			
Zydis	Clarinet RediTabs	Schering-Plough	desloratadyna (5 mg)
	Claritin RediTabs		loratadyna (10 mg)
	Feldene Melt	Pfizer	piroksykam (10 i 20 mg)
	Klonopin Wafers	Roche Laboratories	klonazepam (0,125; 0,25; 0,5; 1 i 2 mg)
	Maxalt RPD **	MSD	ryzatryptanu benzoesan (5 i 10 mg)
	Otraselel	Cephalon	selegiliny chlorowodorek (1,25 mg)
	Pepcid RPD	Merck	famotydyna (20 i 40 mg)
	Zofran Zydis **	GSK	ondansetronu chlorowodorek (4 i 8 mg)
	Zyprexa Zydis	Eli Lilly	olanzapina (5; 10; 15 i 20 mg)
Lyoc	Loperamide Lyoc		loperamidu chlorowodorek (2 mg)
	Paralyoc	Cephalon	paracetamol (250 i 500 mg)
	Proxalyoc		piroksykam (20 mg)
	Seglor Lyoc	Schwarz Pharma	dihydroergotaminy metanosulfonian (5 mg)
	Sermion Lyoc	Aventis	nicergolina (5 i 10 mg)
	Spasfon Lyoc	Cephalon	floroglucynol (80 mg)
	Vogalene Lyoc	Schwarz Pharma	metopimazyna (7,5 mg)
	Imodium Instant **	Janssen-Cilag	loperamidu chlorowodorek (2 mg)
Quicksolv	Propulsid Quicksolv	Janssen-Cilag	cyzaprydu monowodzian (10 mg)
	Risperdal M-Tab	Janssen-Cilag	rysperydon (0,5; 1 i 2 mg)
PRASOWANIE			
OraSolv	Remeron Soltab	Organon	mirtazapina (15; 30 i 45 mg)
	Temptra FirstTabs	Mead Johnson Nutritionals	paracetamol (80 i 160 mg)
	Triaminic Softchew	Novartis	chlorfenamina (1 mg) dekstrometorfan (5 mg) pseudoefedryna (15mg)
DuraSolv	Alavert	Wyeth	loratadyna (10 mg)
	Kemstro	Schwarz Pharma	baklofen (10 i 20 mg)
	NuLev	Schwarz Pharma	hioscyjaminsy siarczan (0,125 mg)
	Zomig ZMT	Astra Zeneca	zolmitryptan (2,5 mg)
Flashtab	Excedrin QuickTabs	Bristol-Myers Squibb	paracetamol (500 mg) kofeina (65 mg)
	Nurofen Topss **	Boots Healthcare	ibuprofen (100 mg)
PRASOWANIE/FORMOWANIE			
WOWTAB	Benadryl Fastmelt	Pfizer	difenhydraminy cytrynian (19 mg) pseudoefedryny chlorowodorek (30 mg)
	Children's Benadryl Fastmelt		difenhydraminy cytrynian (19 mg)

** – preparaty zarejestrowane w Polsce

Oprócz metody liofilizacji tabletki szybko rozpadające się w jamie ustnej mogą być otrzymywane na drodze formowania lub prasowania. Niektóre technologie mogą wykorzystywać dwa procesy (np. formowanie, a następnie prasowanie), inne oparte są na pewnych modyfikacjach tych trzech podstawowych sposobów [75, 76]. Różnice we właściwościach produktów szybko rozpuszczalnych uzyskiwanych poszczególnymi metodami (technologiami) zestawiono w tabeli 7, natomiast przykłady preparatów handlowych podano w tabeli 6.

Prasowanie (tabletkowanie) jest najprostszą metodą otrzymywania tabletek szybko rozpuszczalnych w jamie ustnej. Tabletki tego typu uzyskuje się w konwencjonalnych prasach – tabletkarkach, dzięki czemu proces ich otrzymywania jest szybki i ekonomiczny. Istnieje kilka firm, które opatentowały sposób wytwarzania tego typu tabletek metodą prasowania, nadając tym technologiom takie nazwy jak: OraSolv, DuraSolv, Flashtab i AdvaTab [75, 77].

Metoda wytłaczania (formowania) tabletek polega na wytłaczaniu do form mieszaniny substancji leczniczej z cukrami, zwilżonej wodą lub etanolem. Po procesie suszenia uzyskuje się tabletki o niskiej wytrzymałości mechanicznej. Technologia WOWTAB wykorzystuje zarówno etap formowania, jak i prasowania substancji leczniczej z mieszaniną cukrów o różnych właściwościach [75, 77].

Tab. 7. Właściwości tabletek szybko rozpuszczalnych w jamie ustnej w zależności od metody ich sporządzania [72, 74, 77, 80]

Technologia (producent)	Czas rozpadu tabletki (in vitro) [s]	Maksymalna dawka [mg]	Właściwości mechaniczne tabletek	Rodzaj opakowania *
Zydis (Cardinal Health)	3 – 5	<400	bardzo kruche, łamliwe	B
Lyoc (Cephalon)	<10	<1000	miękkie, łamliwe	B
AdvaTab (Eurand)	15 – 30	<700	twarde, odporne	P/B
OraSolv (CIMA)	<30	<750	miękkie, łamliwe	B
DuraSolv (CIMA)	<30	<500	twarde, odporne	P/B
FlashTab (Ethypharm)	30 – 60	<650	stosunkowo odporne	B
WOWTAB (Yamanouchi)	<30	<500	stosunkowo odporne	P/B

* - P – pojemnik zbiorczy (słoiczek), B – blister

Większość tabletek szybko rozpuszczalnych w jamie ustnej, szczególnie formy otrzymywane metodą liofilizacji lub w technologii OraSolv (tabela 7), charakteryzuje się niską odpornością mechaniczną i jednocześnie silną higroskopijnością, wynikającą z ich dużej porowatości. Zmusza to producentów do zastosowania specjalnych rodzajów opakowań – blistrów o odpowiedniej konstrukcji. Najczęściej wykorzystywanymi materiałami do produkcji tego typu blistrów jest aluminium, polichlorotrifluoroetylen (PCTFE), polichlorek winylidenu (PVDC) lub ich połączenie z PVC. Często w celu lepszej ochrony blister zawierający tabletki liofilizowane umieszczany jest przez producenta w dodatkowej torebce aluminiowej lub plastikowym pudełku. W odróżnieniu od tradycyjnych tabletek liofilizaty nie mogą być wyjmowane z blistra na zasadzie wypchnięcia tabletki, połączonego z przerwaniem folii aluminiowej. Folie na blistrach z tabletkami liofilizowanymi zakrywają pojedyncze gniazda i mogą być oderwane lub odklejone, bez ryzyka zniszczenia tabletek i bez konieczności narażania sąsiednich tabletek na kontakt z wilgocią [82, 83].

Mimo dużej różnorodności technik tworzenia tabletek szybko rozpuszczalnych w jamie ustnej należy przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości na rynku pojawią się kolejne formy, będące obecnie na etapie badań rozwojowych lub klinicznych. Już teraz w piśmiennictwie dostępne są informacje o nowo wdrażanych technologiach, takich jak: Kryotab, Quick-Dis, Qdis, Frosta, czy Rapirol [74, 77].

Tabletki szybko rozpadające się w jamie ustnej przygotowywane są dla tych substancji leczniczych, które powinny działać szybko, niemalże natychmiast po zażyciu. Substancje te, uwalniane w jamie ustnej po rozpadzie tabletki, połykane są wraz ze śliną i ulegają wchłanianiu w odpowiednim odcinku przewodu pokarmowego (żołądka lub jelicie), podobnie jak w przypadku tradycyjnych form doustnych (tabletek, kapsułek lub roztworów). Okazuje się jednak, że niektóre substancje mogą ulegać wchłanianiu do krwiobiegu już z jamy ustnej, w krótkim czasie po rozpuszczeniu w ślinie [72, 74, 76, 80, 84].

Zastosowanie dla takich substancji leczniczych polimeru mukoadhezyjnego, jako matrycy systemu liofilizowanego, może przedłużyć nawet do kilku godzin czas ich przebywania i uwalniania z postaci leku. Ponadto, dobre ukrwienie błony śluzowej policzka przez naczynia krwionośne omijające krążenie wątrobowe może sprzyjać ograniczeniu metabolizmu tych substancji leczniczych, a przez to zwiększyć ich biodostępność.

Otrzymanie tabletek szybko rozpuszczalnych w jamie ustnej, o odpowiednich właściwościach aplikacyjnych, możliwe jest dzięki zastosowaniu właściwych substancji pomocniczych, zależnie od wybranej technologii. Należy zaznaczyć, że metoda liofilizacji pozwala na znaczne ograniczenie masy potrzebnych substancji

pomocniczych, a otrzymane formy, z powodu porowatości, mają ok. 30-krotnie mniejszą masę w porównaniu do tradycyjnych tabletek [72].

Typowymi substancjami pomocniczymi wykorzystywanymi w produkcji tabletek liofilizowanych są: substancje wiążące (żelatyna, pochodne celulozy, powidon) stanowiące szkielet tabletek i nadające im odpowiednią twardość, substancje wypełniające (cukry i alkohole cukrowe) oraz substancje słodzące (aspartam, sacharyna sodowa) i aromaty (najczęściej miętowy, wiśniowy i pomarańczowy). Te ostatnie są niezwykle ważne, ponieważ ich zadaniem jest maskowanie nieprzyjemnego, najczęściej gorzkiego, smaku substancji leczniczych [77].

Charakterystycznym składnikiem niemal wszystkich omawianych preparatów są alkohole cukrowe, takie jak: mannitol, sorbitol, czy ksylitol, które oprócz właściwości słodzących w trakcie rozpuszczania w jamie ustnej dają efekt chłodzenia, korzystnie wpływający na odczucia pacjentów [72]. Do tej grupy należy także erytrytol, stosunkowo mało znany alkohol otrzymywany w wyniku fermentacji glukozy. Substancja ta, dzięki niskiej higroskopijności, dobrej zsypywalności i dużej trwałości, a także doskonałym parametrom organoleptycznym, może stanowić cenną alternatywę dla najpowszechniej używanego obecnie mannitolu [85].

Maskowanie nieprzyjemnego smaku substancji leczniczej można także uzyskać stosując następujące procesy [77, 86, 87]:

- tworzenie peletek i ich powlekanie odpowiednim polimerem,
- mikrokapsułkowanie substancji leczniczej metodą koacerwacji,
- suszenie rozpyłowe zawiesiny lub roztworu substancji leczniczej w roztworze polimeru,
- tworzenie kompleksów substancji leczniczej z cyklodekstrynami.

Przykładem takiego rozwiązania jest opatentowana przez firmę CIMA technologia SolTab. Pierwsza szybko rozpuszczalna w jamie ustnej forma tego typu zawierająca lek przeciwdepresyjny – mirtazapinę, została dopuszczona przez FDA do obrotu na rynku amerykańskim w styczniu 2001 r. Matryca tej tabletki ulega w jamie ustnej całkowitemu rozpadowi, z wyjątkiem peletek, które zostają połknięte wraz ze śliną. Uwalnianie substancji leczniczej z peletek następuje w środowisku żołądka [88].

W badaniu przeprowadzonym na 40 ochotnikach wykazano biorównoważność mirtazapiny podanej w formie tabletki szybko rozpuszczalnej zawierającej powlekane peletki (Remeron SolTab) z konwencjonalną tabletką (Remeron) [89]. Okazało się także, że większość pacjentów preferuje formę tabletki szybko rozpuszczalnej, przez co chętniej akceptuje konieczność zażycia kolejnych dawek i ściślej stosuje się do zaleceń lekarza. Tylko 12% badanych uznała, że korzystniejszą formą jest tabletki konwencjonalna [90].

Charakterystyka systemów mikroziornikowych

Jednym z istotniejszych obecnie kierunków rozwoju technologii farmaceutycznej jest opracowywanie wielokompartментowych postaci leku, które nie tylko stwarzają większe możliwości kontroli uwalniania substancji leczniczej a przez to modyfikowania dostępności biologicznej, ale także zapewniają większe bezpieczeństwo farmakoterapii. Pojęcie lek wielokompartментowy (wielozbiornikowy, mikrokompartментowy) obejmuje postacie leku, w których dawka substancji leczniczej rozdzielona jest pomiędzy liczne mikrocząstki stanowiące jej nośnik lub zbiornik [91]. Obecnie stosowane systemy wielokompartментowe mają postać stałych doustnych form leku (tabletki bądź kapsułki) lub zawiesin mikroziornikowych podawanych parenteralnie.

Mikroziorniki substancji leczniczej mogą mieć formę matryc (np. mikrosfery) lub kapsułek (mikrokapsułki) [91, 92]. Matrycę mikrosfer stanowi polimer, w którym substancja lecznicza jest rozpuszczona lub zawieszona, natomiast w mikrokapsułce substancja lecznicza zawarta w obojętnym nośniku – rdzeniu (stałym bądź płynnym), zamknięta jest w otoczce utworzonej przez polimer. W obu formach profil uwalniania substancji leczniczej można modyfikować poprzez dobór odpowiedniego polimeru, ale mechanizm uwalniania leku z form mikromatrycowych i mikrokapsułek jest różny. Jeżeli matryca mikrosfery wykonana jest z polimeru nierozpuszczalnego lub pęczniejącego w wodzie, to uwalnianie substancji leczniczej zachodzi w wyniku powolnej dyfuzji w masie polimeru, często z wykorzystaniem mikroporów. Jeżeli matryca polimerowa jest rozpuszczalna w wodzie lub ulega degradacji enzymatycznej, dochodzi do jej powierzchniowej erozji z jednoczesnym uwolnieniem leku na powierzchni, postępującym w miarę rozpuszczania polimeru. Szybkość uwalniania substancji leczniczej z mikrosfer jest różna i w zależności od rodzaju użytej matrycy polimerowej może wahać się od kilku godzin do kilku miesięcy. Mechanizm uwalniania leku z mikrokapsułek polega na jego dyfuzji z rdzenia przez materiał otoczki, a o szybkości uwalniania w dużym stopniu decyduje grubość otoczki polimerowej.

Dobór substancji pomocniczych (polimerów), a także rodzaju i rozmiaru mikroziorników, zależy od drogi podania i właściwości substancji leczniczej. W przypadku podania doustnego najczęściej korzysta się ze stałych form mikroziornikowych – minitabletek i peletek powlekanych, które dozuje się do kapsułek lub tabletkuje. Formy mniejsze: nano- lub mikrosfery oraz nano- lub mikrokapsułki, mogą być składnikami systemów podawanych w postaci zawiesin drogą pozajelitową, do oka, pęcherzyków płucnych lub na błonę śluzową [91, 93].

Peletki to podstawowy składnik systemów doustnych. Najczęściej otrzymuje się je granulując sproszkowane składniki (substancję leczniczą z substancjami pomocniczymi) po dodaniu roztworu polimeru, pełniącego rolę lepiszcza [1, 3, 91]. Odpowiedni rozmiar cząstek granulatu zapewnia etap ekstruzji, a kulisty kształt nadawany jest granulkom w procesie sferonizacji. Aby otrzymać formy charakteryzujące się przedłużonym uwalnianiem lub uwalniające w konkretnym odcinku przewodu pokarmowego, sporządzone peletki powleka się otoczkami polimerowymi, np. z polimetakrylanu lub etylocelulozy, najczęściej metodą fluidalną. Proces powlekania przebiega stosunkowo łatwo przy korzystaniu z rdzeni o wielkości 0,8 – 1,2 mm (zazwyczaj stosuje się peletki tej wielkości). Znacznie trudniejsze jest opracowanie powtarzalnej metody powlekania form mniejszych, których wielkość mieści się w zakresie 100 – 300 μm .

Przewaga doustnego systemu wielokompartimentowego, złożonego z wielu mikrozbiorników polimerowych, nad tradycyjną tabletką o przedłużonym uwalnianiu wynika zarówno z bezpieczeństwa stosowania leku przez pacjenta (ryzyko uwolnienia zbyt dużej dawki leku po uszkodzeniu otoczki w tabletkę konwencjonalnej, możliwość przyłgnięcia tabletki do ściany żołądka i narażenie na lokalne działanie drażniące leku), jak również większych możliwości modyfikacji profilu uwalniania substancji leczniczej. W jednej kapsułce można umieszczać peletki niepowlekane oraz peletki powlekane otoczkami o różnej grubości, co zapewnia uzyskanie natychmiastowego i jednocześnie przedłużonego działania leku. Dzięki dużej powierzchni uwalniania substancja lecznicza uwalnia się z systemów mikrozbiornikowych z wysoką powtarzalnością, natomiast krótka droga dyfuzji leku z mikrocząstki zapewnia lepsze wykorzystanie całej dawki, co w konsekwencji pozwala nawet na jej redukcję [91].

Podstawową zaletą mikro- i nanocząstek jest możliwość ich aplikacji parenteralnie lub do oka. Systemy mikrozbiornikowe podawane są pozajelitowo w celu uzyskania przedłużonego działania leku, który uwalniając się powoli z cząstek (w czasie 1 – 3 miesięcy) zapewnia stały poziom terapeutyczny we krwi, minimalizując działania niepożądane z jednoczesną redukcją częstości iniekcji [92, 93].

Największe możliwości aplikacyjne stwarzają cząstki, których matryce tworzone są z polimerów biodegradowalnych, np. polimeru kwasu mlekowego (PLA) lub kopolimeru tego kwasu z kwasem glikolowym (PLGA). Mimo że wielkość cząstek zbudowanych z tych polimerów nie przekracza zazwyczaj 30 μm , to mogą one uwalniać substancje lecznicze w czasie nawet do 3 miesięcy. Mikrosfery tego typu w porównaniu z zawiesinami zapewniają dłuższy czas uwalniania substancji leczniczej, a więc i działania, natomiast w odróżnieniu od implantów ich aplikacja nie wymaga ingerencji chirurgicznej – są wstrzykiwane za pomocą igły i strzykawki. Obecnie w

lecznictwie wykorzystuje się mikrosfery z takimi substancjami leczniczymi jak: leuprorelina, goserelina, tryptorelina, buserelina i bromokryptyna [91, 93].

Podobne zalety, potwierdzone na razie tylko w badaniach naukowych, posiadają formy mikroziornikowe podawane do worka spojówkowego. Wymagają one tylko jedno- lub dwukrotnego stosowania w ciągu dnia, zapewniają długotrwałe działanie substancji leczniczej, są bezpieczniejsze a dodatkowo nie zaburzają widzenia, w przeciwieństwie do tradycyjnych form o przedłużonym działaniu, takich jak: roztwory o zwiększonej lepkości, czy roztwory olejowe [94]. Chociaż na razie do leczenia nie wprowadzono żadnego preparatu mikroziornikowego stosowanego do oka, intensywność tych badań daje szansę na nowe wdrożenia.

Mikrocząstki i nanocząstki uzyskuje się zazwyczaj stosując te same metody, a wielkość utworzonych form zależy od doboru parametrów procesu, np. intensywności mieszania, czy ilości emulgatorów. Niektóre jednak metody służą do otrzymania mikrocząstek, a nie nadają się do sporządzania nanocząstek (np. powlekanie w warstwie fluidalnej) [93]. Mikrokapsułki najczęściej otrzymuje się takimi metodami jak: polimeryzacja międzyfazowa, koacerwacja w środowisku wodnym lub organicznym, topliwa dyspersja oraz powlekanie w warstwie fluidalnej [95].

Mikro- i nanosfery uzyskuje się stosując [93]:

- polimeryzację w fazie wodnej lub organicznej,
- tworzenie emulsji i usuwanie rozpuszczalnika organicznego,
- koacerwację w środowisku wodnym,
- topliwą dyspersję,
- suszenie rozpyłowe,
- mielenie filmu polimerowego.

Najpopularniejszą metodą sporządzania nano- i mikrosfer jest suszenie rozpyłowe oraz metoda emulsyjna [93]. Metoda tworzenia emulsji wielokrotnej typu w/o/w, z wykorzystaniem jako faz wodnych roztworu żelatyny i roztworu alkoholu poliwinylowego oraz chlorku metylenu jako fazy organicznej, służy do produkcji mikrosfer z octanem leuproreliny – preparatu handlowego zarejestrowanego pod nazwą Lucrin-Depot. Forma mikrosfer powstaje w wyniku kilkugodzinnego odparowywania chlorku metylenu z utworzonej emulsji, przemywania otrzymanych cząstek i ich suszenia metodą liofilizacji. Inny rodzaj suszenia ochronnego – suszenie rozpyłowe – roztworu lub emulsji substancji leczniczej w chlorku metylenu także umożliwia utworzenie form mikroziornikowych, a przykładem preparatu handlowego sporządzanego w ten sposób jest Parlodel zawierający mikrosfery z bromokryptyną. Proces tworzenia mikrosfer w obu tych metodach przebiega w temperaturach poniżej

50°C, a więc umożliwia sporządzanie mikrocząstek z substancjami termolabilnymi, np. z lekami peptydowymi [93].

Mikrozbiorniki można także uzyskiwać metodami, w których nie wykorzystuje się rozpuszczalników organicznych. Najbardziej pożądane są cząstki biodegradowalne, których matryca wykonana jest z polimerów pochodzenia naturalnego takich jak: albuminy, kolagen, alginian, chitozan i pektyna [93, 96]. Sferyczne cząstki stałe tworzy się na drodze denaturacji lub sieciowania polimeru, np. chitozan lub kolagen sieciuje się aldehydem glutarowym, natomiast alginian lub pektynę sieciuje się jonami wielowartościowymi: wapniem, cynkiem, strontem [97]. W zależności od czasu kontaktu kropli alginianu z jonami wapnia, można tworzyć zarówno mikrosfery (długi czas kontaktu), jak i mikrokapsułki (krótki czas kontaktu) [93]. Początkowo mikrokapsułki tego typu używane były jako nośnik żywych komórek, a obecnie prowadzi się wiele badań nad możliwością inkorporacji w ich wnętrzu substancji leczniczych, wykorzystując coraz częściej chitozan jako substancję bardziej biozgodną niż alginian [92, 96].

Mimo że niewiele metod otrzymywania systemów mikrozbiornikowych (wielokompartimentowych) wdrożonych jest do produkcji na skalę przemysłową, a poza postaciami doustnymi i pozajelitowymi nie ma leków stosowanych w tej formie, to intensywność prowadzonych badań nad tymi formami musi zaowocować kolejnymi rozwiązaniami aplikacyjnymi. Być może będzie to jedna z form liposfer – mikrosfer lub nanosfer lipidowych – nad którymi pracuje obecnie wiele ośrodków naukowych.

Nowoczesne formy leku z selegiliną

Selegilina należy do inhibitorów monoaminooksydazy II generacji, a jej działanie polega na selektywnym i nieodwracalnym blokowaniu izoenzymu MAO – B. Farmakologicznym efektem jej działania jest podwyższenie stężenia dopaminy w mózgu, co jest wykorzystywane w leczeniu wczesnego stadium choroby Parkinsona, parkinsonizmie objawowym, otępieniu przedstarczym i starczym typu Alzheimerera [98]. Jeżeli dawka dobową selegiliny przekracza 10 mg, to substancja traci właściwości selektywnej inhibicji MAO – B, co może powodować pojawienie się działań niepożądanych i interakcji typowych dla nieselektywnych inhibitorów MAO, takich jak: interakcje z żywnością (tyraminą), lekami oraz ortostatyczne spadki ciśnienia [99].

Synteza chemiczna tej substancji, początkowo w formie mieszaniny racemicznej, została opracowana przez Knolla i współpracowników w roku 1964 [100]. Okazało się, że skuteczność izomeru L jest znacznie większa niż izomeru D, a produkty jego rozkładu wykazują mniejszą ilość działań niepożądanych i dlatego

obecnie korzysta się wyłącznie z tej formy substancji leczniczej. Właściwości fizykochemiczne chlorowodoru selegiliny zebrano w tabeli 8.

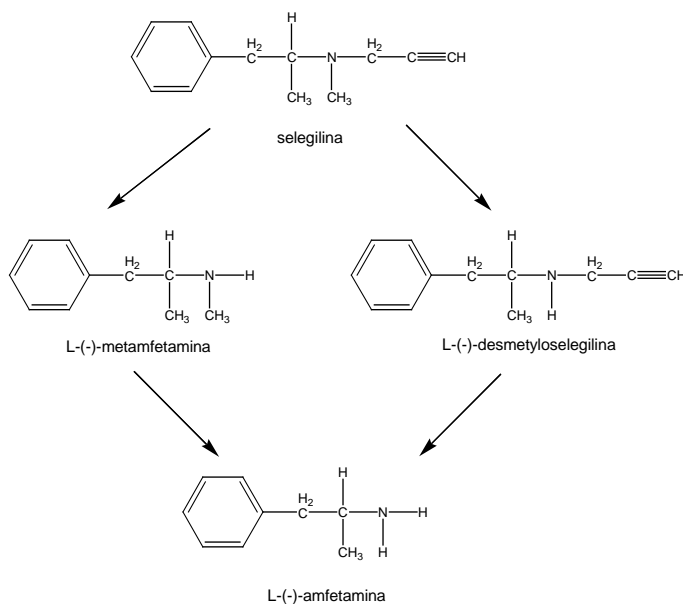
Po podaniu doustnym selegilina łatwo wchłania się z przewodu pokarmowego, wiąże się w ok. 94% z białkami osocza, osiągając maksymalne stężenie w ciągu 0,5–2 h [100]. W wątrobie jest silnie metabolizowana do desmetyloselegiliny i metamfetaminy, a te z kolei przekształcane są do amfetaminy (ryc. 9). Za metabolizm selegiliny odpowiedzialne są monooksygenazy zależne od cytochromu P450. Około 86% dawki selegiliny wydalone jest z moczem w ciągu 24 h.

Tab. 8. Właściwości fizykochemiczne chlorowodoru selegiliny

Parametr	Właściwości	Źródło
Masa molowa	223,7	
Rozpuszczalność	Łatwo rozpuszcza się w wodzie i w metanolu, trudno rozpuszcza się w acetonie	Pharm. Eur. 6
Temp. topnienia	ok. 143 °C	
pH (2% roztwór)	3,5 – 4,5	
pK _a	6,8; 7,5	101, 104
Log P	3,4 (obliczony)	101
t _{0,5}	10 h (podanie doustne) 20 h (podanie przezskórne)	105

W Polsce zarejestrowanych jest obecnie 6 preparatów w postaci tabletek konwencjonalnych (Apo-Selin, Jumex, Segan, Selerin, Selgres, Selegin) zawierających selegilinę w formie chlorowodoru, w dawce 5 mg, które przyjmuje się co 12 h [102].

Ponieważ dla substancji leczniczych stosowanych w schorzeniach układu nerwowego istotne jest nie tylko otrzymanie formy o optymalnej farmakokinetyce, ale także postaci łatwej w użyciu, zapewniającej długotrwałe działanie, z możliwością jednokrotnego podania w ciągu dnia [103], ciągle opracowuje się nowe, korzystniejsze formy zawierające tę samą substancję leczniczą. Dotyczy to również selegiliny.



Ryc. 9. Metabolizm selegiliny [wg ref. 101].

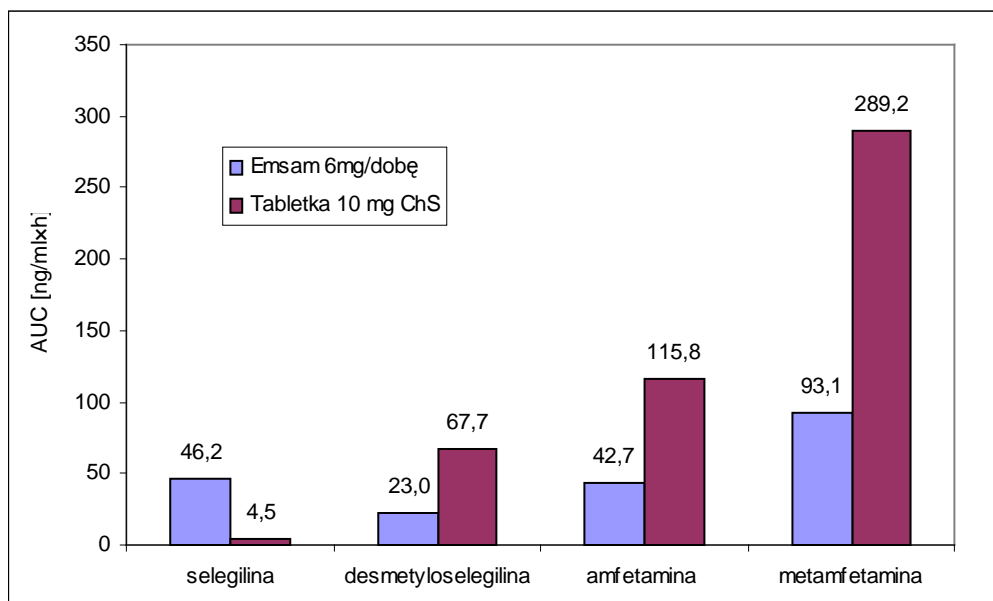
Oprócz tabletek konwencjonalnych chlorowodorek selegiliny występuje także w liofilizowanej postaci doustnej (ODT), produkowanej w technologii Zydis, zarejestrowanej pod nazwą Otrassel lub Zelapar (tabela 6). W Polsce preparat ten jest niedostępny. Liofilizat doustny zawiera 1,25 mg substancji leczniczej w matrycy wykonanej z żelatyny i mannitolu, która w kontakcie ze śliną w jamie ustnej rozpada się w ciągu kilku sekund [106]. Zażycie leku sprowadza się więc w tym przypadku do przełknięcia śliny, a eliminacja etapu połykania formy leku ma olbrzymie znaczenie dla pacjentów z chorobą Parkinsona. Ponadto udowodniono, że selegilina uwolniona z liofilizatu, dzięki niskiej masie cząsteczkowej i odpowiedniej wartości pK_a (tabela 8) ulega wchłanianiu przez błonę śluzową jamy ustnej, co pozwala na ominięcie efektu pierwszego przejścia, uzyskanie wyższych stężeń substancji leczniczej w osoczu i obniżenie stężeń aktywnych metabolitów [106, 107]. Kolejną zaletą tej postaci leku jest natychmiastowe uzyskanie terapeutycznego stężenia selegiliny we krwi, przy jednoczesnym mniejszym zróżnicowaniu tych stężeń, w porównaniu z typowym podaniem doustnym. Różnice w farmakokinetyce selegiliny z tabletek liofilizowanych i konwencjonalnych przedstawia tabela 9.

Tab. 9. Porównanie parametrów farmakokinetycznych selegiliny po podaniu liofilizatu doustnego i tabletki konwencjonalnej [106]

Postać leku	Dawka [mg]	AUC [ng/ml×h]	C _{max} [ng/ml]	T _{max} [h]
Liofilizat doustny	1,25	1,3	2,4	0,25
	2,5	2,3	3,4	0,25
Tabletka konwencjonalna	10,0	1,4	1,5	1

Korzystne właściwości fizykochemiczne selegiliny, umożliwiające dobre przenikanie przez bariery biologiczne sprawiły, że rozpoczęto badania nad opracowaniem systemu transdermalnego, charakteryzującego się przedłużonym uwalnianiem tej substancji leczniczej. O dużym zainteresowaniu przezskórnym podaniem selegiliny w leczeniu choroby Parkinsona może świadczyć także opublikowanie w literaturze fachowej przepisu recepturowego na żel z chlorowodorkiem selegiliny, z możliwością wykonania go w warunkach aptecznych [108]. Opisywany preparat zawiera 10 mg substancji leczniczej w 1 ml żelu złożonego z lecytyny, palmitynianu izopropylu i Pluronicu F127. Wskazaniem do jego stosowania, oprócz choroby Parkinsona są także inne schorzenia przebiegające z upośledzeniem funkcji poznawczych.

Pierwszym transdermalnym preparatem selegiliny, wykorzystywanym w leczeniu depresji, dopuszczonym przez FDA na rynek amerykański w 2006 r. jest Emsam [105]. Jest to matrycowy system terapeutyczny zawierający selegilinę w formie zasady w 3 dawkach: 20 mg/20 cm², 30 mg/30 cm² i 40 mg/40 cm². Po aplikacji na skórę substancja lecznicza uwalnia się z systemu z kontrolowaną szybkością i wchłania się w ilości odpowiednio 6, 9 i 12 mg/dobę. W porównaniu do podania selegiliny w postaci tabletek konwencjonalnych, zastosowanie systemu transdermalnego zapewnia utrzymanie stałego stężenia selegiliny w osoczu, z jednoczesną redukcją stężenia jej metabolitów (ryc. 10) [105].



Ryc. 10. Średnie wartości AUC selegiliny i jej trzech metabolitów po 24 h aplikacji systemu transdermalnego Emsam i po jednorazowym doustnym podaniu tabletki [wg ref. 105].

Przytoczone przykłady 2 preparatów selegiliny – liofilizatu doustnego oraz matrycowego systemu transdermalnego – obrazują rolę technologii postaci leku w nowoczesnej farmakoterapii. Obecnie, w zależności od wskazania terapeutycznego, możliwe jest zaprojektowanie dla tej samej substancji leczniczej formy o przedłużonym działaniu, utrzymującym się nawet przez 24 h (system Emsam) lub łatwo rozpuszczalnej w jamie ustnej formy zapewniającej niemal natychmiastowe działanie (liofilizat Otrassel). Te nowoczesne formy, dostosowane do potrzeb odpowiednich grup pacjentów, są nie tylko skuteczniejsze i bezpieczniejsze, ale także dzięki łatwej aplikacji umożliwiają lepszą współpracę między pacjentem a lekarzem.

Korzystne właściwości farmakokinetyczne selegiliny oraz możliwość dodatkowego ograniczenia silnego metabolizmu tej substancji leczniczej przez podanie podpoliczkowe, uzasadniają badania nad opracowaniem nowej formy leku charakteryzującego się przedłużonym uwalnianiem i wchłanianiem przez błonę śluzową jamy ustnej.

II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Celem badań było opracowanie dopoliczkowego krążka mukoadhezyjnego charakteryzującego się przedłużonym uwalnianiem selegiliny. Selegilina – nieodwracalny inhibitor monoaminoooksydazy typu B, jest wykorzystywana w leczeniu choroby Parkinsona, zarówno w skojarzeniu z innymi lekami, jak i w monoterapii. Jest to substancja, która po podaniu doustnym podlega silnemu efektowi pierwszego przejścia, przez co poszukuje się nowych form jej podania, umożliwiających ograniczenie intensywnego metabolizmu wątrobowo – jelitowego. Proponuje się przede wszystkim dwie nowe, alternatywne drogi podania selegiliny: przezskórną oraz przez błonę śluzową jamy ustnej. Intensywne badania w ostatnich latach doprowadziły do opracowania i zarejestrowania 2 nowych preparatów tej substancji leczniczej – liofilizatu doustnego oraz systemu transdermalnego. Przewaga nowoczesnych form selegiliny nad tradycyjnymi postaciami doustnymi (tabletkami konwencjonalnymi) polega zarówno na możliwości ograniczenia dawki substancji leczniczej, co wynika z odmiennej farmakokinetyki, jak również na łatwości przyjmowania leku.

Ponieważ, poza systemem transdermalnym, wszystkie stosowane obecnie doustne formy selegiliny charakteryzują się szybkim uwalnianiem substancji leczniczej, podjęto próbę opracowania mukoadhezyjnej postaci dopoliczkowej o przedłużonym uwalnianiu. Według założeń projektu selegilina z tej formy leku powinna uwalniać się tak, aby jednorazowa aplikacja zapewniała stałe dozowanie substancji leczniczej przez błonę śluzową policzka, przez okres 4–6 godzin. Kilkugodzinną adhezję formy do błony śluzowej ma zapewnić odpowiednio dobrany polimer mukoadhezyjny, stanowiący matrycę krążka. Dzięki zastosowaniu techniki suszenia liofilizacyjnego w procesie otrzymywania krążków, w porównaniu do tradycyjnych metod prasowania (tabletkowania) możliwe jest znaczne ograniczenie ilości potrzebnego polimeru mukoadhezyjnego i uzyskanie łatwo żelującego, plastycznego preparatu. Ponadto, liofilizacja jest procesem ochronnym względem substancji leczniczej, przez co proponowany system dopoliczkowy mógłby w przyszłości stanowić nośnik produktów biotechnologicznych. Spowolnione, kontrolowane uwalnianie substancji leczniczej z żelującej *in vivo* i ulegającej erozji matrycy mukoadhezyjnej jest możliwe dzięki wprowadzeniu do niej selegiliny zamkniętej w mikroziornikach tworzonych z nierozpuszczalnych polimerów. Taki system wielokompartментowy można otrzymać z zastosowaniem mikrokapsułek, mikrosfer, mikrogranulatów czy peletek i w pracy podjęto próbę inkorporacji selegiliny w tych formach.

W badaniach korzystano z dwóch form chemicznych selegiliny: krystalicznego chlorowodoru (ChS) oraz zasady, która miała postać oleistej cieczy. Obie formy tej substancji są wykorzystywane w leczeniu – postaci doustne zawierają ChS, natomiast zasada selegiliny wchodzi w skład systemu transdermalnego. Dzięki zastosowaniu w badaniach selegiliny jako ChS i zasady, możliwe było określenie wpływu właściwości fizykochemicznych substancji (np. rozpuszczalności w wodzie) na wydajność jej inkorporacji i jakość tworzonych krążków mukoadhezyjnych oraz ocena, w warunkach *in vitro*, wpływu tych dwóch form na uwalnianie i przenikanie substancji leczniczej przez błonę biologiczną.

Założone cele wymagały realizacji pracy w następujących etapach:

1. opracowanie metody wytwarzania mikroziorników (peletek, mikrosfer, mikrokapsułek, mikrogranulatu) zawierających ChS lub zasadę selegiliny,
2. ocena właściwości mikroziorników, obejmująca: badania wizualne (w tym mikroskopowe), określenie zawartości selegiliny i szybkości jej uwalniania z tych form,
3. otrzymywanie krążków placebo z polimerów mukoadhezyjnych (naturalnych i syntetycznych) metodą liofilizacji,
4. ocena właściwości mukoadhezyjnych (w warunkach *in vitro*) krążków liofilizowanych; opracowanie modelu badawczego oraz sposobu analizy uzyskanych wyników,
5. inkorporacja mikroziorników z substancją leczniczą do matrycy krążka i ocena sporządzonych form,
6. opracowanie metody otrzymywania krążków mukoadhezyjnych zawierających zasadę selegiliny w formie wolnej oraz w formie mikrokapsułek,
7. badanie szybkości uwalniania selegiliny z form aplikacyjnych w warunkach *in vitro*,
8. badanie kinetyki przenikania substancji leczniczej z krążków liofilizowanych w warunkach *in vitro*, z wykorzystaniem błony śluzowej policzka świni.

III. METODYKA

1. Wykaz używanych skrótów

- **AlgNa** – sodu alginian
- **ChS** – selegiliny chlorowoderek
- **CMCNa** – karmeloza sodowa
- **CP** – Carbopol 974P
- **EC** – etyloceluloza
- **G1, G2, G3, G4, G5, G6** – mikrogranulat z sieciowanej pektyny z ChS, seria 1 – 6 (p. 3.3.2.)
- **HEC** – hydroksyetyloceluloza
- **KCn-ChS** – krążek liofilizowany karmelozy sodowej zawierający ChS w formie substancji (p. 5.2.)
- **KCn-GE** – krążek liofilizowany karmelozy sodowej zawierający ChS w formie mikrogranulatu z sieciowanej pektyny, powlekanego Eudragitem RS (p. 5.3.3.)
- **KCP-ChS** – krążek liofilizowany Carbopolu zawierający ChS w formie substancji (p. 5.2.)
- **KCP-P-I, KCP-P-II, KCP-P-III** – krążek liofilizowany Carbopolu zawierający ChS w formie powlekanych peletek serii odpowiednio: P-I, P-II i P-III (p. 5.3.1.)
- **KHm-ChS** – krążek liofilizowany hypromelozy (Pharmacoat 615) zawierający ChS w formie substancji (p. 5.2.)
- **KHm-GE** – krążek liofilizowany hypromelozy (Pharmacoat 615) zawierający ChS w formie mikrogranulatu z sieciowanej pektyny, powlekanego Eudragitem RS (p. 5.3.3.)
- **KHm50-ChS** – krążek liofilizowany hypromelozy (Metolose 60 SH 50) zawierający ChS w formie substancji (p. 5.2.)
- **KHm4000-ChS** – krążek liofilizowany hypromelozy (Metolose 60 SH 4000) zawierający ChS w formie substancji (p. 5.2.)
- **KM-I, KM-II** – krążek liofilizowany Carbopolu zawierający ChS w formie mikrosfer serii odpowiednio: M-I i M-II (p. 5.3.1.)
- **KMe-ChS** – krążek liofilizowany metylocelulozy (Metolose SM 4000) zawierający ChS w formie substancji (p. 5.2.)
- **KO-ChS** – krążek liofilizowany Orabase zawierający ChS w formie substancji (p. 5.2.)
- **KO-XA, KO-G2** – krążek liofilizowany Orabase zawierający ChS w formie sieciowanego mikrogranulatu serii odpowiednio: XA i G2 (p. 5.3.2.)

- **KO-GE** – krążek liofilizowany Orabase zawierający ChS w formie mikrogranulatu z sieciowanej pektyny, powlekanego Eudragitem RS (p. 5.3.3.)
- **KP-G1** – krążek liofilizowany pektyny zawierający ChS w formie mikrogranulatu sieciowanej pektyny serii G1 (p. 5.3.2.)
- **M-I, M-II** – mikrosfery ChS, seria I i II (p. 3.2.)
- **MS955** – Gantrez MS-955
- **Orabase** – mieszanina pektyny, żelatyny i karmelozy sodowej (1:1:1); zawartość w roztworach – 6%
- **Pek** – pektyna
- **P-I, P-II, P-III** – powlekane peletki z ChS, seria 1 – 3 (p. 3.1.)
- **SKCP-I, SKCP-II** – krążek liofilizowany Carbopolu zawierający zasadę selegiliny w formie wolnej w ilości odpowiednio 200 mg lub 500 mg (p. 5.4.2.)
- **SKCP-EC** – krążek liofilizowany Carbopolu zawierający tworzone „in situ” mikrokapsułki EC z zasadą selegiliny w stosunku 2:1 (p. 5.4.3.)
- **SKHc** – krążek liofilizowany HEC zawierający zasadę selegiliny w formie wolnej (p. 5.4.2.)
- **SKHc-EC1-I, SKHc-EC2-I** – krążek liofilizowany HEC zawierający tworzone „in situ” mikrokapsułki EC z zasadą selegiliny w stosunku 1:1 i 2:1 (p. 5.4.3.)
- **SKHc-EC1-II, SKHc-EC2-II** – krążek liofilizowany HEC zawierający tworzone „in situ” mikrokapsułki EC z zasadą selegiliny w stosunku 1:1 i 2:1 (zwiększona zawartość selegiliny i etylocelulozy) (p. 5.4.3.)
- **XA** – mikrogranulat ChS z sieciowanego alginianu wapnia (p. 3.3.1.)
- **ZS** – zasada selegiliny

2. Aparatura, odczynniki i materiały

2.1. Aparatura

- Analizator tekstury TA.XT plus, Stable Micro Systems, *Godalming, Wielka Brytania*
- Aparat do granulacji i powlekania Uni – Glatt, Glatt Systemtechnik, *Drezno, Niemcy*
- Homogenizator – Ultra-Turrax T 25, IKA, *Staufen, Niemcy*
- Liofilizator – typ Alpha 2-4, Christ, *Osterode am Harz, Niemcy*
- Mieszadło elektromagnetyczne – typ MR 3001 K, Heidolph, *Kelheim, Niemcy*
- Mieszadło elektromagnetyczne ze stabilizacją temperatury – typ MS 11 HS, Wigo, *Piastów*
- Mieszadło łopatkowe, szybkoobrotowe – typ RW 20.n, IKA, *Staufen, Niemcy*
- Mieszadło wirowe – typ WL1, Biomix, *Blizne Jasińskiego*
- Mikroskop – typ B1-220A, Motic, *Wetzlar, Niemcy*, wyposażony w kamerę cyfrową Panasonic typ – GP-KR 222E, Matsushita Electric Industrial, *Osaka, Japonia*
- Młynek elektryczny – typ 651, Z.S.P. Niewiadów, *Niewiadów*
- Moździerz wibracyjny – typ KM1, Janetzki, *Lipsk, Niemcy*
- pH-metr – typ 350, Orion Research, *Boston, USA*
- Pompa perystaltyczna – typ ISM 404B, Ismatec, *Zurych, Szwajcaria*
- Pompa perystaltyczna – typ 1B.1003-R/65, Petro Gas Ausrüstungen, *Berlin, Niemcy*
- Pompa próżniowa – typ RZ 2, Vaccubrand, *Wertheim, Niemcy*
- Sferonizator, Caleva, *Surminster Newton, Wielka Brytania*
- Spektrofotometr UV/Vis – typ V530, Jasco, *Tokio, Japonia*
- Suszarka – typ KC-100/200, Zakłady Aparatury Precyzyjno-Medycznej „Premed”, *Marki*
- Tabletkarka uderzeniowa – typ EK0, Korsch, *Berlin, Niemcy*
- Waga analityczna – typ WAX 62, Zakład Mechaniki Precyzyjnej „Radwag”, *Radom*
- Waga elektroniczna – typ WPS 600/C/10, Zakład Mechaniki Precyzyjnej „Radwag”, *Radom*
- Wirówka – typ 4122, Heraeus-Christ, *Osterode, Niemcy*
- Wytrząsarka laboratoryjna – typ 357, Zakład Aparatury Elektronicznej „Elpan”, *Lubawa*
- Wytrząsarka laboratoryjna – typ GLS 400, Grant Instruments, *Shepreth, Wielka Brytania*

- Zamrażarka – typ CV 108 W, Zakłady Zmechanizowanego Sprzętu Domowego „Polar”, Wrocław
- Zestaw do HPLC – Merck Hitachi, Darmstadt, Niemcy; wyposażony w autosampler L7200, detektor UV-Vis L7420, pompę L7000

2.2. Odczynniki

- Aceton – POCh, Gliwice
- Acetonitryl do chromatografii – Merck, Darmstadt, Niemcy
- Alkohol poliwinylowy (m. cz. 27000) – Sigma - Aldrich, Buchs, Szwajcaria
- Amonu diwodorofosforan – POCh, Gliwice
- Aquacoat ECD NF (wodna dyspersja etylocelulozy) – FMC BioPolymer, Newark, USA
- Celulozoza mikrokrystaliczna Avicel PH-101 – FMC BioPolymer, Newark, USA
- Chloroform – Merck, Darmstadt, Niemcy
- Cykloheksan – POCh, Gliwice
- Cynku siarczan x 7H₂O – POCh, Gliwice
- Etanol 96% – Polmos, Warszawa
- Etyloceluloza – o lepkości 45 mPa•s (roztwór 5%) – MP Biomedicals, Solon, USA
- Etylu octan – POCh, Gliwice
- Eudragit RS (kopolimer kwasu metakrylowego) – Rhöm, Darmstadt, Niemcy
- Gantrez MS-955 (mieszanina soli sodowej i wapniowej kopolimeru kwasu maleinowego oraz eteru winylo-metylowego) – International Speciality Products, Wayne, USA
- Glikol propylenowy – Merck, Darmstadt, Niemcy
- n-Heksan – Merck, Darmstadt, Niemcy
- Hydroksyetyloceluloza typ 250M – o lepkości 5500 mPa•s (roztwór 2%), Hercules, Wilmington, USA
- Karbomer – Carbopol 974 P (polimer kwasu akrylowego poprzecznie usieciowany allilowymi eterami sacharozy i pentaerytritolu) – Noveon, Cleveland, USA
- Kwas solny (35-38%) – POCh, Gliwice
- Kwas orto-fosforowy (85%) – POCh, Gliwice
- Makrogol 600 – Sigma - Aldrich, Buchs, Szwajcaria
- Metolose 60SH 4000 – hydroksypropylometyloceluloza – o lepkości 4000 mPa•s (roztwór 2%) – Shin-Etsu, Tokio, Japonia

- Metolose 60SH 50 – hydroksypropylometyloceluloza – o lepkości 50 mPa•s (roztwór 2%) – Shin-Etsu, *Tokio, Japonia*
- Metolose SM 4000 – metyloceluloza – o lepkości 4000 mPa•s (roztwór 2%) – Shin-Etsu, *Tokio, Japonia*
- Metylenu chlorek – POCh, *Gliwice*
- Mucyna wieprzowa z żołądka (typ II) – Sigma - Aldrich, *St. Louis, USA*
- n-Heksan – Merck, *Darmstadt, Niemcy*
- Parafina płynna – Wytwórnia Euceryny - Laboratorium Farmaceutyczne, *Kraków*
- Pektyna (Classic CU 701) – Herbstreith & Fox, *Neuenbürg, Niemcy*
- Pharmacoat 615 – hydroksypropylometyloceluloza – o lepkości 15 mPa•s (roztwór 2%) – Shin-Etsu, *Tokio, Japonia*
- Poliwinylpirolidon K-30 – powidon– MP Biomedicals, *Solon, USA*
- Sebacynian dibutyłu – Sigma - Aldrich, *Buchs, Szwajcaria*
- Selegiliny chlorowodorek (ChS) – Dipharma, *Mediolan, Włochy*
- Sodu alginian (Grindsted LFD 1525) – Danisco A/S, *Kopenhaga, Dania*
- Sodu azydek – Sigma Chemical, *St. Louis, USA*
- Sodu chlorek – POCh, *Gliwice*
- Sodu cytrynian x 2H₂O – POCh, *Gliwice*
- Sodu karboksymetyloceluloza (7 HXF), o lepkości 1500 – 3000 mPa•s (roztwór 1%) – Hercules, *Wilmington, USA*
- Sodu wodorotlenek cz.d.a. – POCh, *Gliwice*
- Span 80 – Sigma - Aldrich, *Buchs, Szwajcaria*
- Trietyloamina – Sigma Chemical, *St. Louis, USA*
- Wapnia chlorek bezwodny – Ubichem, *Eastleigh, Wielka Brytania*
- Woda oczyszczona – aparat do otrzymywania wody metodą wymiany jonowej i odwróconej osmozy (typ Elix 3) – Millipore, *Bedford, USA*
- Żelatyna sproszkowana – POCh, *Gliwice*

2.3. Materiały

- Bibuła filtracyjna (MN 615) – Macherey - Nagel, *Düren, Niemcy*
- Błona śluzowa policzka świni – pobierana po uboju zwierzęcia w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
- Celetki (peletki z celulozy mikrokrystalicznej o średnicy 200 – 300 μm) Celphere CP-203 – Ashai Kasei, *Tokio, Japonia*
- Dwustronna taśma klejąca – 3M, *St. Paul, USA*

- Blistry PVC – formy do suszenia liofilizacyjnego o średnicy gniazda 13 mm lub 20 mm
- Klej cyjanoakrylowy (Super Glue) – Tredor, *Łódź*
- Komory dyfuzyjne wykonane z teflonu – Crown Glass Company, *Somerville, USA*
- Dysk celulozowy o średnicy 11 mm i grubości 1 mm – Macherey - Nagel, *Düren, Niemcy*
- Parafilm – Alcan Packaging, *Neenah, USA*
- Płytki Petriego (szklane) o średnicy 5,5 cm
- Sita stalowe o wielkości oczek: 0,100, 0,200, 0,315; 0,5; 0,63; 0,8; 1,0 i 1,2 mm – Retsch, *Haan, Niemcy*

3. Otrzymywanie mikroziarników z chlorowodorkiem selegiliny

3.1. Powlekanie peletki

3.1.1. Otrzymywanie rdzeni peletek

Rdzenie peletek zawierające ChS sporządzano metodą granulacji i sferonizacji. Skład substancji użytych do przygotowania rdzeni peletek prezentuje tabela 10.

Tab. 10. Skład rdzeni peletek w przeliczeniu na suchą masę

Składniki	Użyta ilość substancji [g]
ChS	3,0
Celuloza mikrokrystaliczna	7,0
Powidon	0,5

W młynku ucierano najpierw ChS z celulozą mikrokrystaliczną, a następnie dodawano jako lepiszcza 10% (w/w) wodny roztwór powidonu. Otrzymaną masę przecierano przez sito o średnicy oczek 0,5 mm.

Proces sferonizacji granulatu (porcja ok. 10 g) prowadzono przy użyciu sferonizatora, stosując następujące parametry pracy aparatu:

- ciśnienie powietrza wlotowego do komory sferonizatora: 0,5 bar,
- szybkość obrotu tarczy sferonizatora: 1200 obr/min,
- czas sferonizacji: 2 min.

Wilgotne rdzenie peletek suszono 6 h w temp. 40°C.

Wysuszone peletki poddano analizie sitowej, stosując sита stalowe o rozmiarach oczek: 0,315, 0,63 i 0,8 mm. Uzyskane frakcje ważono i obliczano wydajność procesu. Do dalszych badań wybrano frakcję 0,315 – 0,63 mm.

3.1.2. Powlekanie rdzeni peletek

Powlekanie prowadzono w laboratoryjnym aparacie fluidyzacyjnym typu Uni-Glatt. Do sporządzenia 3 serii powlekanych peletek (P-I, P-II i P-III) użyto odpowiednio 4,7 g, 4,0 g i 3,0 g rdzeni, przy czym przed każdym procesem powlekania masę wsadu uzupełniano do 200 g (minimalna ilość zalecana do powlekania w aparacie) peletkami placebo o rozmiarach 0,63 – 0,8 mm. Rdzenie peletek powlekano dyspersją etylocelulozy (skład zaprezentowano w tabeli 11), podając mieszaninę powlekającą przez pompę perystaltyczną ze średnią szybkością 3-5 ml/min. Na powleczenie serii P-

I zużyto 600 ml dyspersji (powlekanie przebiegało w 3 etapach), a serii P-II i P-III po 300 ml dyspersji.

Tab. 11. Skład mieszaniny powlekającej

Składniki	Zawartość w mieszaninie [%]	Zawartość w suchej masie otoczki [%]
30% wodna dyspersja etylocelulozy	87,0	66,7
Sebacynian dibutyłu	5,0	12,8
Glikol propylenowy	8,0	20,5

Peletki placebo (większe) po procesie powlekania oddzielano od właściwych peletek z ChS za pomocą sita o średnicy oczek 0,63 mm. W celu kondycjonowania powlekane peletki z ChS przenoszono na 24 h do suszarki o temp. 60°C.

3.2. Mikrosfery

Mikrosfery z etylocelulozy zawierające ChS sporządzono metodą tworzenia dyspersji o/o i odparowania rozpuszczalnika [116]. W tym celu etylocelulozę (1,60 g) i ChS (0,80 g) rozpuszczano w mieszaninie etanolu 25 ml i acetonu 37,5 ml. Tak przygotowany roztwór ChS i polimeru wprowadzano porcjami do 1% (w/v) roztworu Spanu 80 w parafinie płynnej (350 – 500 ml), stosując intensywne mieszanie za pomocą mieszadła łopatkowego. Mieszanie utrzymywano przez ok. 20 h, aby umożliwić całkowite odparowanie lotnych rozpuszczalników z utworzonej emulsji. Sporządzone mikrosfery, po dekantacji cieczy znad osadu, płukano n-heksanem i suszono w temp. pokojowej.

Stosując tę metodę otrzymano 2 serie mikrosfer: M-I oraz M-II.

3.3. Sieciowany mikrogranulat

3.3.1. Mikrogranulat z sieciowanego alginianu wapnia

Sieciowanie alginianu sodu, mające na celu spowolnienie uwalniania substancji leczniczej, prowadzono z użyciem roztworu chlorku wapnia. Skład użytych roztworów zaprezentowano w tabeli 12. Roztwór alginianu sodu o stężeniu 5% (w/w) otrzymywano przez rozpuszczenie polimeru w wodzie o temp. ok. 60°C, przy użyciu mieszadła magnetycznego. Po ochłodzeniu do temp. pokojowej, w 50 ml przygotowanego roztworu rozpuszczano 1,25 g ChS (stosunek wagowy substancji leczniczej do suchej masy użytego polimeru wynosił 1:2), a następnie otrzymany roztwór wkraplano z szybkością ok. 30 kropli/min, przy użyciu pompy perystaltycznej,

do cylindra zawierającego 50 ml 5% roztworu CaCl_2 (roztwór sieciujący). Utworzone mikrosfery pozostawiano w roztworze soli wapnia na 24 h, a następnie po dekantacji cieczy suszono w temp. pokojowej przez 48 h.

Tab. 12. Skład roztworów użytych do przygotowania mikrogranulatu z sieciowanego alginianu wapnia

Rodzaj roztworu	Skład roztworu [g]	Objętość [ml]
Roztwór polimeru z substancją leczniczą	ChS	1,25
	Sodu alginian	2,50
Roztwór sieciujący	Wapnia chlorek $\times 2\text{H}_2\text{O}$	2,50
		50

Wysuszony produkt mielono używając młynka elektrycznego i przesiewano przez zestaw 3 sit o wielkości oczek: 500, 200 i 100 μm . Do badań wybrano frakcję otrzymanego mikrogranulatu (XA) o wielkości ziaren 100 – 200 μm .

3.3.2. Mikrogranulat z sieciowanej pektyny

Granulat sporządzano w moździerzu łącząc chlorowodorek selegiliny z pektyną w następujących stosunkach wagowych (ChS : pektyna):

- 1:2 – mikrogranulat G1, G2 i G3,
- 1:5 – mikrogranulat G4,
- 1:10 – mikrogranulat G5,
- 1:20 – mikrogranulat G6.

Etap I – pęcznienie pektyny

W celu spęcznienia pektyny, do moździerza zawierającego mieszaninę pektyny z ChS dodawano porcjami wodę. Mieszając i rozdrabniając (kliszą) otrzymywano granulat (ziarno 1 – 2 mm), który następnie przenoszono na 30 min do suszarki o temp. 35°C.

Etap II – sieciowanie pektyny – formowanie granulatu

Sieciovanie zwilżonej mieszaniny pektyny i ChS polegało na wkraplaniu roztworu ZnSO_4 (2,3 mmol Zn^{2+} /1,0 g pektyny) do moździerza, przy jednoczesnym ucieraniu i rozdrabnianiu masy. Roztwór sieciujący ZnSO_4 dzielono na 2 porcje. Po dodaniu pierwszej porcji roztworu tworzący się granulat przenoszono na 30 min do suszarki o temp. 35°C, po czym wkraplano drugą porcję. Po zakończeniu procesu sieciowania granulat umieszczano na 24 h w suszarce o temp. 35°C.

Etap III – mielenie ziaren – otrzymywanie mikrogranulatu

Wysuszony granulat mielono w młynku elektrycznym lub moździerzem wibracyjnym i dzielono na frakcje za pomocą sit o wielkości oczek 100 i 200 μm . W dalszych badaniach korzystano z frakcji mikrogranulatu o wielkości od 100 do 200 μm .

Ilości składników używanych do otrzymywania poszczególnych typów granulatu zaprezentowano w tabeli 13.

Tab. 13. Składniki [g] używane do przygotowania sieciowanego mikrogranulatu

Rodzaj mikrogranulatu	Pektyna	Woda	ChS	Skład roztworu ZnSO ₄		Stosunek wagowy składników mikrogranulatu (ChS:Pektyna:ZnSO ₄)
				ZnSO ₄	Woda	
G1	4,00	13,30	2,00	2,66	10,64	1:2:1,3
G2	4,00	3,30	2,00*	2,66	10,64	1:2:1,3
G3	24,00	70,00	12,00	16,00	64,00	1:2:1,3
G4	5,00	13,30	1,00	3,30	10,00	1:5:3,3
G5	5,45	13,30	0,55	3,60	9,70	1:10:6,6
G6	5,71	13,30	0,29	3,76	9,54	1:20:13

* – dodano 10 ml 20% roztworu

Według opisanej powyżej procedury sporządzono mikrogranulaty oznaczone symbolem G1 (przygotowano w sumie 4 serie tego typu granulatu), G4, G5 oraz G6. Sporządzając mikrogranulaty G2 i G3 zastosowano ten sam stosunek ChS do pektyny, jak dla mikrogranulatu G1 (1:2), ale *Etap I* ich przygotowania przebiegał odmiennie. Przy sporządzaniu granulatu G2 do zwilżenia pektyny użyto tylko 3,30 g wody, a ChS wprowadzono do moździerza w postaci 20% roztworu, natomiast masa poszczególnych składników użytych do sporządzenia granulatu typu G3 była 6-krotnie większa w porównaniu z granuletem G1.

3.4. Powlekany sieciowany mikrogranulat

Powlekanie mikrogranulatu z ChS wykonano metodą koacerwacji w środowisku niewodnym, stosując kopolimer kwasu metakrylowego – Eudragit RS jako materiał powlekający. W jednym procesie powlekania zużywano 1,0 g mikrogranulatu G3 o wielkości ziaren 100 – 200 μm . Powlekanie prowadzono w cylindrze o wysokości 16 cm, średnicy 3 cm i pojemności 100 ml. Naważkę mikrogranulatu zawieszano w 20 ml n-heksanu, stosując ciągłe mieszanie za pomocą mieszadła łopatkowego (600 obr/min) i dodawano wzrastające stężenia roztworów Eudragitu RS w octanie etylu, porcjami po

200 µl (tabela 14). Całkowity czas powlekania wynosił ok. 70 min, po tym czasie mieszano zawartość cylindra przez kolejne 20 min. Powlekany granulat oddzielano od rozpuszczalników przez dekantację.

Przeprowadzono w sumie 6 powtórzeń procesu powlekania. Uzyskany w ten sposób mikrogranulat powlekany (GE) wykorzystywany był w stanie wilgotnym do otrzymywania krążków liofilizowanych (p. 5.3.3.).

Tab. 14. Ilość Eudragitu RS (roztwór w octanie etylu) dodawana w etapach procesu powlekania sieciowanego mikrogranulatu z chlorowodorkiem selegiliny

Stężenie Eudragitu RS	Dodana ilość Eudragitu RS	
	Roztwór [ml]	Sucha masa [mg]
0,1%	1	1
0,25%	1	2,5
1%	1	10
2,5%	5	125
5%	3	150
Suma:	11	288,5

4. Badania mikrozbiorników z chlorowodorkiem selegiliny

4.1. Badania mikroskopowe

Badania kształtu, powierzchni i wielkości mikrozbiorników wszystkich typów prowadzono przy użyciu mikroskopu wyposażonego w kamerę cyfrową. W przypadku peletek powlekanych oceniano również jednolitość i grubość utworzonej otoczki. Uzyskiwane obrazy zapisywano i analizowano przy użyciu programu MultiScan Base, wersja 12.07.

4.2. Badanie zawartości chlorowodorku selegiliny

Peletki niepowlekane

Naważkę peletek niepowlekanych (20 – 40 mg) umieszczano w fiołce zawierającej 10 ml wody i mieszano z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego do ich całkowitego rozpadu. Otrzymaną zawiesinę sączone przez filtr bibułowy i oznaczano spektrofotometrycznie zawartość substancji leczniczej (p. 7.1.).

Peletki powlekane

Naważkę peletek powlekanych (ok. 500 mg) ucierano w moździerzu aż do całkowitego sproszkowania. Na wadze analitycznej odważano 20 – 40 mg powstałego proszku, przenoszono do fiolki, dodawano 10 ml wody i mieszano 2 h z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego. Utworzoną zawiesinę sączono przez filtr bibułowy i oznaczano spektrofotometrycznie zawartość substancji leczniczej (p. 7.1.).

Mikrosfery

Dokładnie odważoną ilość mikrosfer (ok. 100 mg) rozpuszczano w 2 ml chloroformu. Z otrzymanego roztworu ekstrahowano ChS 3-krotnie kwasem solnym (0,1 mol/l): po dodaniu pierwszej porcji (4 ml) kwasu, próbę mieszano i wytrząsano przy użyciu mieszadła wirowego 2 min, a następnie wirowano (3000 obr/min) i zbierano górną warstwę roztworu ChS do kolby miarowej poj. 10 ml. Postępowanie powtarzano stosując kolejno 3 i 2 ml kwasu solnego. Kolbę miarową uzupełniano roztworem kwasu solnego do 10 ml. Uzyskany w ten sposób roztwór rozcieńczano fazą ruchomą i oznaczano zawartość ChS metodą HPLC (p. 7.2.).

Sieciowany mikrogranulat

Dokładnie odważoną ilość mikrogranulatu sieciowanego alginianu wapnia lub sieciowanej pektyny (odpowiadającą ok. 10 mg ChS) umieszczano w fiołce zawierającej 10 ml 2% roztworu cytrynianu sodu i mieszano z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego. Jony cytrynianowe wiążąc się z jonami dwuwartościowymi umożliwiały rozpuszczenie sieciowanej matrycy mikroziornika [109, 110], a zawartość ChS w uzyskanym roztworze, po rozcieńczeniu fazą ruchomą, oznaczano metodą HPLC (p. 7.2.).

4.3. Badanie uwalniania substancji leczniczej z mikroziorników

Do badania odważano taką ilość mikroziorników, żeby zawartość ChS w próbce wynosiła ok. 10 mg. Naważkę przenoszono do zlewki poj. 25 ml, zawierającej odpowiedni płyn akceptorowy (tabela 15) i umieszczano w wytrząsarce z łaźnią wodną o temp. 37°C. W odpowiednich odstępach czasowych pobierano próby płynu akceptorowego, w których oznaczano zawartość substancji leczniczej metodą HPLC (uwalnianie z mikrosfer i sieciowanego mikrogranulatu z alginianu wapnia lub pektyny, p. 7.2.) lub metodą spektrofotometryczną (uwalnianie z peletek powlekanych, p. 7.1.). Pobranej objętości płynu akceptorowego nie uzupełniano, lecz uwzględniano ten fakt w

obliczeniach. Wszystkie parametry badania uwalniania ChS z poszczególnych typów mikroziorników zebrano w tabeli 15.

Tab. 15. Parametry badania dostępności farmaceutycznej ChS z mikroziorników

Rodzaj mikroziorników (badane serie)	Płyn akceptorowy		Szybkość wytrząsania [ilość cykli/min]	Pobieranie prób		
	Rodzaj *	Objętość [ml]		Objętość [ml]	Czas [h]	
Peletki powlekane (P-I, P-II, P-III)	W	10,0	100	1,0	0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 24	
Mikrosfery (M-I)	W	20,0	100	0,5	1, 2, 3, 4, 5, 6, 24	
Sieciovany mikrogranulat	(XA oraz G1 – G6)	W	20,0	100	0,5	1, 2, 4, 6, 24
	(G1, G4, G5, G6)	B	20,0	100	0,5	1, 2, 4, 6, 24

* – W (woda), B (bufor fosforanowy pH 7,4)

5. Otrzymywanie krążków liofilizowanych

5.1. Krążki liofilizowane placebo

Liofilizowane krążki placebo otrzymywano w wyniku suszenia sublimacyjnego roztworów następujących polimerów mukoadhezyjnych:

- Carbopol (CP) – roztwór 1% o pH 3,0; 4,0; 6,0 i 7,0,
- karmeloza sodowa (CMCNa) – roztwór 1%,
- pektyna (Pek) – roztwór 2% o pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 9,0,
- alginian sodu (AlgNa) – roztwór 2%,
- Gantrez (MS955) – roztwór 2%,
- mieszanina Orabase – roztwór karmelozy sodowej 2%, pektyny 2% i żelatyny 2%,
- hydroksyetyloceluloza (HEC) – roztwór 2%.

Roztwory otrzymywano w wyniku rozpuszczania polimerów w wodzie o temp. pokojowej (CP, CMCNa, AlgNa, MS955) lub o temp. 60 – 80°C (Pek, Orabase, HEC), stosując intensywne mieszanie za pomocą mieszadła łopatkowego lub magnetycznego. Do korekty pH roztworu CP lub pektyny stosowano roztwór NaOH o stężeniu 0,1 mol/l lub 1 mol/l.

Roztwory dozowano do blistrów wykonanych z PVC (gniazda o średnicy 13 mm i głębokości ok. 5 mm), odważając po 700 mg do każdego gniazda. W zależności od konsystencji, roztwory dozowano za pomocą strzykawki lub nakładano szpatułką (Carbopol – żel).

Wypełnione blistry umieszczano w komorze liofilizatora, zamrażano i suszono zgodnie z podanymi parametrami (tabela 16).

Ponadto otrzymywano również krążki w wyniku liofilizacji roztworu CMCNa z CP o pH 3 lub pH 6 w stosunku wagowym 1:1. Dodatkowo przygotowano liofilizaty CP o pH 6 z peletkami placebo (celetki wykonane z celulozy mikrokrystalicznej), dodając je w ilości 1% lub 10% przed liofilizacją żelu.

Otrzymane krążki po wyjęciu z liofilizatora przechowywano nad żelem krzemionkowym w eksykatorze.

Tab. 16. Parametry procesu liofilizacji

Etap	Temp. półki [°C]	Czas trwania etapu [h]	Ciśnienie [mbar]
Zamrażanie	-45	2	atm.
	-45	2	0,08
	-20	12	0,08
Suszenie	-5	12	0,08
właściwe	0	12	0,08
	+5	5	0,08
	+20	5	0,08
Dosuszanie	+35	1-2	0,08

5.2. Krążki liofilizowane zawierające chlorowoderek selegiliny w formie substancji

Do sporządzania krążków wykorzystywano następujące roztwory polimerów:

- 2% – hypromeloza (Metolose 60 SH 4000 i Metolose 60 SH 50),
- 5% – hypromeloza (Pharmacoat 615),
- 2% – metyloceluloza,
- 2% – karmeloza sodowa,
- 6% – Orabase,
- 1% – Carbopol (o pH 6,0 – 6,5).

Roztwory karmelozy sodowej, Orabase oraz Carbopolu sporządzono tak, jak opisano w p. 5.1., natomiast metylocelulozę i hypromelozę rozpuszczano w gorącej (ok. 80°C) wodzie, a następnie mieszano do ochłodzenia.

W otrzymanych roztworach polimerów, mieszając rozpuszczano odważony (w formie substancji) ChS. Przy sporządzaniu krążków z Carbopolu, ChS dodawano w formie 10% roztworu, po czym, w razie potrzeby korygowano pH roztworu do wartości 6,0 – 6,5 za pomocą NaOH (1 mol/l).

Uzyskane roztwory/żele dozowano do gniazd blistra PVC tak, aby zawartość ChS w 1 krążku wynosiła 10 mg (po 1,50 g żelu w przypadku Carbopolu do gniazda o średnicy 20 mm lub 700 mg roztworu do gniazda o średnicy 13 mm, w przypadku pozostałych polimerów). Wypełnione blistry przenoszono do zamrażarki i zamrażano w

-20°C. Zamrożone krążki po umieszczeniu w komorze liofilizatora suszono sublimacyjnie (parametry suszenia przedstawiono w tabeli 16, p. 5.1.).

Otrzymane w ten sposób krążki w zależności od polimeru stanowiącego ich matrycę oznakowano w następujący sposób: KHm4000-ChS i KHm50-ChS (krążki sporządzone z roztworów hypromelozy, odpowiednio Metolose 60 SH 4000 i Metolose 60 SH 50), KHm-ChS (Pharmacoat 615), KMe-ChS (metyloceluloza), KCn-ChS (karmeloza sodowa), KO-ChS (Orabase) i KCP-ChS (Carbopol).

5.3. Krążki liofilizowane zawierające mikroziorniki z chlorowodorkiem selegiliny

5.3.1. Liofilizaty zawierające powlekane peletki lub mikrosfery

Liofilizowane krążki zawierające powlekane peletki (p. 3.1.) lub mikrosfery (p. 3.2.) z ChS sporządzano korzystając z żelu Carbopolu otrzymanego w sposób opisany w p. 5.1.

Odpowiednią ilość peletek lub mikrosfer zawieszano w żelu Carbopol o pH 6,0 – 6,5, a następnie dozowano po 1,50 g do gniazd blistra o średnicy 20 mm, tak, by zawartość chlorowodorku selegiliny w otrzymanym krążku wynosiła 10 mg.

Sporządzono 3 serie krążków (KCP-P-I, KCP-P-II i KCP-P-III), w skład których wchodziły peletki serii odpowiednio: P-I, P-II i P-III (p. 3.1.) oraz 2 serie krążków KCP-M-I i KCP-M-II, zawierające mikrosfery odpowiednio M-I i M-II (p. 3.2.).

Wypełnione blistry, zawierające żel z peletkami umieszczano w komorze liofilizatora i poddawano suszeniu zgodnie z parametrami zamieszczonymi w tabeli 16 (p. 5.1.).

5.3.2. Liofilizaty zawierające niepowlekany mikrogranulat sieciowany

Do przygotowania krążków tego typu użyto 3 rodzajów polimerów mukoadhezyjnych, których roztwory przygotowano w sposób opisany w p. 5.1. Były to roztwory o stężeniach:

- 1% – Carbopol o pH 6,0 – 6,5,
- 2% – pektyna,
- 6% – Orabase.

Do zlewki zawierającej 9,24 g roztworu odpowiedniego polimeru wprowadzano 560 mg sieciowanego mikrogranulatu z ChS i mieszano (ok. 2 min) do równomiernego zawieszenia cząstek granulatu. Korzystano z mikrogranulatów następujących rodzajów: XA, G1 oraz G2 (p. 3.3.). Uzyskane w ten sposób zawiesiny natychmiast dozowano do gniazd blistrów (o średnicy 13 mm), zamrażano i poddawano procesowi liofilizacji, zgodnie z parametrami podanymi w tabeli 16 (p. 5.1.).

Otrzymane w ten sposób krążki w zależności od polimeru stanowiącego ich matrycę oznakowano w następujący sposób: KO-XA i KO-G2 (Orabase) oraz KP-G1 (pektyna).

5.3.3. Liofilizaty zawierające powlekany mikrogranulat z sieciowanej pektyny

Mikrogranulat powlekany, otrzymany w sposób opisany w p. 3.4., po etapie dekantacji przenoszono na płytkę Petriego o średnicy 5,5 cm, w której odważono wcześniej 14,0 g jednego z następujących roztworów polimerów mukoadhezyjnych (sporządzonych wg opisu w p. 5.1. i 5.2.):

- 5% – hypromeloza (Pharmacoat 615),
- 2% – karmeloza sodowa,
- 6% – Orabase.

Zawartość płytki natychmiast mieszano i zamrażano w temp. -20°C , a po zamrożeniu poddawano procesowi liofilizacji tak, jak podano w tabeli 16 (p. 5.1.).

Otrzymane w ten sposób krążki w zależności od polimeru stanowiącego ich matrycę oznakowano w następujący sposób: KHm-GE (Pharmacoat 615), KCn-GE (karmeloza sodowa) i KO-GE (Orabase).

5.4. Krążki liofilizowane zawierające zasadę selegiliny

5.4.1. Otrzymywanie zasady selegiliny

Selegilinę w formie zasady otrzymywano w wyniku rozpuszczania 5,0 g ChS w 12 ml 10% (w/v) roztworu NaOH (22,4 mmol ChS łączono z 30 mmol NaOH). Utworzoną mieszaninę wytrząsano w probówce przez 2 min wykorzystując mieszadło wirowe, a następnie próbę wirowano przez 10 min przy 3000 obr/min. Po odwirowaniu w probówce uzyskiwano układ 2 niemieszających się cieczy: górną warstwę stanowiła zasada selegiliny (warstwa olejowa), a dolną warstwa wodna. Ciecze rozdzielano. Oleistą ciecz ważono i analizowano, aby obliczyć wydajność procesu otrzymywania zasady.

W tym celu naważkę oleistej cieczy łączono z 2 ml chloroformu i z otrzymanego roztworu ekstrahowano selegilinę 3-krotnie kwasem solnym (0,1 mol/l): po dodaniu pierwszej porcji (4 ml) kwasu, próbę mieszano i wytrząsano przy użyciu mieszadła wirowego 2 min, a następnie wirowano (3000 obr/min) i zbierano górną warstwę roztworu ChS do kolby miarowej poj. 10 ml. Postępowanie powtarzano stosując kolejno 3 i 2 ml kwasu solnego. Kolbę miarową uzupełniano roztworem kwasu solnego do 10 ml. Uzyskany w ten sposób roztwór rozcieńczano fazą ruchomą i oznaczano zawartość ChS metodą HPLC (p. 7.2.).

5.4.2. Liofilizaty zawierające zasadę selegiliny w formie wolnej

Krażki liofilizowane zawierające zasadę selegiliny sporządzono przez suszenie sublimacyjne dyspersji zasady selegiliny w 1% roztworze CP (o pH 3,2) lub 2% roztworze HEC (sposób otrzymywania roztworów polimerów opisano w p. 5.1.).

Do 20,0 g 1% roztworu niealkalizowanego CP, przy ciągłym mieszaniu mieszadłem łopatkowym, wprowadzano 200 mg lub 500 mg zasady selegiliny. Podczas łączenia obu składników następowało żelowanie układu będące wynikiem wzrostu pH Carbopolu. Uzyskaną dyspersję alkalizowano dodatkowo roztworem NaOH (0,1 mol/l) do pH ok. 7, przenoszono na płytkę Petriego (ok. 19,0 g) i po zamrożeniu w liofilizatorze suszono (parametry procesu suszenia podano tabeli 16, p. 5.1.). Uzyskano 2 rodzaje krążków liofilizowanych (SKCP-I lub SKCP-II) różniące się zawartością substancji leczniczej (tabela 17).

Krażki typu SKHc otrzymano w wyniku suszenia sublimacyjnego (tabela 16, p. 5.1.) dyspersji 250 mg zasady selegiliny w 16,0 g 2% roztworu HEC, sporządzonej przy użyciu mieszadła łopatkowego i rozdozowanej (po 0,70 g) do blistrów PVC o średnicy gniazda 13 mm. Skład dyspersji oraz teoretyczny skład masy krążków, uzyskanych po jej wysuszeniu liofilizacyjnym, podano w tabeli 17.

Tab. 17. Skład krążków liofilizowanych zawierających zasadę selegiliny

Rodzaj krążka	Skład dyspersji poddawanej liofilizacji			Teoretyczny skład krążka liofilizowanego (średnica 13 mm) [mg]	
	Zasada selegiliny [mg]	Polimer mukoadhezyjny		Zasada selegiliny	Polimer mukoadhezyjny
		Rodzaj	Masa [g]		
SKCP-I	200	1% roztwór Carbopolu	20,0	11,0	11,0
SKCP-II	500			27,7	11,0
SKHc	250	2% roztwór HEC	16,0	11,0	13,6

5.4.3. Liofilizaty zawierające zasadę selegiliny w mikrokapsułkach z etylocelulozą tworzonych „in situ”

Pierwszy etap sporządzania krążków polegał na rozpuszczeniu 2,50 g etylocelulozy (EC) w 10,0 ml chlorku metylenu, przy użyciu mieszadła magnetycznego. Do uzyskanego roztworu, przy ciągłym mieszaniu wprowadzano zasadę selegiliny, w ilości 1,25 g (stosunek substancji leczniczej do etylocelulozy 1:2), lub w ilości 2,50 g (stosunek 1:1).

Otrzymane roztwory organiczne dyspergowano w roztworze wodnym hydroksyetylocelulozy (HEC) lub Carbopolu (CP) w następujący sposób:

- do 32,0 g 2% (w/w) roztworu hydroksyetylocelulozy (HEC), stosując intensywne mieszanie mieszadłem łopatkowym, wprowadzano 4,0 ml lub 8,0 ml roztworu EC z selegiliną w obu stosunkach wagowych (1:1 lub 2:1),
- do 16,0 g 1% (w/w) roztworu Carbopolu (CP) o pH ok. 7,0, stosując intensywne mieszanie homogenizatorem typu Ultra-Turrax wprowadzano 2,0 ml roztworu EC z selegiliną (stosunek 2:1).

W celu obliczenia teoretycznej zawartości selegiliny i etylocelulozy w otrzymanych preparatach roztwory organiczne dodawane do żelu ważono. Skład uzyskanych układów podano w tabeli 18.

Tab. 18. Skład dyspersji poddawanych liofilizacji w celu utworzenia krążków zawierających zasadę selegiliny w mikrokapsułkach z etylocelulozy

Rodzaj krążka	Roztwór organiczny*			Wodny roztwór polimeru adhezyjnego** [g]
	EC [mg]	ZS [mg]	Objętość [ml]	
Etyloceluloza : zasada selegiliny (1:1)				
SKHc-EC1-I	700	700	4,0	32,0 (HEC)
SKHc-EC1-II	1400	1400	8,0	
Etyloceluloza : zasada selegiliny (2:1)				
SKCP-EC	400	200	2,0	16,0 (CP)
SKHc-EC2-I	750	375	4,0	32,0 (HEC)
SKHc-EC2-II	750	1500	8,0	

* – roztwór etylocelulozy (EC) i zasady selegiliny (ZS) w chlorku metylenu

** – HEC – 2% roztwór hydroksyetylocelulozy, CP – 1% żel Carbopolu

Wszystkie sporządzone dyspersje dozowano na płytki Petriego o średnicy 5,5 cm (po ok. 20 g), natychmiast przenoszono do liofilizatora, zamrażano w temp. -45°C i suszono zgodnie z parametrami podanymi w tabeli 16 (p. 5.1.).

W wyniku suszenia otrzymywano liofilizat w kształcie dysku, o powierzchni odpowiadającej powierzchni płytki Petriego, z którego do badań wycinano krążki o średnicy 13 mm.

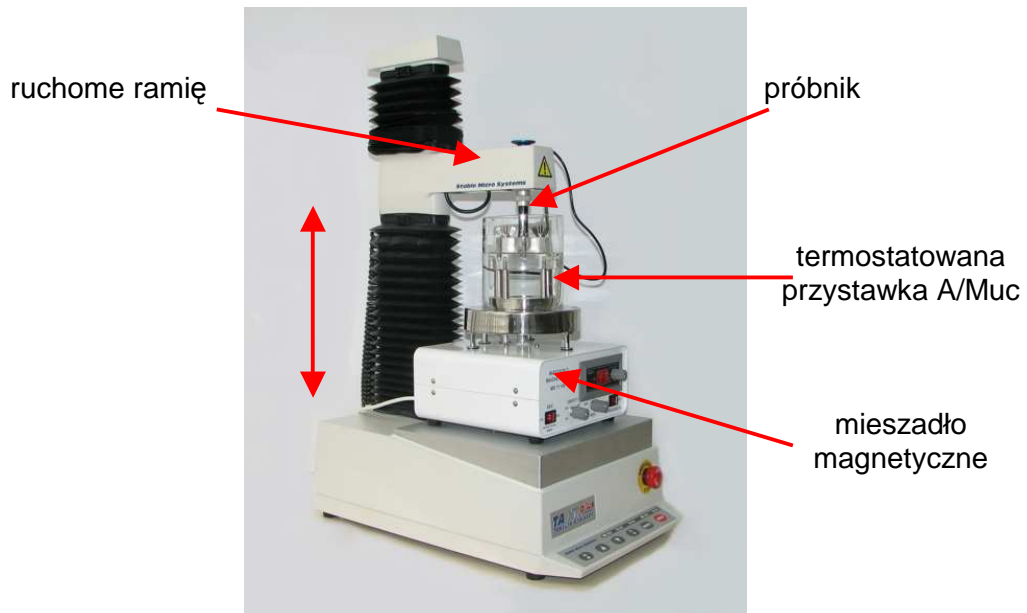
6. Badania krążków liofilizowanych

6.1. Ocena wizualna krążków liofilizowanych

Oceniano wygląd, strukturę i kształt krążków, ich właściwości mechaniczne, a także łatwość wyjmowania z blistrów lub płytek Petriego.

6.2. Badanie mukoadhezji w warunkach *in vitro*

Badanie mukoadhezji prowadzono przy użyciu analizatora tekstury TA.XT Plus wyposażonego w specjalistyczną przystawkę A/Muc (ryc. 11), umożliwiającą pomiar w warunkach wilgotności i temperatury, zbliżonych do środowiska fizjologicznego.



Ryc. 11. Analizator tekstury typu TA.XT Plus (prod. Stable Micro Systems) – widok ogólny aparatu w trakcie badania.

6.2.1. Rodzaje badanych układów

Badaniu poddano wytypowane polimery hydrofilowe w 3 formach farmaceutycznych: roztworach (żelach), krążkach liofilizowanych i dyskach prasowanych (tabletkach).

Roztwory (żele) polimerów mukoadhezyjnych

Oceniano właściwości mukoadhezyjne wodnych roztworów (żeli) następujących polimerów:

- Carbopol (CP) – roztwór 1% o pH 3,0; 4,0; 6,0 i 7,0,
- karmeloza sodowa (CMCNa) – roztwór 1%,
- pektyna (Pek) – roztwór 2% o pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 9,0,
- alginian sodu (AlgNa) – roztwór 2%,
- Gantrez (MS955) – roztwór 2%,
- mieszanina Orabase – roztwór 6%,
- hydroksyetyloceluloza (HEC) – roztwór 2%.

Roztwory do badania mukoadhezji przygotowano w sposób opisany w p. 5.1.

Liofilizowane krążki placebo polimerów mukoadhezyjnych

Krążki liofilizowane placebo, dla których wykonano badanie właściwości mukoadhezyjnych, otrzymywano w wyniku suszenia sublimacyjnego roztworów (żeli), wymienionych powyżej. Oprócz jednoskładnikowych roztworów polimerów, suszono sublimacyjnie także mieszaninę CMCNa i CP w stosunku wagowym 1:1 (pH 3 lub pH 6). Dodatkowo część krążków (CP pH 6) zawierała peletki placebo, w ilości 1% lub 10% masy żelu przed liofilizacją (p. 5.1.).

Aby ocenić wpływ kształtu i gęstości krążka na właściwości mukoadhezyjne polimeru, część niealkalizowanych krążków Carbopolu i pektyny przed badaniem prasowano przy użyciu analizatora tekstury, z siłą 5 N przez 60 s.

Liofilizowane krążki zawierające selegilinę

Badanie właściwości mukoadhezyjnych przeprowadzono także dla wybranych krążków zawierających substancję leczniczą. Do badania wytypowano preparaty, do których inkorporowano selegilinę w stanie wolnym – w formie chlorowodoru (krążki z CMCNa typu KCn-ChS, p. 5.2.) i zasady (krążki z HEC typu SKHc, p. 5.4.2.), lub w postaci mikrokapsulek z etylocelulozy zawierających zasadę selegiliny (krążki z HEC typu SKHc-EC1-II, p. 5.4.3.).

Prasowane dyski (tabletki) polimerów mukoadhezyjnych

Prasowane dyski polimerowe o średnicy 12 mm sporządzano przez bezpośrednie tabletkowanie w tabletkarce uderzeniowej proszku odpowiedniego polimeru: CP, CMCNa, AlgNa, Pek, MS955 i HEC. Dodatkowo zmieszano i sprasowano jednakowe naważki 3 proszków polimerów: żelatyny, CMCNa i Pek, uzyskując dyski Orabase.

Objętość proszku wypełniająca otwór matrycy w czasie tabletkowania regulowano położeniem stempla dolnego w taki sposób, żeby masa otrzymanego dysku mieściła się w zakresie 170 – 190 mg.

6.2.2. Warunki badania mukoadhezji

W badaniu posłużono się warstwą żelatyny oraz roztworem mucyny, jako zamiennikami naturalnej błony śluzowej. Stosując warstwę żelatyny badano adhezję wszystkich układów z wyjątkiem krążków liofilizowanych zawierających selegilinę, natomiast przy użyciu roztworu mucyny oceniano właściwości mukoadhezyjne tylko form stałych (krążki liofilizowane placebo i z selegiliną oraz dyski).

Warstwę żelatyny uzyskiwano wylewając na płytkę Petriego ($0,3 \text{ g/cm}^2$) 30% (w/w) roztwór wodny żelatyny. Z warstwy wycinano krążki żelatynowe o średnicy: 11 mm i 21 mm (wysokość 2 – 3 mm). Krążek o większej średnicy umieszczano w przystawce A/Muc, natomiast krążek mniejszy przyklejano klejem cyjanoakrylowym do ruchomego próbnika (ryc. 12).

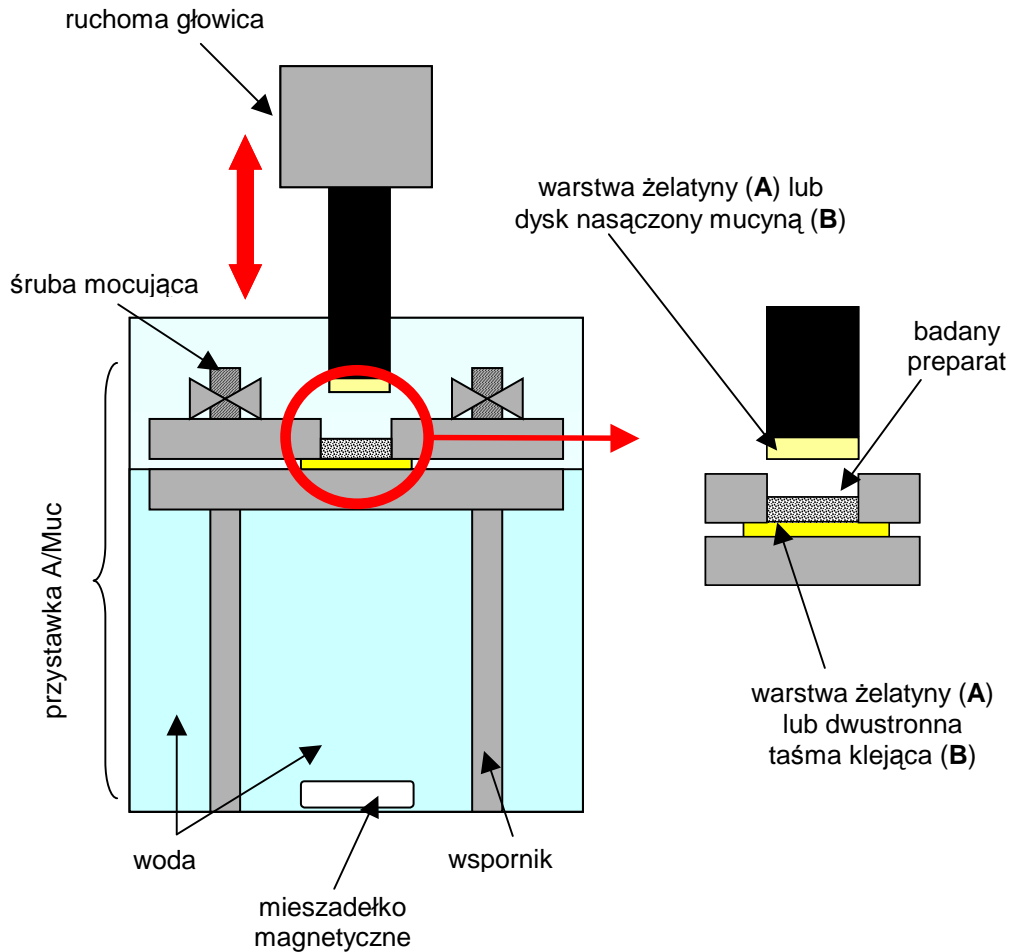
Roztwór mucyny 10% (w/w) sporządzano przez rozpuszczenie substancji w wodzie o temp. pokojowej, intensywnie mieszając mieszadłem magnetycznym. Otrzymanym roztworem nasączało dyski celulozowe (średnicy 11 mm), przyklejone do ruchomego próbnika dwustronną taśmą klejącą (ryc. 12).

Przystawkę A/Muc na 10 min przed pomiarem, w celu ekwilibracji temperatury i wilgotności, wstawiano do łaźni wodnej o temp. 40°C i opuszczano próbnik na taką wysokość, aby znalazł się w przystawce. Ponieważ skomplikowana budowa aparatu uniemożliwiała pełne zamknięcie i termostatowanie układu, zastosowano wyższą od fizjologicznej temperaturę badania.

Gdy modelową warstwą adhezyjną była żelatyna, oba jej krążki (umieszczone w przystawce i przyklejane do próbnika) poddawano ekwilibracji. Po upływie 10 min do komory przystawki wprowadzano krążek lub prasowany dysk polimerowy, dodając pod dysk i na jego powierzchnię po 100 μl wody oczyszczonej o temp. 37°C i rozpoczynano pomiar.

W przypadku badania adhezji z zastosowaniem roztworu mucyny testowany krążek liofilizowany lub dysk prasowany przyklejano taśmą adhezyjną do przystawki jeszcze przed ekwilibracją. Dysk celulozowy (o grubości 1 mm) umieszczony na próbniku nasączało 50 μl 10% roztworu mucyny bezpośrednio przed pomiarem mukoadhezji, a badanych preparatów dodatkowo nie zwilżano.

Roztwory (żele) polimerów badano bez zwilżania, w zależności od konsystencji dozowano je do komory strzykawką (roztwory – 100 μl) lub nakładano szpatułką na ruchomy próbnik (żele CP po alkalizacji – ok. 70 mg).



Ryc. 12. Przystawka A/Muc i model do wyznaczania pracy mukoadhezji: A) z zastosowaniem warstwy żelatyny, B) z zastosowaniem 10% roztworu mucyny.

W trakcie badań stosowano parametry pracy analizatora tekstury przedstawione w tabeli 19.

Tab. 19. Parametry pracy aparatu w badaniach mukoadhezji *in vitro*

Parametr	Wartość
Szybkość opuszczania głowicy	0,5 [mm/s]
Siła nacisku głowicy	0,5 [N]
Czas utrzymywania siły	1 [min]
Szybkość podnoszenia głowicy	0,1 [mm/s]
Liczba pomiarów/s	25

6.2.3. Analiza danych pomiarowych

Dane rejestrowane w trakcie badania przedstawiono graficznie jako zależność między siłą odrywania górnego próbnika od warstwy mukoadhezyjnej a czasem trwania testu (ryc. 13). Korzystając z tej zależności przy pomocy programu komputerowego Texture Exponent 32 odczytywano maksymalną siłę oderwania [N] oraz pracę mukoadhezji wyrażoną w μJ .

Wykresy uzyskane w trakcie badań poszczególnych polimerów mogły mieć 2 różne przebiegi:

- w większości przypadków wartość siły mierzonej w trakcie podnoszenia próbnika malała do 0 (ryc. 13). Aby obliczyć z uzyskanego wykresu pracę mukoadhezji, korzystano z następującego wzoru:

$$\text{Praca mukoadhezji} = A \times 0,1 \times 1000.$$

Pole powierzchni pod krzywą (A) mnożono przez 0,1 (przeliczenie czasu pomiaru na dystans – próbnik podnoszono z prędkością 0,1 mm/s), a następnie przez 1000, aby wyrazić uzyskany wynik w jednostkach pracy [μJ].

- w przypadku, gdy wartość siły mierzonej w trakcie badania nie malała do 0 (ryc. 14 I), badanie przerywano po 100 s i mierzono wartość siły w tym punkcie. Uznawano, że powierzchnia pod krzywą (B) – praca mukoadhezji była zawyżona i wyznaczano nową linię podstawową (odcinek X-Y). Od pola powierzchni B odejmowano powierzchnię trójkąta (powierzchnia „martwa”) wyznaczonego przez: siłę adhezji w setnej sekundzie pomiaru (wysokość trójkąta – h), dystans między punktem rozpoczęcia i zakończenia pomiaru (podstawa trójkąta – a) oraz odcinek X-Y (ryc. 14 II). Otrzymywano w ten sposób skorygowane pole powierzchni pod krzywą (C), z którego obliczano pracę mukoadhezji, korzystając z następującego wzoru:

$$C = B - \frac{a \times h}{2}$$

gdzie:

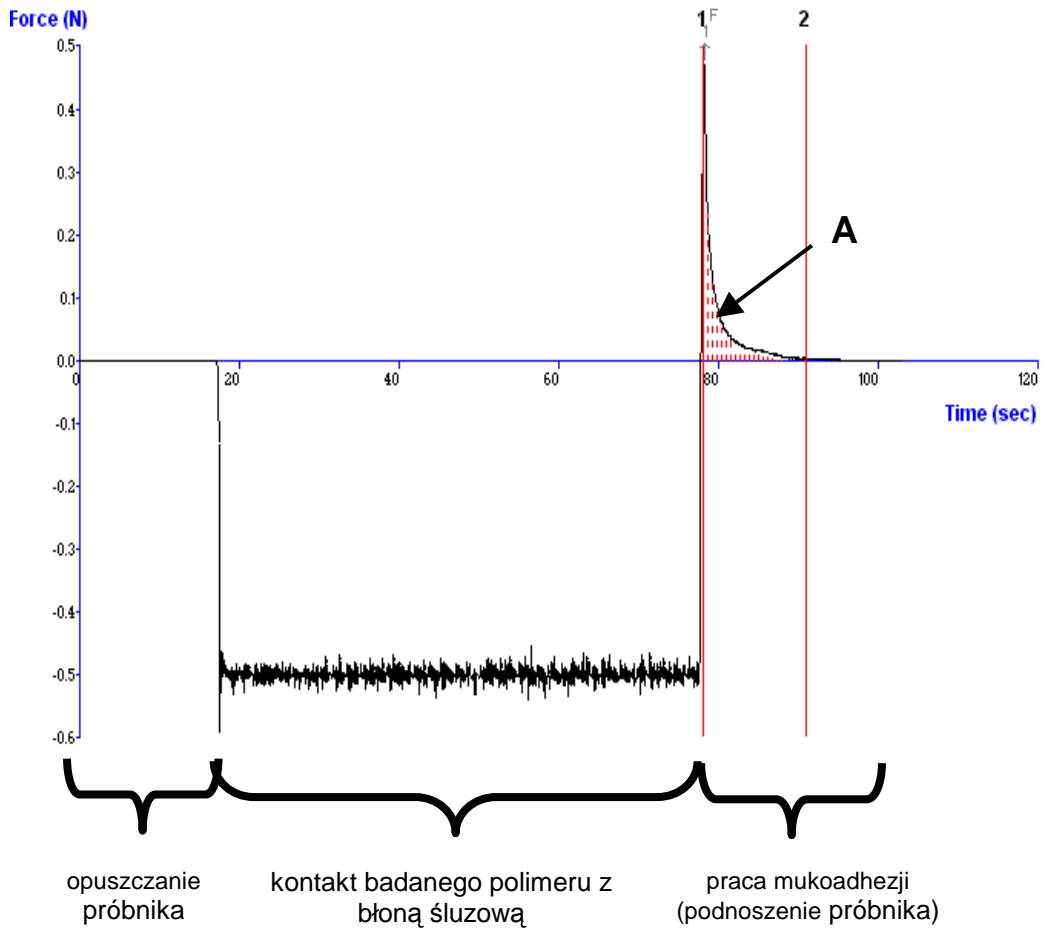
C – pole powierzchni C [Nxs],

B – pole powierzchni pod krzywą zależności siła – czas [Nxs],

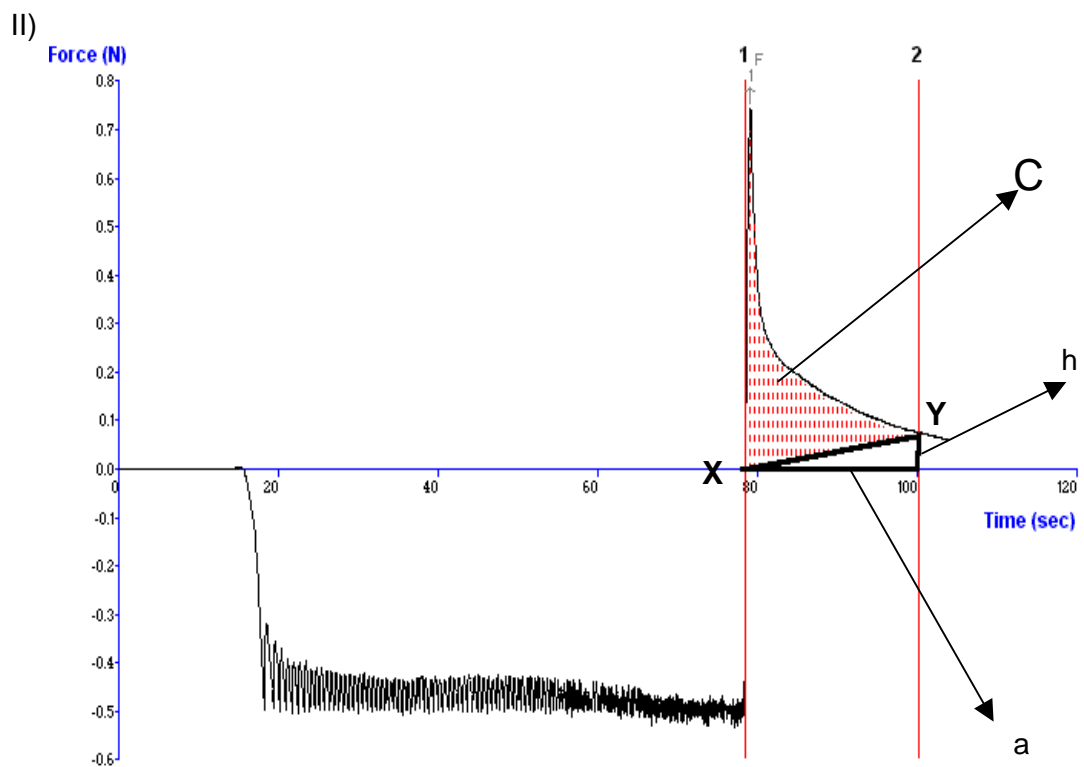
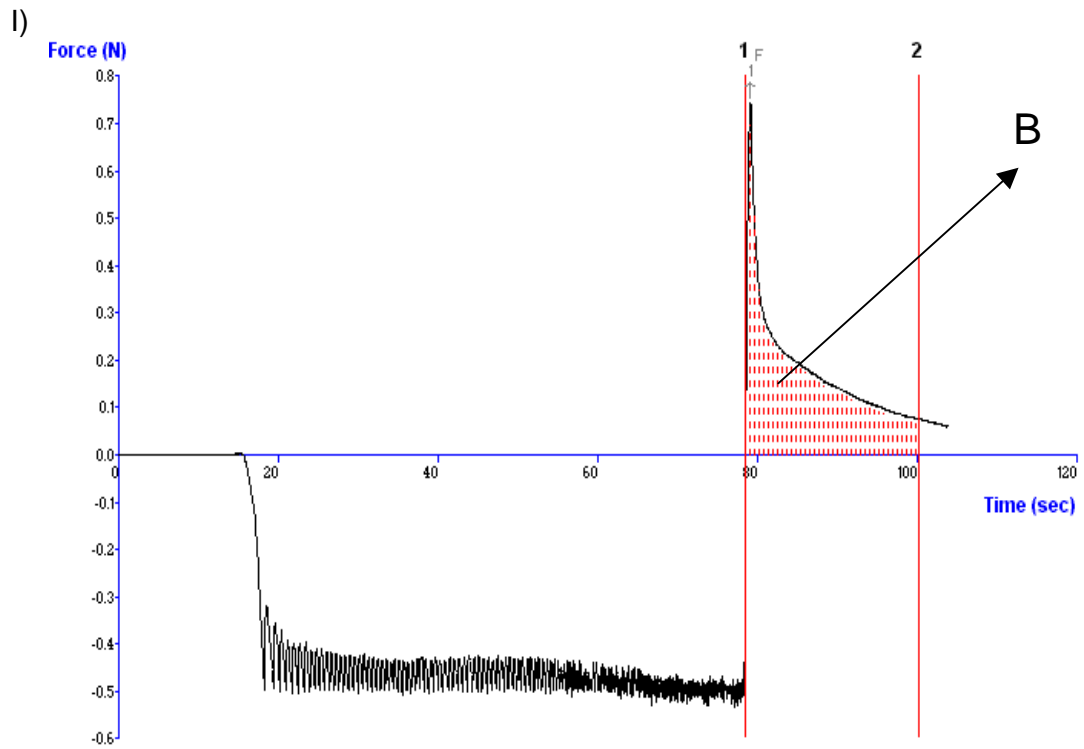
h – siła zmierzona w setnej sekundzie badania – wysokość trójkąta [N],

a – czas mierzony od momentu rozpoczęcia odrywania polimeru do 100 s pomiaru (podstawa trójkąta) [s].

Po obliczeniu pola powierzchni C , wartość przeliczano na pracę mukoadhezji [μJ] podobnie jak w pierwszym przypadku.



Ryc. 13. Typowy wykres uzyskiwany w trakcie badania mukoadhezji – siła adhezji maleje do 0; Praca mukoadhezji – pole powierzchni (A) pod krzywą.



Ryc. 14. Wykres zależności czas – siła, gdy wartość siły po zakończeniu pomiaru jest >0 (I): oraz sposób korekty pola powierzchni pod krzywą przez odjęcie pola trójkąta (II).

6.3. Badanie uwalniania selegiliny z krążków liofilizowanych

Rodzaje krążków liofilizowanych, dla których prowadzono badanie uwalniania selegiliny przedstawiono w tabeli 20.

Tab. 20. Rodzaje i sposób oznakowania krążków liofilizowanych, dla których badano dostępność farmaceutyczną selegiliny

Substancja/ mikroziorniki (metoda sporządzania)	Rodzaj matrycy krążka					
	Carbopol	Pektyna	Orabase	Karmeloza sodowa	Pharmacoat	Hydroksy- etyloceluloza
Chlorowodorek selegiliny						
Substancja (p. 5.2.)	KCP-ChS	–	KO-ChS	KCn-ChS	KHm-ChS	–
Peletki powlekane (p. 5.3.1.)	KCP-P-I KCP-P-II KCP-P-III	–	–	–	–	–
Mikrosfery (p. 5.3.1.)	KCP-M-I KCP-M-II	–	–	–	–	–
Mikrogranulat (p. 5.3.2.)	–	KP-G1	KO-XA KO-G2	–	–	–
Mikrogranulat powlekany (p. 5.3.3.)	–	–	KO-GE	KCn-GE	KHm-GE	–
Zasada selegiliny						
Substancja (p. 5.4.2.)	SKCP-I SKCP-II	–	–	–	–	SKHc
Mikrokapsułki „in situ” (p. 5.4.3.)	SKCP-EC	–	–	–	–	SKHc-EC1-I SKHc-EC1-II SKHc-EC2-I SKHc-EC2-II

W badaniu uwalniania selegiliny z krążków liofilizowanych jako płyn akceptorowy stosowano wodę (10 lub 20 ml) lub bufor fosforanowy pH 7,4 (20 lub 100 ml). Uwalnianie prowadzono w zlewkach umieszczonych w wytrząsarce z łaźnią wodną o temp. 37°C (100 cykli/min, przy amplitudzie 10 wg skali aparatu). Aby uniknąć efektu flotacji krążków, przed wprowadzeniem do płynu akceptorowego obciążano je drucianą obejmą. W określonych odstępach czasu pobierano próby płynu akceptorowego (0,5 lub 1,0 ml). Zawartość selegiliny w próbach oznaczano metodą HPLC (p. 7.2.) lub w

przypadku krążków typu KCP-ChS, KCP-P-I, KCP-P-II i KCP-P-III metodą spektrofotometryczną (p. 7.1.). Gdy uwalnianie prowadzono do małej objętości płynu akceptorowego (10 ml) pobraną objętość próby (1,0 ml) uzupełniano wodą, w pozostałych przypadkach fazy akceptora nie uzupełniano. Szczegółowe parametry badania uwalniania selegiliny z krążków podano w tabeli 21.

Tab. 21. Parametry badania dostępności farmaceutycznej selegiliny z krążków liofilizowanych

Rodzaj krążków (badane serie)		Płyn akceptorowy		Pobieranie prób	
		Rodzaj *	Objętość [ml]	Objętość [ml]	Czas [h]
Chlorowodorek selegiliny					
Substancja	KCP-ChS	W	10,0	1,0	0,25, 0,5, 1, 2
	KO-ChS		20,0	0,5	0,5, 1, 2, 4, 6
	KCn-ChS				
	KHm-ChS				
Peletki powlekane (KCP-P-I, KCP-P-II, KCP-P-III)		W	10,0	1,0	0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 24
Mikrosfery (KCP-M-I, KCP-M-II)		W	20,0	0,5	1, 2, 3, 4, 5, 6, 24
Mikrogranulat (KP-G1, KO-XA, KO-G2)		W	20,0	0,5	1, 2, 4, 6, 24
Mikrogranulat powlekany (KO-GE, KCn-GE, KHm-GE)		W	20,0	0,5	1, 2, 4, 6, 24
Zasada selegiliny					
Substancja (SKCP-I, SKCP-II, SKHc)		B	20,0	0,5	1, 2, 4, 6, 24
Mikrosfery (SKCP-EC, SKHc-EC1-I, SKHc-EC1-II, SKHc-EC2-I, SKHc-EC2-II)		B	100	0,5	1, 2, 4, 6, 24

* – W (woda), B (bufor fosforanowy pH 7,4)

6.4. Badanie przenikania selegiliny przez błonę śluzową policzka świni w warunkach in vitro

6.4.1. Błona śluzowa

W badaniu korzystano z błony śluzowej policzka świni domowej, którą po pobraniu zamrażano i przechowywano w temp. ok. -30°C . Przed eksperymentem tkankę rozmrażano w temp. pokojowej i sprawdzano wizualnie, czy nie uległa uszkodzeniu.

Następnie oddzielano tkankę podśluzówkową a błonę śluzową płukano w 0,9% roztworze chlorku sodu z dodatkiem 0,005% azydku sodu i dzielono na fragmenty o wielkości odpowiedniej do umieszczenia w komorze dyfuzyjnej.

6.4.2. Komory dyfuzyjne

W doświadczeniu korzystano z dwuczęściowych, przepływowych komór dyfuzyjnych, wykonanych z teflonu, z wymuszonym obiegiem płynu akceptorowego (ryc. 15). Powierzchnia kontaktu błony śluzowej z fazą donora wynosiła $0,65\text{ cm}^2$. Płyn akceptorowy obmywał błonę śluzową od strony blaszki właściwej.

Zamknięty obieg płynu akceptorowego utrzymywano za pomocą pompy perystaltycznej. Ilość płynu akceptorowego wynosiła 5 ml lub 8 ml, a szybkość przepływu 18 ml/h.

Temperatura komór dyfuzyjnych była utrzymywana na stałym poziomie 37°C za pomocą bloku grzejjego.

6.4.3. Faza donora

Roztwór chlorowodoru selegiliny

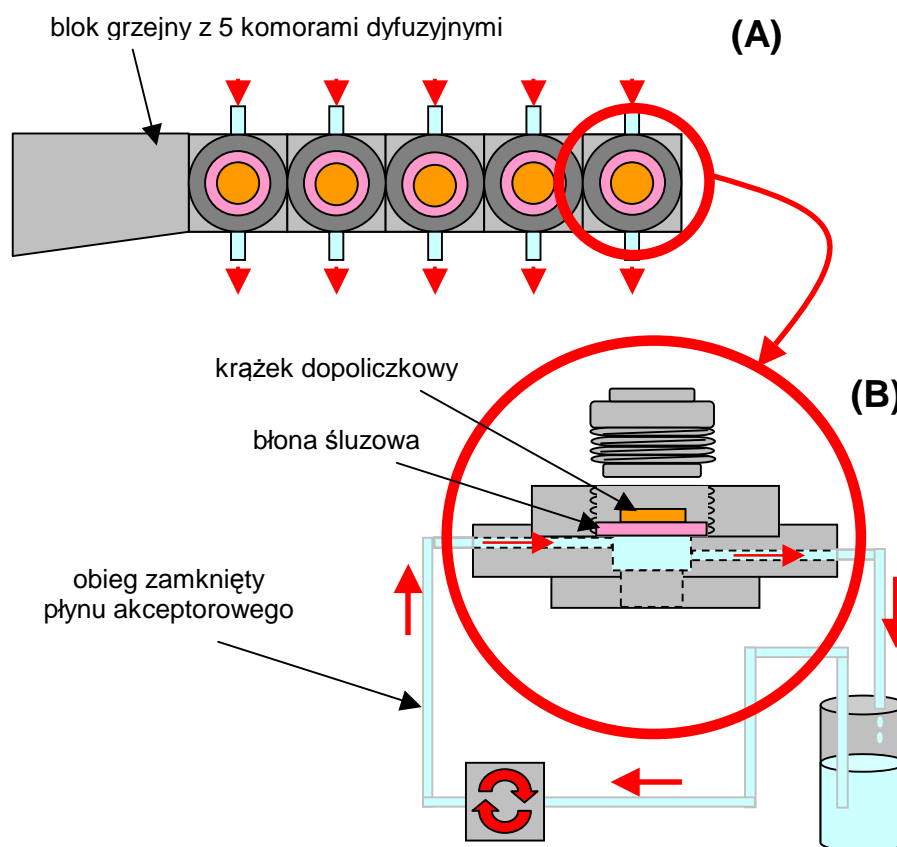
Sporządzano 1,25% (w/w) wodny roztwór chlorowodoru selegiliny, którego pH korygowano do wartości 5,4 za pomocą 0,1 i 0,01 mol/l roztworu NaOH.

Na umieszczoną w komorach błonę śluzową наносono 400 μl roztworu, co odpowiadało 5 mg chlorowodoru selegiliny (4 mg w przeliczeniu na zasadę).

Roztwór zasady selegiliny

1% (w/w) roztwór zasady selegiliny otrzymywano przez zmieszanie 100 mg zasady selegiliny z 9,90 g makrogolu (PEG 600). Wartość pH roztworu wynosiła 8,2.

Na umieszczoną w komorach błonę śluzową наносono 400 μl roztworu, co odpowiadało ok. 4 mg selegiliny.



Ryc. 15. Schemat zestawu komór w bloku grzejnym (A – widok z góry) oraz pojedynczej komory (B – widok z boku).

Krażek liofilizowany zawierający selegilinę

Stosowano krążki liofilizowane o średnicy odpowiedniej do umieszczenia w komorach dyfuzyjnych, tzn. 7 mm. Badano krążki zawierające zarówno rozpuszczoną formę ChS (KcN-ChS, KO-ChS), powlekany mikrogranulat z ChS (KcN-GE), zasadę selegiliny (SKCP-I) oraz mikrokapsułki z etylocelulozą z zasadą selegiliny (SKHc-EC1-II). Przed umieszczeniem krążków w komorze donora prasowano je stosując nacisk ręczny, aby odtworzyć warunki panujące w czasie aplikacji. Zawartość selegiliny w krążkach wynosiła 4 – 5 mg.

Na powierzchnię krążka umieszczonego w komorze na błonie śluzowej nanoszono pipetą 400 μ l wody oczyszczonej. Wartości pH badanych układów wynosiły 5,3 – 5,4 w przypadku krążków zawierających ChS oraz 8,2 – 8,4 w przypadku krążków zawierających zasadę selegiliny.

Dyspersja zasady selegiliny w roztworze hydroksyetylocelulozy

1% (w/w) dyspersję zasady selegiliny otrzymywano przez zmieszanie 100 mg zasady selegiliny z 9,90 g 2% roztworu hydroksyetylocelulozy, sporządzonego jak opisano w p. 5.1.

Na umieszczoną w komorach błonę śluzową наносzono 400 µl dyspersji, co odpowiadało ok. 4 mg selegiliny. Wartość pH dyspersji wynosiła 8,4.

6.4.4. Badanie przenikania

W badaniu przenikania jako płyn akceptorowy stosowano 0,9% roztwór chlorku sodu z dodatkiem 0,005% azydku (temp. 37°C). Błonę śluzową umieszczono w komorach dyfuzyjnych, a następnie w celu ekwilibracji utrzymywano przez 1 h ciągły obieg płynu akceptorowego. Po tym czasie na powierzchnię błony aplikowano fazę donora, jak opisano w p. 6.4.3.

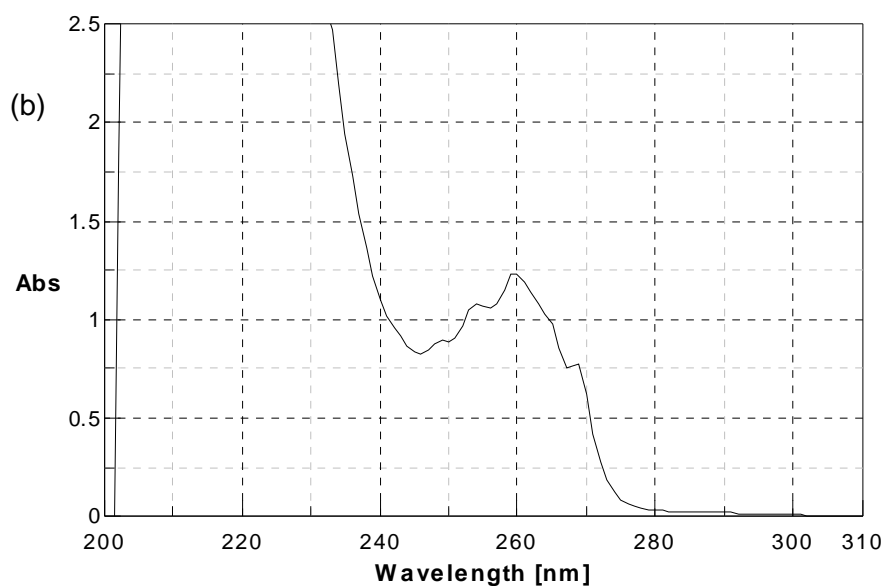
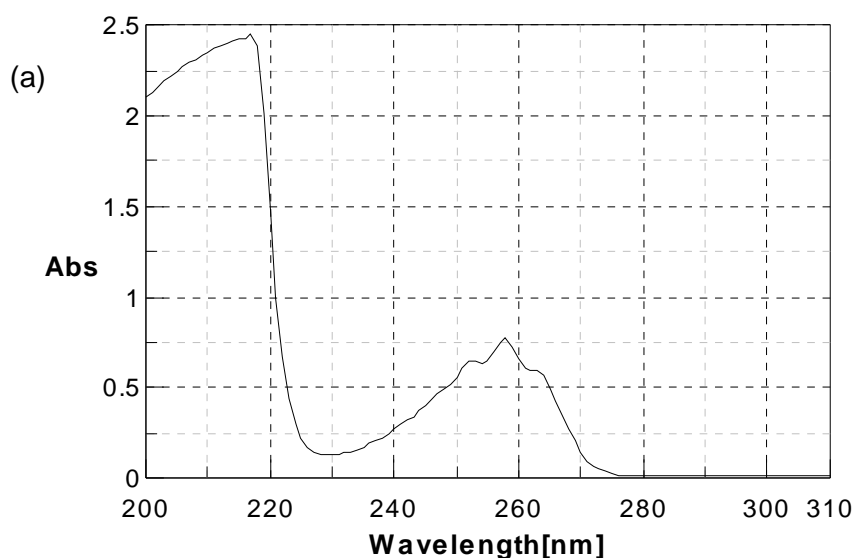
Badanie przenikania prowadzono przez 8 h, pobierając co 1 h lub 2 h próbę płynu akceptorowego (1,0 ml), a powstały ubytek uzupełniano świeżym medium. Zawartość selegiliny w próbach oznaczano metodą HPLC (p. 7.2.).

Po 8 h badania usuwano błonę śluzową z komory, oceniano czy nie jest uszkodzona i wycinano fragment odpowiadający powierzchni przenikania. Prowadzono 2-etapową ekstrakcję selegiliny z tkanki. W tym celu błonę śluzową umieszczano w probówce zawierającej 2,0 ml wody i wytrząsano 12 h w wytrząsarce w temp. pokojowej. Po tym czasie błonę wyjmowano, przenoszono do kolejnej probówki zawierającej 2 ml wody i wytrząsano przez następne 24 h. Zawartość selegiliny w roztworach oznaczano metodą HPLC (p. 7.2.).

7. Analiza ilościowa chlorowodorku selegiliny

7.1. Analiza ilościowa metodą spektrofotometryczną

Wyznaczono widmo UV w zakresie 200 – 310 nm dla wodnego roztworu chlorowodorku selegiliny (ryc. 16 a) oraz metanolowego roztworu zasady selegiliny (ryc. 16 b) używając kuwet kwarcowych o grubości warstwy absorbującej 1 cm. Odnośnikami były odpowiednio woda oraz metanol. Ustalono maksimum absorpcji przy długości fali 258 nm.



Ryc. 16. Widmo UV wodnego roztworu ChS (a) i metanolowego roztworu zasady selegiliny (b) (stężenie 1 mg/ml).

Badano absorbancję wzorcowych wodnych roztworów ChS o stężeniu: 0,01; 0,1; 0,2; 0,5 mg/ml. Roztwory otrzymano przez rozcieńczenie roztworu podstawowego ChS w wodzie, o stężeniu 25 mg/25 ml. Wyznaczono prostoliniową zależność pomiędzy absorbancją i stężeniem substancji leczniczej ($r^2 = 0,9999$).

W wyniku pomiarów absorbancji roztworów wzorcowych wykonanych wielokrotnie uzyskano następujące równanie służące do obliczania stężenia chlorowodoru selegiliny w analizowanych próbach:

$$C = \frac{(Abs - 0,0163)}{0,7656}$$

gdzie:

C – stężenie [mg/ml],

Abs – absorbancja.

7.2. Analiza ilościowa metodą HPLC

Stężenie ChS w roztworach prowadzono metodą HPLC w układzie faz odwróconych z wykorzystaniem kolumny z wypełnieniem oktadecylokrzemowym (250 mm). Jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę buforu i acetonitrylu 80:20 (v/v). Bufor składał się z dwuwodorofosforanu amonu (0,1 mol/l) i trietyloaminy (0,08%) i był korygowany kwasem ortofosforowym do pH 3,1 [125].

Stosowano następujące warunki chromatograficzne:

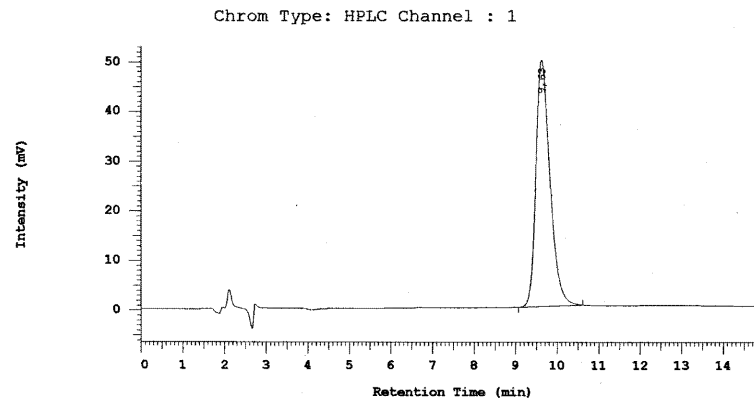
- nastrzykiwana objętość: 20 μ l,
- szybkość przepływu: 1 ml/min,
- detektor: UV-Vis, długość fali: 215 nm.

Czas retencji selegiliny w podanych warunkach wynosił ok. 8 – 10 min. Przykładowy chromatogram zaprezentowano na ryc. 17.

Przy ilościowym oznaczaniu ChS korzystano z krzywej wzorcowej, którą otrzymano w wyniku analizy serii roztworów wzorcowych o następujących stężeniach: 0,25, 0,5, 1, 5, 10, 50, 75 i 100 μ g/ml. Uzyskano prostoliniową zależność ($r^2 = 0,9998$) pomiędzy powierzchnią piku ChS na chromatogramie i jej stężeniem.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 07-03-19 10:58 Reported: 07-03-20 14:28
Data Path: C:\WIN32APP\HSM\Selegilina\DATA\0013\
Processing Method: selegilinal Processed: 07-03-19 11:13
System (acquisition): Sys 1 Series:0013
Application: Selegilina Vial Number: 2
Sample Name: wz5x10-5 Vial Type: UNK
Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 20,0 ul
Sample Description:



Ryc. 17. Chromatogram wodnego roztworu ChS o stężeniu 50 µg/ml.

Metodą krzywej regresji prostoliniowej wyznaczono następujące równanie, z którego obliczano stężenia ChS w analizowanych próbach:

$$C = \frac{(A - 1,22)}{21,47}$$

gdzie:

C – stężenie ChS [µg/ml],

A – powierzchnia pików (wyrażona w tysiącach).

IV. WYNIKI

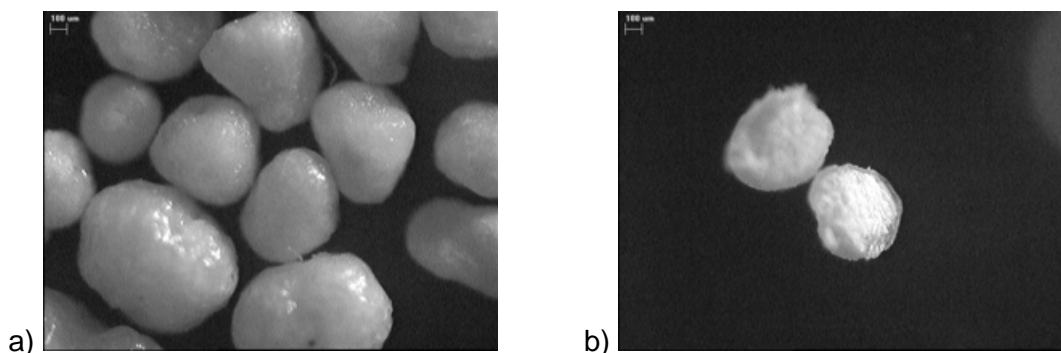
Ocena właściwości mikrozbiorników zawierających ChS

Peletki powlekane

Rdzenie peletek zawierające ChS sporządzano metodą granulacji na mokro i sferonizacji (*Metodyka*, p. 3.1.1.). Otrzymano dwie serie granulatu, o jednolitej gładkiej powierzchni, chociaż peletki nie były dokładnie kuliste (ryc. 18 a). W badaniach wykorzystywano frakcję o wielkości 0,315 – 0,63 mm, która stanowiła ok. 60% masy wszystkich otrzymanych peletek.

Aby zapewnić przedłużone uwalnianie ChS z peletek, otrzymane rdzenie powlekano wodną dyspersją etylocelulozy (*Metodyka*, p. 3.1.2.).

Sporządzono 3 serie powlekanych peletek z ChS (P-I, P-II i P-III). Badania mikroskopowe wykazały, że otrzymane peletki posiadały kompletną otoczkę o grubości od 10 do 20 μm (ryc. 18 b).



Ryc. 18. Peletki z chlorowodorkiem selegiliny powlekane filmem z etylocelulozy: (a) powierzchnia peletek, (b) przekrój peletek (znacznik skali = 100 μm).

W badaniu zawartości ChS w peletkach (*Metodyka*, p. 4.2.) oznaczono, że substancja lecznicza stanowiła 22,5% (peletki P-I), 29,0% (peletki P-III) i 30,0% (peletki P-II) ich masy (zawartość teoretyczna – 30%). Różnice zawartości wynikały z zastosowania różnych objętości dyspersji etylocelulozy przy powlekanii rdzeni peletek i różnego udziału otoczki w masie peletek. Najgrubszą otoczkę (20 μm) posiadały powlekane peletki P-I, na powleczenie których zużyto 600 ml dyspersji.

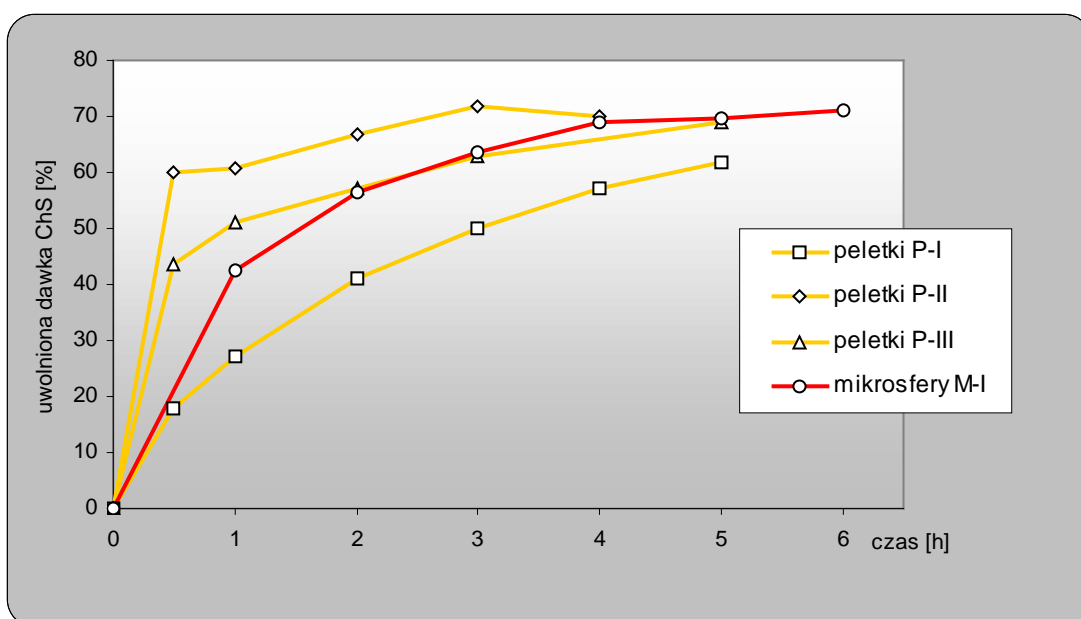
Badanie dostępności farmaceutycznej ChS z mikrozbiorników tego typu prowadzono do wody (*Metodyka*, p. 4.3.), a uzyskane wyniki zaprezentowano w tabeli 22 i na ryc. 19.

Najmniejszą szybkością uwalniania charakteryzowała się formuacja P-I, posiadająca najgrubszą otoczkę. Po 1 h badania z tych peletek uwolniło się zaledwie

27,2% dawki substancji leczniczej, natomiast w przypadku peletek z cieńszą otoczką wyrzut ChS był większy i wynosił 60,8% (P-II) i 50,9% (P-III). Ze wszystkich układów powlekanych peletek uwalnianie ChS przebiegało w sposób spowolniony (w porównaniu do peletek niepowlekanych, z których substancja lecznicza uwalniała się natychmiast), a ilość uwolnionej dawki wynosiła ok. 70% po 8 h i ok. 90% po 24 h badania. Najbardziej powtarzalne wyniki uzyskano dla peletek typu P-I i P-III (sd<2,5%).

Tab. 22. Uwalnianie ChS [% całkowitej dawki \pm sd] z peletek powlekanych i mikrosfer (n \geq 3)

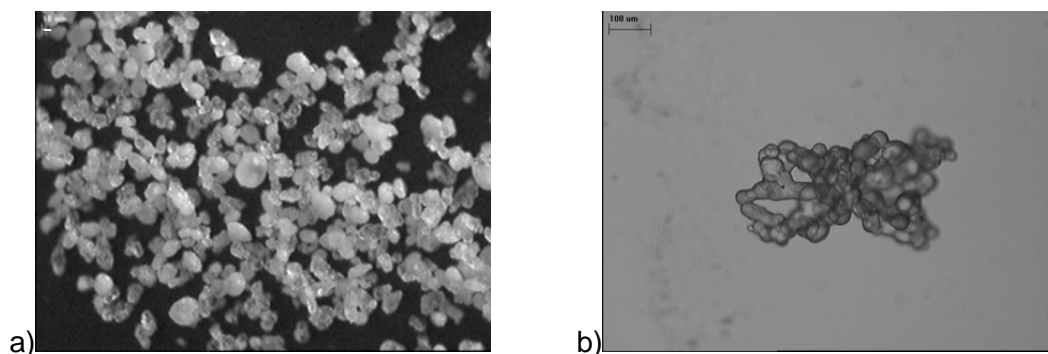
Rodzaj cząstek	Czas [h]								
	0,5	1	2	3	4	5	6	8	24
P-I	17,9 \pm 2,2	27,2 \pm 1,9	40,9 \pm 1,7	49,9 \pm 1,8	57,1 \pm 2,1	61,9 \pm 1,8	–	71,4 \pm 2,5	85,9 \pm 2,3
P-II	60,0 \pm 6,7	60,8 \pm 8,6	66,8 \pm 8,3	71,9 \pm 5,7	70,1 \pm 4,7	–	–	75,6 \pm 9,7	91,5 \pm 10,4
P-III	43,6 \pm 0,7	50,9 \pm 2,0	57,2 \pm 1,6	62,8 \pm 1,5	–	68,8 \pm 0,9	–	70,2 \pm 1,6	87,5 \pm 1,5
M-I	–	42,4 \pm 0,6	56,6 \pm 3,4	63,6 \pm 5,4	68,8 \pm 1,9	69,8 \pm 5,5	71,2 \pm 6,1	–	92,1 \pm 4,3



Ryc. 19. Uwalnianie ChS z peletek powlekanych i mikrosfer.

Mikrosfery

Mikrosfery zawierające ChS sporządzono metodą odparowywania lotnego rozpuszczalnika organicznego z układu o/o (*Metodyka*, p. 3.2.) korzystając z etylocelulozy jako polimeru tworzącego mikrosfery. Wielkość otrzymanych w ten sposób mikrosfer (serie M-I i M-II) mieściła się w zakresie od 40 do 150 μm . Mikrosfery miały tendencję do aglomeracji, co zaprezentowano na ryc. 20.



Ryc. 20. Mikrosfery z ChS: a) w stanie wysuszonym, b) zawieszona w wodzie (znacznik skali = 10 μm – ryc. a lub 100 μm – ryc. b).

Zawartość ChS w mikrosferach (*Metodyka*, p. 4.2.) wynosiła 9,8% (mikrosfery M-I) oraz 13,6% (mikrosfery M-II), co wskazuje, że wydajność procesu inkorporowania ChS w matrycę mikrosfer wynosiła ok. 30 – 40%.

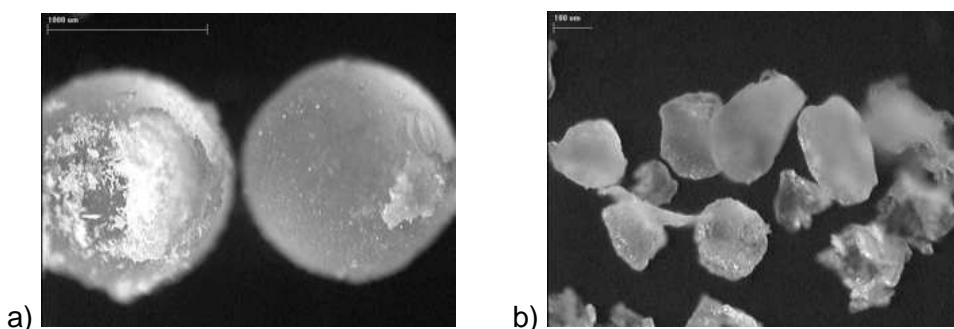
Badanie dostępności farmaceutycznej ChS przeprowadzono wyłącznie dla mikrosfer serii M-I, stosując jako płyn akceptorowy wodę (*Metodyka*, p. 4.3.). Profil uwalniania ChS z mikrosfer (tabela 22 i ryc. 19) był zbliżony do profilu uzyskanego dla powlekanych peletek serii P-III. Po początkowym wyrzucie ponad 40% dawki w ciągu 60 min, substancja lecznicza uwalniała się w sposób przedłużony do 24 h.

Sieciowany mikrogranulat

Mikrogranulat zawierający ChS przygotowano metodą sieciowania (*Metodyka*, p. 3.3.) naturalnych polimerów: alginianu sodu i pektyny, pod wpływem jonów dwuwartościowych (Ca^{2+} i Zn^{2+}). Niezależnie czy wytwarzano cząstki w układzie cieczy (wkraplanie), czy z proszków (w młynku), otrzymywano formy o wielkości ok. 1–2 mm i dopiero w procesie mielenia uzyskiwano wymagany rozmiar (100 – 200 μm).

Rycina 21 przedstawia kuliste cząstki sieciowanego przez 24 h alginianu wapnia (a), które następnie poddano mieleniu (b). Zawartość ChS w utworzonym

mikrogranulacie wynosiła 12,2%, a wydajność procesu inkorporowania substancji leczniczej w sieciowanej matrycy wynosiła ok. 40%.



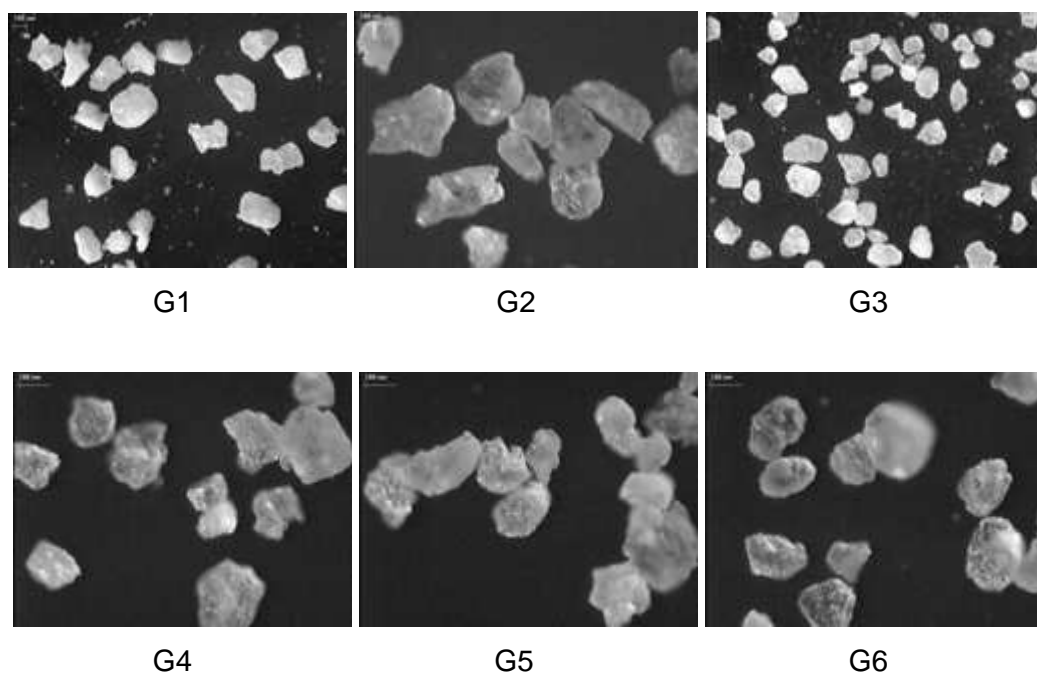
Ryc. 21. Wygląd cząstek z sieciowanego alginianu wapnia zawierających ChS: przed zmieleniem (a, znacznik skali = 1 mm) i mikrogranulatu XA otrzymanego w wyniku mielenia (b, znacznik skali = 100 μ m).

Zaproponowano dwie metody sporządzania mikrogranulatu z sieciowanej pektyny, charakteryzującego się przedłużonym uwalnianiem ChS. Różniły się one sposobem łączenia ChS z pektyną przed etapem sieciowania: w pierwszej z metod (mikrogranulaty G1, G3 – G6) pektynę mieszano z ChS w formie proszku, natomiast w drugiej metodzie (mikrogranulat G2) pektynę zwilżano roztworem ChS. Uzyskane mikrogranulaty różniły się stosunkiem składników (tabela 13 – *Metodyka*, p. 3.3.2.).

Granulaty z sieciowanej pektyny mielono po procesie sieciowania i suszenia. Frakcję o wielkości ziarna w zakresie 100 – 200 μ m, stanowiącą ok. 40% masy produktu, wybierano do dalszych badań.

Niezależnie od metody sporządzania oraz składu w obrazie mikroskopowym nie zaobserwowano istotnych różnic w wyglądzie mikrogranulatów sieciowanej pektyny. Miały one kształt nieregularnych, przeświecających, nie rozpuszczających się w wodzie granulek. Zdjęcie mikroskopowe mikrogranulatów prezentuje ryc. 22.

W przypadku wszystkich granulatów, w których łączono pektynę z ChS w stosunku 2:1 (G1, G2, G3) oznaczona zawartość ChS mieściła się w granicach 22,3 – 24,9%. Proporcjonalnie zmniejszająca się zawartość ChS w mikrogranulatach typu G4 (12,0%), G5 (6,0%) i G6 (3,5%) wynikała z różnego stosunku pektyny i ChS użytych do ich produkcji: odpowiednio 5:1, 10:1 i 20:1. Dla mikrogranulatów wszystkich typów oznaczona zawartość selegiliny stanowiła od 96,5% do 116% wartości teoretycznej.

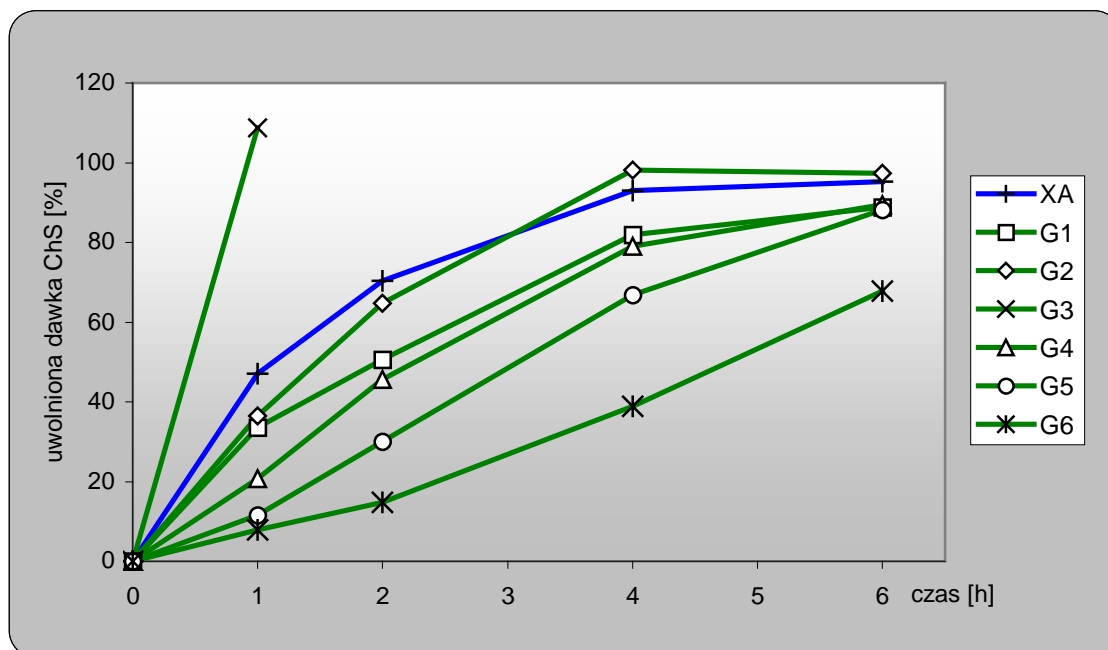


Ryc. 22. Obraz mikroskopowy mikrogranulatów z sieciowanej pektyny (znacznik skali=100 µm).

Uzyskane wyniki uwalniania ChS z mikroziarników z sieciowanego alginianu sodu i sieciowanej pektyny do wody zebrano w tabeli 23 oraz przedstawiono graficznie na ryc. 23.

Tab. 23. Uwalnianie ChS [% całkowitej dawki \pm sd] do wody z mikrogranulatu sieciowanego alginianu wapnia (XA) oraz sieciowanej pektyny (G1-6), ($n \geq 3$)

Rodzaj cząstek	Czas [h]				
	1	2	4	6	24
XA	47,1 \pm 4,1	70,4 \pm 18,8	93,0 \pm 15,8	95,3 \pm 10,8	99,1 \pm 0,3
G1	33,5 \pm 6,4	50,6 \pm 10,8	81,9 \pm 4,5	88,8 \pm 8,0	–
G2	36,5 \pm 4,7	64,8 \pm 7,7	98,2 \pm 0,8	97,3 \pm 1,8	93,8 \pm 2,5
G3	108,7 \pm 3,7	108,1 \pm 1,7	105,7 \pm 2,8	103,0 \pm 1,9	101,9 \pm 2,2
G4	20,7 \pm 6,0	45,6 \pm 9,8	79,0 \pm 12,0	89,5 \pm 1,8	89,9 \pm 2,1
G5	11,6 \pm 2,6	30,0 \pm 5,3	66,9 \pm 11,5	88,2 \pm 5,6	91,0 \pm 0,8
G6	7,8 \pm 1,2	14,7 \pm 3,4	38,8 \pm 4,4	67,8 \pm 9,1	87,1 \pm 0,6



Ryc. 23. Uwalnianie ChS z sieciowanego mikrogranulatu.

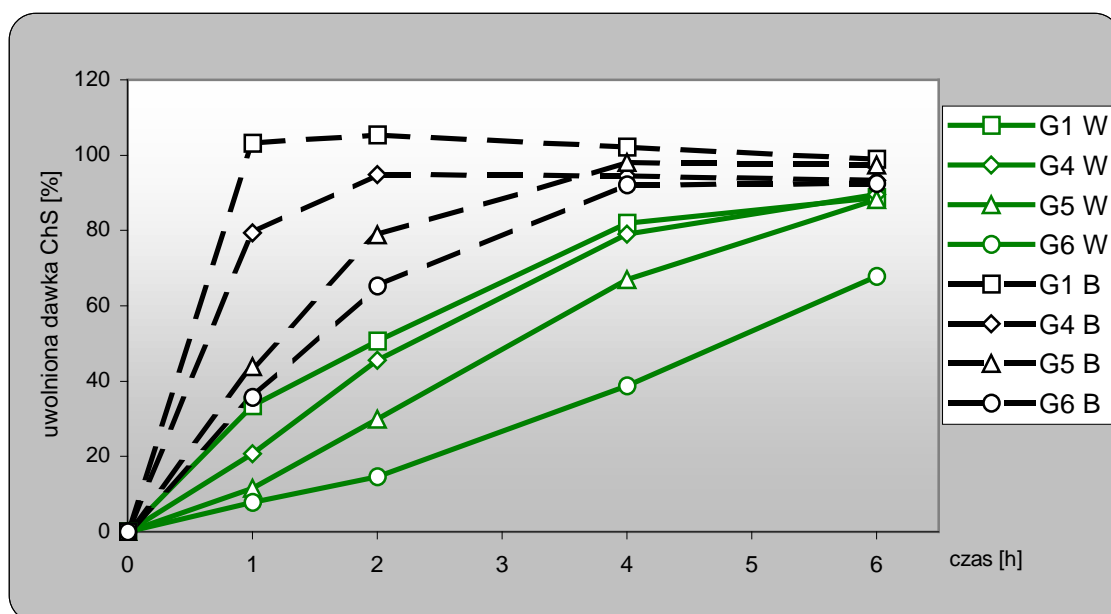
Uwalnianie ChS z mikrogranulatów sporządzonych z sieciowanego alginianu wapnia (XA) i sieciowanej pektyny (G 2) przebiegało z podobną kinetyką. W ciągu 2 h badania z tych mikrogranulatów uwalniało się ok. 70% dawki substancji leczniczej, a po 4 h ponad 93%. W przypadku mikrogranulatu G 1, sporządzonego ze sproszkowanego ChS, uwalnianie przebiegało wolniej niż z granulatu G 2 – otrzymanego z użyciem ChS w roztworze (po 2 h w płynie akceptorowym oznaczano ok. 50% dawki substancji leczniczej).

Analizując profile uwalniania ChS z mikrogranulatów G4 – G6 można zauważyć, że szybkość uwalniania substancji leczniczej zależała od udziału sieciowanej pektyny: im większy był stosunek pektyny do ChS w granulowanej masie, tym wolniejsze było uwalnianie substancji leczniczej. Dla mikrogranulatu G6, zawierającego 20-krotnie większą ilość pektyny niż ChS, uwalnianie przebiegało z najmniejszą szybkością. W tym przypadku w ciągu 1 h uwalniało się tylko ok. 8% ChS, a 60% dawki ChS uwalniało się dopiero po 6 h badania.

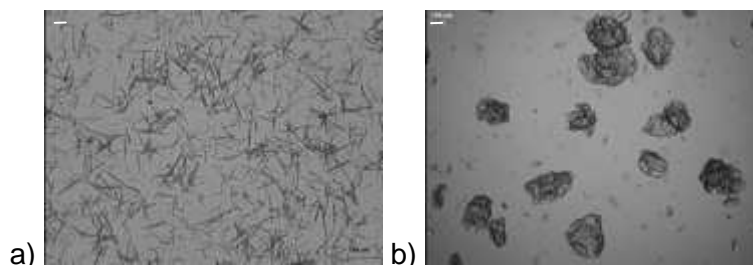
Podjęto także próbę sporządzenia granulatu w większej ilości (granulat G3 – 60 g). Niestety, pomimo użycia proporcji składników takiej, jak w przypadku mikrogranulatu G1, uzyskano odmienny profil uwalniania, co świadczy o trudnościach w zwiększeniu skali produkcyjnej. Cała dawka ChS uwolniła się z cząstek mikrogranulatu tej serii już w ciągu 1 h (ryc. 23).

Odmienne profile uwalniania dla sieciowanych mikrogranulatów uzyskano, gdy zmieniono płyn akceptorowy (wodę) na bufor fosforanowy o pH 7,4. Spowodowało to

istotny wzrost szybkości uwalniania dla mikrogranulatów wszystkich typów (ryc. 24). Wynikało to z interakcji pomiędzy jonami Zn^{2+} zawartymi w sieciowanym mikrogranulacie, a jonami fosforanowymi z buforu. Efektem tych oddziaływań była wzrastająca opalizacja roztworu w trakcie uwalniania i ostatecznie wytrącanie się białego osadu fosforanu cynku. W wyniku tego procesu następowało szybsze rozpuszczanie mikrogranulatu, szczególnie w przypadku mikrogranulatów o mniejszym udziale pektyny (G1, G4), a przez to także szybsze uwalnianie ChS. W obrazie mikroskopowym płynu po zakończeniu badania uwalniania z mikrogranulatu G1 nie obserwowano obecności mikrogranulek, a jedynie igły fosforanu cynku (ryc. 25 a). Dla porównania na ryc. 25 b zaprezentowano obraz mikroskopowy sieciowanego granulatu G1 po 24 h uwalniania do wody.



Ryc. 24. Uwalnianie ChS z mikrogranulatu sieciowanej pektyny do wody (W) lub buforu fosforanowego (B).



Ryc. 25. Zdjęcia mikroskopowe płynu po uwalnieniu z mikrogranulatu G1 do buforu fosforanowego (a) i do wody (b) (znacznik skali = 100 μ m).

Zauważona niezgodność pomiędzy jonami cynku i jonami fosforanowymi została opisano ostatnio również przez innych autorów [111, 126]. Jednak w badaniach mikrokapsulek pektynowych Dhalleine i in. obserwowali w rezultacie tej interakcji spadek szybkości uwalniania substancji leczniczej (teofiliny), co tłumaczono wytrąceniem fosforanu cynku na powierzchni mikrokapsulek.

Uzyskane wyniki wskazują, że mimo szybszego uwalniania ChS, zależność pomiędzy szybkością uwalniania a zawartością sieciowanej pektyny w mikrogranulacie, obserwowana przy uwalnianiu do wody, pozostaje zachowana także w przypadku uwalniania do buforu fosforanowego.

Ocena właściwości mukoadhezyjnych polimerów tworzących matrycę krążka liofilizowanego

Równoległe z badaniami nad otrzymywaniem mikroziarników charakteryzujących się przedłużonym uwalnianiem selegiliny, prowadzono także doświadczenia dotyczące opracowania składu matrycy krążka liofilizowanego, stanowiącego nośnik mikrocząstek z substancją leczniczą. Polimer budujący matrycę krążka, oprócz odpowiednich właściwości fizykochemicznych i wytrzymałościowych, powinien zapewniać kilkugodziną adhezję systemu do błony śluzowej policzka.

Do badań wytypowano grupę polimerów, zarówno syntetycznych, jak i naturalnych: Carbopol 974P (CP), karmeloza sodowa (CMCNa), alginian sodu (AlgNa), pochodna kwasu maleinowego – Gantrez MS-955 (MS955), pektyna (Pek), hydroksyetyloceluloza. Badano także mieszaninę pektyny, żelatyny i karmelozy sodowej, występującą w składzie handlowego preparatu o nazwie Orabase. Z wymienionych polimerów otrzymywano 3 formy: roztwory, krążki liofilizowane oraz dyski (*Metodyka*, p. 6.2.1.), dzięki czemu możliwa była ocena wpływu postaci farmaceutycznej polimeru na jego właściwości mukoadhezyjne.

Właściwości mukoadhezyjne polimerów oceniano przy użyciu analizatora tekstury, wyposażonego w przystawkę A/Muc z zastosowaniem warstwy żelatyny lub roztworu mucyny, jako substytutu naturalnej błony śluzowej (*Metodyka*, p. 6.2.2.). Badania mukoadhezji dla roztworów wodnych polimerów przeprowadzono tylko dla modelu z zastosowaniem żelatyny.

Krążki liofilizowane placebo użyte w badaniach scharakteryzowano w tabeli 24. Odnaczały się one na ogół dobrymi właściwościami mechanicznymi. Różnice mas poszczególnych typów krążków, pomimo tej samej objętości, wynikają z suszenia roztworów o różnych stężeniach i obrazują różnice gęstości matryc liofilizowanych.

Tab. 24. Liofilizowane krążki placebo użyte w badaniach adhezji (wymiar: średnica 12 mm, wysokość 4 mm)

Polimer		Masa krążka [mg] $\bar{X} \pm sd, n \geq 6$	Gęstość krążka [mg/cm ³]
symbol *	stężenie		
CP3		6,7 ± 0,6	14,6
CP4		7,7 ± 0,5	17,0
CP6	1%	9,0 ± 0,8	19,9
CP7		9,6 ± 0,7	21,2
CMCNa	1%	6,2 ± 0,3	13,7
AlgNa	2%	14,2 ± 0,8	31,4
Orabase	6%	41,9 ± 1,6	92,7
MS955	2%	15,3 ± 1,6	33,8
HEC	2%	14,0 ± 0,6	31,0
Pek3		14,3 ± 0,7	31,6
Pek5		13,7 ± 1,3	30,3
Pek6	2%	13,6 ± 0,9	30,0
Pek9		14,3 ± 0,6	31,6

* – cyfra przy symbolu Carbopolu (CP) i pektyny (Pek) wskazuje na pH roztworu przed suszeniem (objaśnienia symboli – *Metodyka*, p. 5.1.)

Właściwości adhezyjne krążków liofilizowanych porównano z właściwościami dysków polimerowych otrzymywanych w wyniku bezpośredniego prasowania, przy użyciu tabletkarki uderzeniowej (*Metodyka*, p. 6.2.1.). Średnica sporządzonych dysków wynosiła 12 mm, grubość 1,5 – 1,8 mm, a masa mieściła się w zakresie 170 – 190 mg. Gęstość tych form w porównaniu do krążków liofilizowanych była od 10 do 100 razy większa i wynosiła ok. 1 g/cm³.

Wyniki badania, wyrażone jako praca mukoadhezji, uzyskane dla poszczególnych form i rodzajów polimerów poddano podstawowej analizie matematycznej (p. 6.2.3.), a uzyskane dane zaprezentowano w tabeli 25. W celu wykluczenia grubych błędów pomiarowych przy obliczaniu wartości średniej z pomiarów zastosowano test Q-Dixona, dla poziomu prawdopodobieństwa 95%.

Tab. 25. Wartości pracy mukoadhezji [μ J] zmierzone dla polimerów w formie krążków liofilizowanych, dysków prasowanych i roztworów ($n \geq 6$)

Rodzaj polimeru*		Rodzaj warstwy adhezyjnej					
		żelatyna			10% mucyna		
		\bar{X}	sd	RSD	\bar{X}	sd	RSD
krążki liofilizowane							
CMCNa		155,0	24,9	16,0	197,2	64,1	32,5
AlgNa		151,6	35,8	23,6	832,4	212,8	25,6
Orabase		265,2	83,1	31,3	308,6	71,1	23,0
MS955		52,3	17,8	34,0	330,7	33,6	10,2
HEC		36,8	12,6	34,2	446,2	83,4	18,7
Pek	pH 3	316,4	73,6	23,3	486,6	49,7	10,2
	pH 4	39,0	17,8	45,7	n.b.		
	pH 5	67,6	5,4	8,0			
	pH 6	106,5	28,3	26,6			
CP	pH 3	139,9	29,7	21,3	161,4	4,4	2,7
	pH 4	220,7	76,8	34,8	n.b.		
	pH 6	143,6	37,9	26,4	283,5	70,9	25,0
	pH 7	216,7	88,9	41,0	n.b.		
dyski (tabletki)							
CMCNa		253,7	156,7	61,8	257,3	105,8	41,1
AlgNa		142,5	67,9	47,6	64,8	13,4	20,7
Orabase		106,5	58,6	55,0	154,5	63,9	41,4
MS955		120,6	43,3	35,9	77,9	52,8	67,8
HEC		33,5	12,1	36,0	203,5	69,9	34,4
Pek		127,2	45,0	35,4	85,4	15,6	18,3
CP		125,4	76,0	60,6	263,0	153,4	58,3
roztwory (żele)							
CMCNa		81,5	18,9	23,2	n.b.		
AlgNa		25,1	3,5	13,9			
Orabase		138,7	20,5	14,8			
MS955		15,5	5,0	32,3			
HEC		74,0	11,4	15,4			
Pek	pH 3	50,9	10,7	21,0			
	pH 4	31,2	19,2	61,5			
	pH 5	67,1	39,1	58,3			
	pH 6	23,6	6,8	28,8			
CP	pH 3	108,5	37,0	34,1			
	pH 6	107,8	35,5	32,9			

* – objaśnienia symboli – *Metodyka*, p. 5.1.; (n.b. – nie badano)

Analiza uzyskanych wyników pozwala stwierdzić, że niezależnie od modelowego substytutu błony śluzowej (żelatyna lub mucyna) powtarzalność pomiarów jest zbliżona. Większy wpływ na powtarzalność wyników miał rodzaj badanego materiału. Największą powtarzalnością charakteryzowały się wyniki uzyskane dla krążków liofilizowanych (RSD<24%), natomiast największy rozrzut wyników uzyskano w przypadku oceny właściwości mukoadhezyjnych grupy prasowanych dysków polimerowych (RSD nawet do 67%).

Porównanie adhezji różnych form polimerów do warstwy żelatyny wskazuje, że najniższymi wartościami pracy mukoadhezji charakteryzowały się żele. Tylko w przypadku roztworu CP i Orabase, wartości pracy przekroczyły 100 μJ (tabela 25), natomiast najniższą mukoadhezję wykazywał roztwór polimeru Gantrez MS955 (15,5 μJ). Zarówno dla roztworów, jak i krążków CP i pektyny, nie udało się wykazać zależności pomiędzy pH roztworu badanego polimeru a siłą wiązania z warstwą żelatyny.

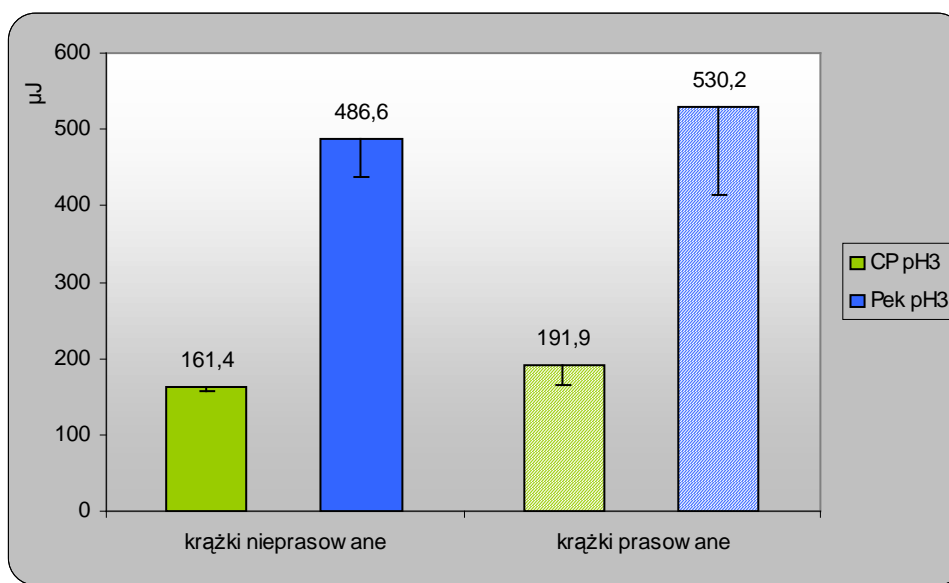
W trakcie badania adhezji dysków (tabletek) polimerowych zaobserwowano, że zarówno woda dozowana do komory pomiarowej z warstwą żelatyny (200 μl), jak również roztwór mucyny (50 μl), zapewniały jedynie powierzchniowe zwilżanie tych form. Być może fakt ten był powodem uzyskania bardzo zbliżonych wyników pracy mukoadhezji wszystkich rodzajów dysków (tabela 25). W porównaniu z roztworami polimerów formy tabletkowane silniej wiązały się z modelowymi błonami śluzowymi, a największą pracą mukoadhezji (ok. 200 μJ) charakteryzowały się dyski CMCNa, CP, Orabase i HEC (badanie z warstwą mucyny).

Z trzech analizowanych form polimerów najwyższe wartości pracy mukoadhezji do warstwy żelatyny oznaczono dla krążków liofilizowanych, np. w przypadku krążków zbudowanych z niealkalizowanej postaci pektyny (Pek pH 3), mieszaniny Orabase oraz CP o pH 4 i pH 7 wartość pracy mukoadhezji przekraczała 200 μJ . Adhezja tych krążków była jeszcze silniejsza (praca mukoadhezji ok. 300 – 400 μJ), gdy warstwę żelatyny zastąpiono w badaniach 10% roztworem mucyny. Zaskakująco wysokie wartości pracy mukoadhezji oznaczono dla polimeru Gantrez MS955 i alginianu sodu, dla których, po zmianie warstwy adhezyjnej, wartości pracy mukoadhezji wzrosły ok. 6-krotnie (odpowiednio 330 i 832 μJ), ale najwyższy wzrost adhezji krążków (ponad 15-krotny) notowano dla hydroksyetylocelulozy (36,8 μJ dla warstwy żelatyny i 466,2 μJ dla warstwy mucyny).

Aby ocenić, czy sposób aplikacji krążka (zgniatanie i dociskanie w miejscu aplikacji) może wpłynąć na właściwości mukoadhezyjne krążków, niealkalizowane krążki Carbopolu i pektyny prasowano przez 1 min z siłą 5 N (*Metodyka*, p. 6.2.1.), co powodowało ok. 10-krotne zmniejszenie ich wysokości. Tak przygotowane krążki

umieszczano w komorze aparatu i mierzono ich adhezję do warstwy mucyny. Wyniki badania, porównane z wartościami uzyskanymi dla krążków nieprasowanych, przedstawiono na ryc. 26.

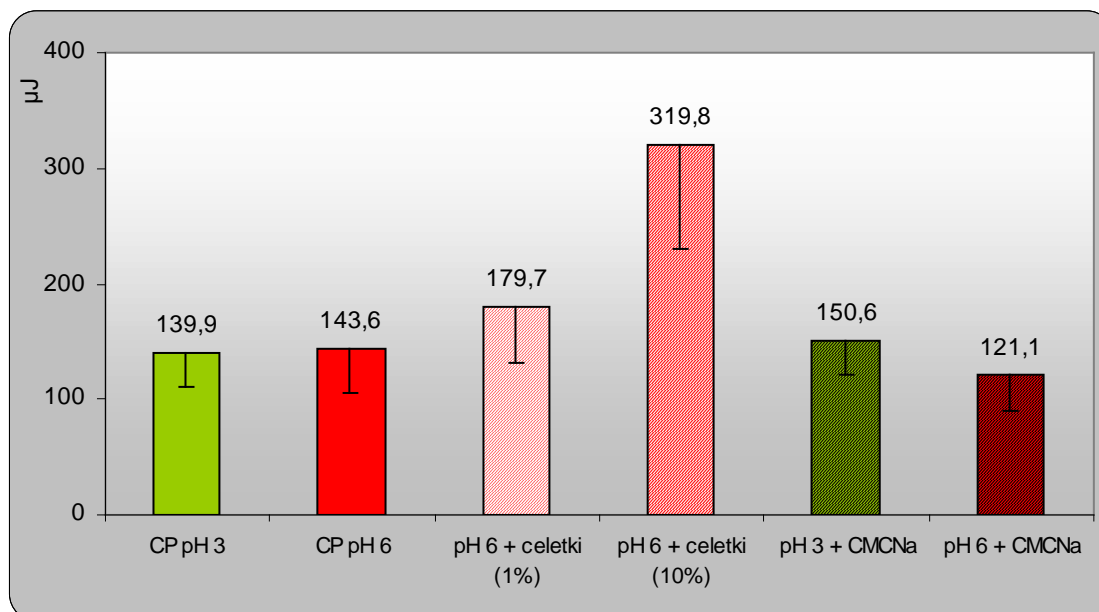
Dla obu typów krążków wykazano, że zmiana kształtu i gęstości krążka spowodowana prasowaniem (zgniataniem) nie ma praktycznie wpływu na ostateczną wartość pracy mukoadhezji.



Ryc. 26. Wpływ wstępnego prasowania na właściwości mukoadhezyjne liofilizowanych krążków Carbopolu (CP) i pektyny (Pek) o pH 3.

Przygotowano także krążki Carbopolu o modyfikowanym składzie (*Metodyka*, p. 6.2.1.). Zmiana składu krążka polegała bądź na wprowadzeniu do składu drugiego polimeru (dodatek CMCNa w stosunku 1:1), bądź na inkorporacji modelowych peletek (cząstki 100 – 200 μm) do matrycy liofilizowanego Carbopolu. Wyniki badania adhezji do warstwy żelatyny przedstawiono na wykresie (ryc. 27), na którym dla porównania przedstawiono także wartości pracy mukoadhezji typowych krążków CP o pH 3,0 i 6,0.

Przedstawione na ryc. 27 dane wskazują, że wprowadzenie do krążków CP dodatkowego polimeru o uznanych właściwościach mukoadhezyjnych (karmelozy sodowej), praktycznie nie wpływa na wartość pracy mukoadhezji, niezależnie, czy pH roztworu CP przed suszeniem wynosiło 3,0 czy 6,0. Natomiast inkorporacja celetek do matrycy polimeru CP o pH 6,0 zwiększa jej właściwości mukoadhezyjne. Co ciekawe, im większa jest zawartość celetek w krążku, tym wyższą siłą adhezji charakteryzuje się cały układ.

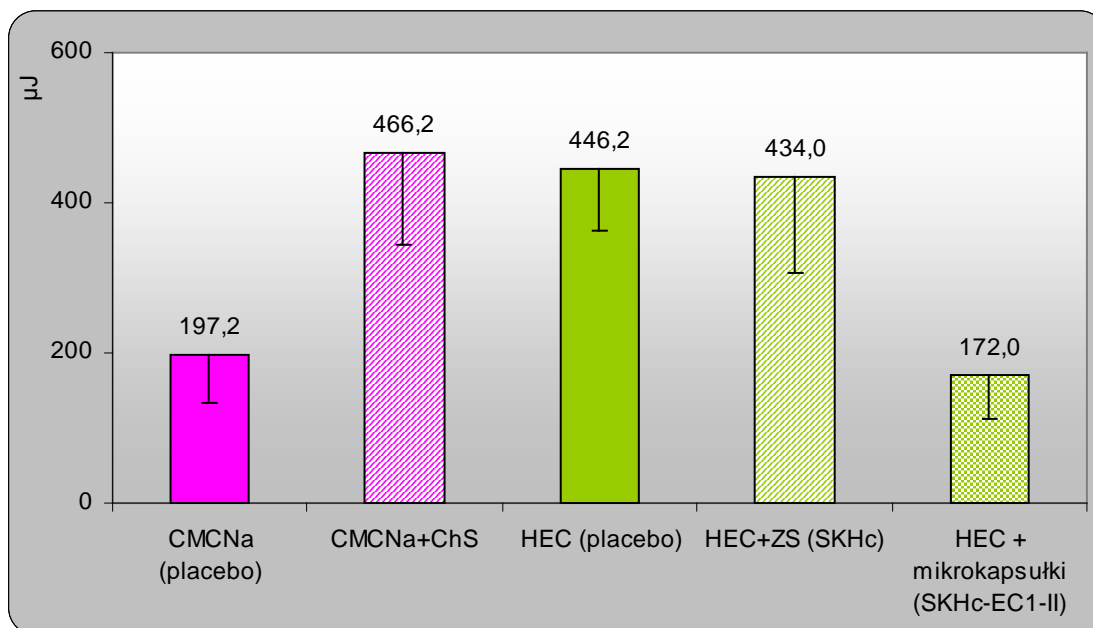


Ryc. 27. Porównanie pracy mukoadhezji liofilizowanych krążków z Carbopolu (CP) z krążkami o modyfikowanym składzie – z dodatkiem celetek (1% lub 10%) lub CMCNa (1:1).

Inkorporacja do matrycy krążków substancji leczniczej w formie wolnej zasady lub ChS nie obniżała wartości mierzonych dla analogicznych krążków placebo (ryc. 28). W przypadku krążków zawierających zasadę selegiliny w matrycy HEC (SKHc) praca mukoadhezji wynosiła 434 μJ i była bardzo zbliżona do wartości uzyskanej dla formy placebo, natomiast wprowadzenie ChS do matrycy z CMCNa spowodowało wzrost siły adhezji ze 197,2 μJ (krążek CMCNa placebo) do 466,2 μJ (krążek KCn-ChS).

Niestety tego samego efektu nie obserwowano, gdy do matrycy krążka wykonanego z HEC wprowadzono mikrokapsułki z etylocelulozy zawierające zasadę selegiliny (krążek SKHc-EC1-II). W tym przypadku wartość pracy mukoadhezji, w porównaniu do układu placebo (446,2 μJ) spadła i wynosiła 172 μJ (mimo to, była to wartość zadowalająca) (ryc. 28). Być może obniżenie siły wiązania krążka z błoną śluzową wynikało z niekorzystnego wpływu na polimer mukoadhezyjny rozpuszczalnika organicznego, użytego na etapie tworzenia mikrocząstek.

Analizując uzyskane wyniki można stwierdzić, że najwyższą pracą mukoadhezji, niezależnie od postaci wykazują takie polimery jak: karmeloza sodowa, Carbopol i Orabase. Z kolei hydroksyetyloceluloza posiadała bardzo dobre właściwości adhezyjne, jeżeli tworzono z niej liofilizaty. Zdecydowano się więc na wykorzystanie tych 4 polimerów jako matryc w dalszych badaniach krążków liofilizowanych z substancją leczniczą.



Ryc. 28. Wpływ dodatku selegiliny w formie wolnej zasady (ZS), ChS lub mikrokapsułek na pracę mukoadhezji krążków wykonanych z CMCNa lub HEC, w porównaniu z formami placebo.

Właściwości krążków liofilizowanych zawierających ChS w formie substancji lub mikroorganizmów

Kolejny etap badań polegał na otrzymaniu liofilizowanych krążków polimerowych zawierających ChS w różnych formach: substancji, peletek powlekanych, mikrosfer, mikrogranulatu oraz mikrogranulatu powlekanego.

W celu otrzymanie liofilizatów ChS (substancję) rozpuszczano w roztworach hypromelozy, metylocelulozy, karmelozy sodowej, Orabase oraz Carbopolu (*Metodyka*, p. 5.2.). W trakcie dodawania roztworu ChS do żelu Carbopolu obserwowano upłynnianie struktury i mętnienie żelu. Intensywne mieszanie i dodatkowe alkalizowanie roztworem NaOH pozwalało na przywrócenie właściwej struktury żelu.

Wszystkie otrzymane krążki liofilizowane (ryc. 29), zawierające niegranulowaną formę ChS, były barwy białej (krążki Orabase były białe – kremowe) i zachowały kształt blistrów, w których były suszone (dla żadnego z krążków nie obserwowano zjawiska kontrakcji). Szczególnie dobrymi właściwościami mechanicznymi charakteryzowały się krążki uzyskane z roztworów karmelozy sodowej, Orabase oraz żelu Carbopolu. Jakość krążków otrzymanych z zastosowaniem hypromelozy różniła się w zależności od lepkości roztworów tego polimeru użytych do sporządzenia liofilizatów. Gdy zastosowano hypromelozę o lepkości 15 mPa•s (Pharmacoat 615) otrzymano krążki o dobrej wytrzymałości, natomiast liofilizacja roztworów hypromelozy o wyższej lepkości (50 i 4000 mPa•s) oraz metylocelulozy nie pozwalała na otrzymanie krążków o

zadowalających właściwościach. Krążki te były zbyt miękkie, elastyczne, miały nieregularne kształty, kleiły się do gniazd blistrów, przez co trudno je było wyjąć.

Krążki, które charakteryzowały się dobrymi właściwościami mechanicznymi, zostały wytypowane do badań szybkości uwalniania substancji leczniczej w warunkach *in vitro* (*Metodyka*, p. 6.3.). Badanie to przeprowadzono dla 2 serii krążków KChS, KO-ChS i KHm-ChS oraz 1 serii krążków KCP-ChS. Przed badaniem jeden z krążków z matrycy Carbopolu (KCP-ChS-D) obciążano odważnikiem 500 g, co miało symulować nacisk w trakcie aplikacji.

Wyniki badania zebrano w tabeli 26 i przedstawiono graficznie na ryc. 30.



Ryc. 29. Wygląd krążków liofilizowanych zawierających ChS (substancję).

Krążki, których matrycę stanowiła karmeloza sodowa lub Orabase w kontakcie z wodą, podczas badania uwalniania, tworzyły wolno rozpuszczający się hydrożel, uwalniający substancję leczniczą w sposób przedłużony, przy czym obserwowano uwolnienie ok. 40% dawki ChS już po 30 min.

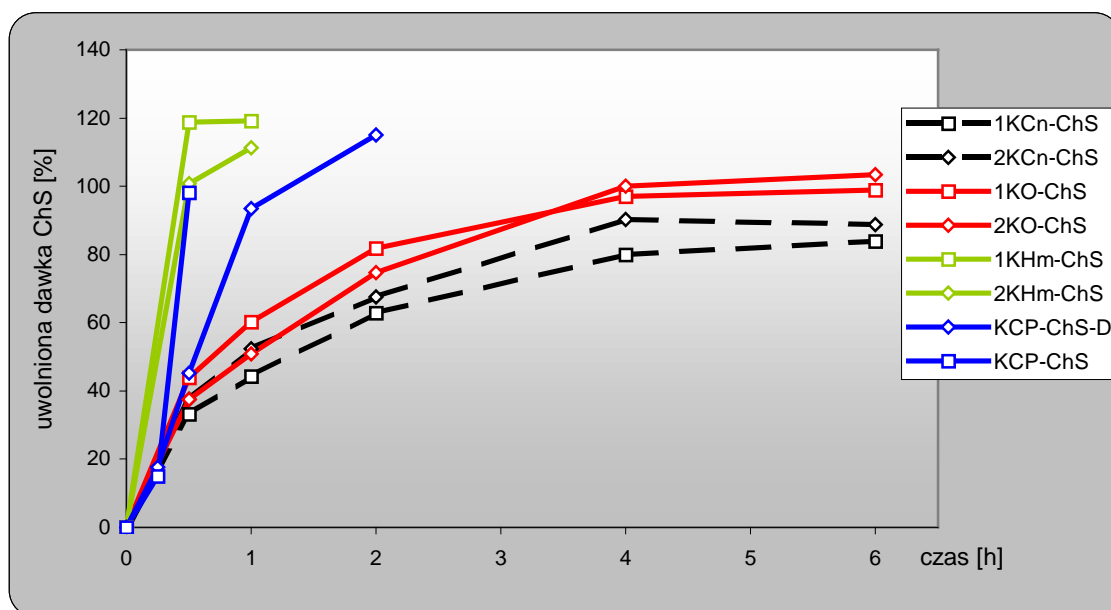
Odmienne zachowywały się krążki, w których szkielet matrycy adhezyjnej stanowił Pharmacoat lub Carbopol. Krążki te praktycznie natychmiast po umieszczeniu w płynie akceptorowym ulegały całkowitemu zwilżeniu i rozpuszczeniu w ciągu 30–60 min, co w konsekwencji prowadziło do uwolnienia całej dawki leku. Krążki KHm-ChS a także KCP-ChS-D, które przed badaniem zgniatano, uwalniały ChS jeszcze szybciej.

Tab. 26. Uwalnianie ChS [% całkowitej dawki \pm sd] z krążków zawierających ChS (substancję) (objaśnienia symboli – Metodyka, p. 5.2.)

Polimer tworzący matrycę	Rodzaj krążków*	Czas [h]					
		0,25	0,5	1	2	4	6
CMCNa	1KcN-ChS	–	33,1 \pm 3,6	44,2 \pm 1,5	62,9 \pm 1,7	79,9 \pm 1,9	84,0 \pm 5,4
	2KcN-ChS	–	37,5	52,4	67,6	90,3	88,7
Orabase	1KO-ChS	–	43,8 \pm 4,0	60,2 \pm 2,7	81,8 \pm 9,6	97,0	98,8 \pm 1,4
	2KO-ChS	–	37,5	50,9	74,8	100,0	103,4
HPMC	1KHm-ChS	–	118,7	119,2	–	–	–
	2KHm-ChS	–	100,7 \pm 6,0	111,2 \pm 3,0	–	–	–
Carbopol	KCP-ChS	17,6 \pm 4,3	45,2 \pm 7,6	93,4 \pm 14,1	115,0 \pm 9,8	–	–
	KCP-ChS-D	15,1	98,1	–	–	–	–

* – cyfry podane przed symbolem krążka oznaczają numer serii

D – krążek prasowany



Ryc. 30. Uwalnianie ChS z krążków zawierających substancję w formie rozpuszczonej.

Aby zapewnić większą kontrolę uwalniania ChS z krążków liofilizowanych inkorporowano do matrycy krążka mikroziorniki charakteryzujące się przedłużonym

uwalnianiem substancji leczniczej. Mikroziorniki wprowadzono do roztworu polimeru w takiej ilości, żeby w pojedynczym krążku (o powierzchni 3,1 cm² w przypadku krążków Carbopolu lub 1,3 cm² w przypadku pozostałych rodzajów krążków) dawka ChS wynosiła ok. 10 mg (*Metodyka, p. 5.3.*).

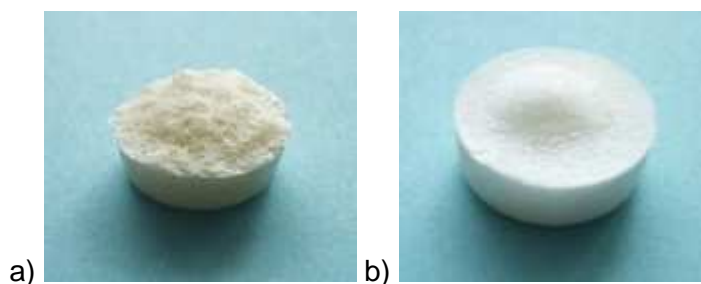
Podczas dodawania mikrogranulatu sieciowanej pektyny do żelu Carbopolu, żel ulegał całkowitemu upłynnieniu, co było prawdopodobnie wynikiem obecności jonów Zn²⁺ na powierzchni granulek. Z tego powodu zaniechano sporządzania krążków z sieciowanym mikrogranulatem na bazie Carbopolu. Odmiennie zjawisko zaobserwowano w czasie zawieszania mikrogranulatu sieciowanej pektyny w Orabase. W tym przypadku zwiększała się lepkość żelu, przez co dozowanie tego układu do blistrów było znacznie utrudnione.

W tabeli 27 przedstawiono krążki uzyskane w wyniku liofilizacji. Wszystkie krążki liofilizowane z mikroziornikami charakteryzowały się odpowiednimi właściwościami mechanicznymi i tylko sporadycznie obserwowano, że cząstki zawierające ChS oddzielają się od polimerowej matrycy krążka.

Otrzymane w wyniku suszenia sublimacyjnego krążki nie różniły się istotnie od krążków otrzymanych z użyciem substancji ChS. Największe różnice w wyglądzie zaobserwowano jedynie dla krążków Orabase, których powierzchnia zewnętrzna, prawdopodobnie w wyniku zmiany lepkości na etapie zawieszania mikrogranulatu, była nierówna (ryc. 31 a).

Tab. 27. Rodzaje krążków liofilizowanych zawierających mikroziorniki z ChS

Mikroziorniki		Rodzaj matrycy krążka	Symbol krążka z mikroziornikami
Rodzaj	Symbol		
Peletki powlekane	P-I	Carbopol	KCP-P-I
	P-II		KCP-P-II
	P-III		KCP-P-III
Mikrosfery	M-I	Carbopol	KCP-M-I
	M-II		KCP-M-II
Mikrogranulat	G1	Pektyna	KP-G1
	XA	Orabase	KO-XA
	G2		KO-G2



Ryc. 31. Porównanie wyglądu krążków liofilizowanych zawierających mikroziorniki z ChS w matrycy adhezyjnej: a) Orabase, b) Carbopolu.

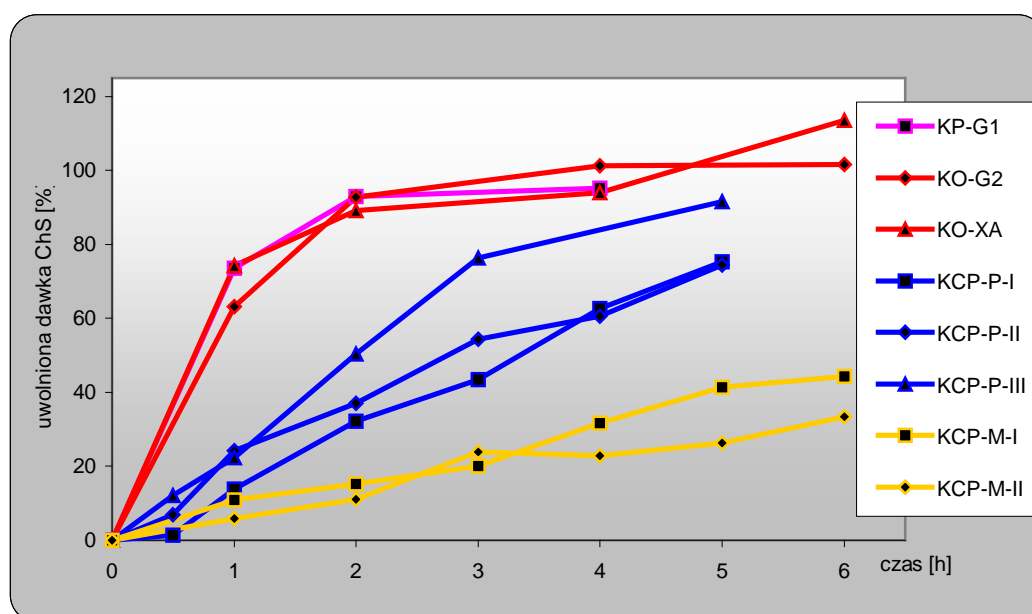
Dla otrzymanych krążków liofilizowanych, zawierających mikroziorniki ChS przeprowadzono badanie uwalniania substancji leczniczej (*Metodyka*, p. 6.3.). Wyniki badania przedstawiono w tabeli 28 oraz graficznie na ryc. 32. Dodatkowo na ryc. 33 zaprezentowano profile uwalniania ChS z peletek powlekanych i mikrosfer w porównaniu z uwalnianiem z krążków liofilizowanych zawierających te mikroziorniki.

Tab. 28. Uwalnianie ChS [% całkowitej dawki \pm sd, $n \geq 3$] z krążków liofilizowanych zawierających mikroziorniki o przedłużonym uwalnianiu (objaśnienie symboli w tabeli 27)

Rodzaj krążków	Czas [h]								
	0,5	1	2	3	4	5	6	8	24
KCP-P-I	1,4 $\pm 0,2$	13,9 $\pm 5,1$	32,2 $\pm 8,4$	43,4 $\pm 12,0$	62,6 $\pm 6,3$	75,3 $\pm 12,5$	–	84,9 $\pm 14,3$	102,1 $\pm 7,9$
KCP-P-II	7,0 $\pm 3,8$	24,3 $\pm 11,1$	37,1 $\pm 8,7$	54,4 $\pm 5,9$	60,6 $\pm 10,8$	74,4 $\pm 6,1$	–	88,7 $\pm 8,5$	109,8 $\pm 10,0$
KCP-P-III	12,1 $\pm 1,1$	22,4 $\pm 1,1$	50,4 $\pm 14,0$	76,3 $\pm 22,1$	–	91,5 $\pm 12,1$	–	92,3 $\pm 11,7$	106,5 $\pm 2,8$
KCP-M-I	–	10,9 $\pm 3,3$	15,2 $\pm 2,4$	20,0 $\pm 1,4$	31,7 $\pm 5,3$	41,4 $\pm 11,4$	44,4	–	–
KCP-M-II	–	5,8 $\pm 1,5$	11,1 $\pm 5,0$	23,9 $\pm 11,5$	22,8 $\pm 8,8$	26,3 $\pm 7,3$	33,5 $\pm 10,5$	–	38,4 $\pm 3,5$
KP-G1	–	73,5 $\pm 4,2$	92,9 $\pm 5,1$	–	95,3 $\pm 2,0$	–	90,5 $\pm 8,3$	–	93,0 $\pm 3,6$
KO-XA*	–	74,3	89,1	–	94,0	–	113,5	–	111,0
KO-G2	–	67,1 $\pm 2,1$	89,7 $\pm 2,1$	–	107,8 $\pm 10,6$	–	111,9 $\pm 12,1$	–	105,5 $\pm 7,4$

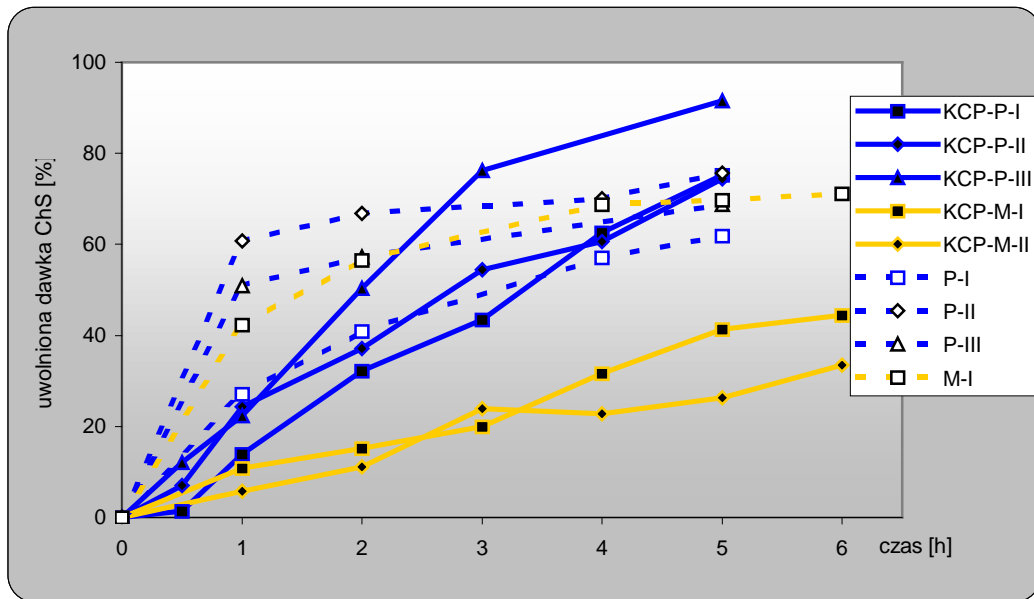
* n=2

Wyniki przedstawione na ryc. 32 wskazują, że korzystnym profilem uwalniania substancji leczniczej charakteryzują się krążki liofilizowane, których matrycę mukoadhezyjną stanowił Carbopol (po 5 h badania uwolniło się ok. 80% dawki). Tylko w przypadku peletek P-I (z grubszą otoczką) matryca mukoadhezyjna nie miała wpływu na kinetykę uwalniania (ryc. 33), natomiast po inkorporacji do matrycy krążka peletek pozostałych typów (P-II i P-III) obserwowano spadek szybkości uwalniania. Spowolnienie uwalniania było jeszcze bardziej istotne, gdy do matrycy Carbopolu wprowadzono mniejsze mikroziorniki – mikrosfery. Z krążków zawierających te mikrocząstki po 6 h badania uwolniło się jedynie ok. 40% dawki ChS.

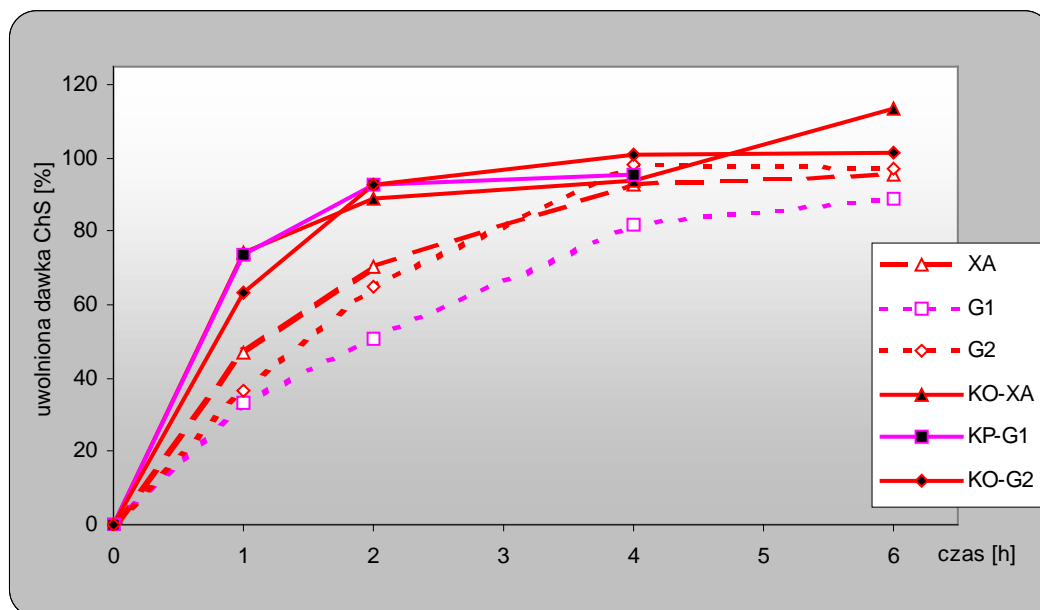


Ryc. 32. Uwalnianie ChS z krążków liofilizowanych zawierających mikroziorniki o przedłużonym uwalnianiu (objaśnienia symboli podano w tekście).

Odmienne wyniki uzyskano dla krążków, w skład których wchodził sieciowany mikrogranulat (KP-G1, KO-XA i KO-G2). Praktycznie cała dawka substancji leczniczej uwalniała się z tych form już podczas 2 h badania, mimo, że sieciowany mikrogranulat serii G1, G2 i XA charakteryzował się uwalnianiem przedłużonym (ryc. 34). Fakt, że żelowa matryca polimeru (pektyny i Orabase) nie spowolniła uwalniania ChS z mikrogranulatu, a przeciwnie przyspieszyła proces, świadczy o niekorzystnej interakcji matryc z materiałem mikroziorników wykonanych z pektyny i alginianu. Należy również zauważyć, że o niewystarczającej homogenności zawiesiny granulatu w polimerze mukoadhezyjnym lub o niewłaściwym sposobie dozowania zawiesiny, świadczą ilości uwolnionego ChS, przekraczające 100%.



Ryc. 33. Porównanie uwalniania ChS z peletek powlekanych i mikroster (linia przerywana) oraz krążków liofilizowanych Carbopolu, zawierających te mikroziorniki (linia ciągła).



Ryc. 34. Porównanie uwalniania ChS z mikrogranulatów (linia przerywana) i krążków zawierających te mikrogranulaty (linia ciągła).

Aby uzyskać bardziej korzystny profil uwalniania wprowadzono dodatkową modyfikację właściwości mikrogranulatu z ChS, powlekając jego ziarna otoczką z kopolimeru kwasu metakrylowego – Eudragitu RS (metoda koacerwacji – *Metodyka, p.*

3.4.). Aglomeracja uniemożliwiła suszenie tak powlekanego granulatu, dlatego zawieszano go, w stanie wilgotnym, w roztworze polimeru adhezyjnego odważonym na płytce Petriego (*Metodyka*, p. 5.3.3.).

Otrzymane krążki różniły się od siebie, w zależności od rodzaju użytego polimeru mukoadhezyjnego. Krążki przygotowane na bazie karmelozy sodowej (3 serie: KCn-GE) charakteryzowały się gładką powierzchnią i wykazywały kontrakcję, przez co łatwo można było wyjąć je z form. Niekorzystnie wyglądały produkty uzyskane z użyciem Orabase (KO-GE) i Pharmacoat (KHm-GE). W pierwszym przypadku, podobnie jak przy niepowlekanym granulacie, mimo wprowadzenia polimeru tworzącego otoczkę, dochodziło do reakcji między matrycą krążka a składnikami granulatu. Efektem tego oddziaływania były zmiany lepkości żelu przed liofilizacją i w konsekwencji nierówności górnej powierzchni krążków. Krążki hypromelozy charakteryzowały się natomiast niską wytrzymałością mechaniczną i dużą kruchością.

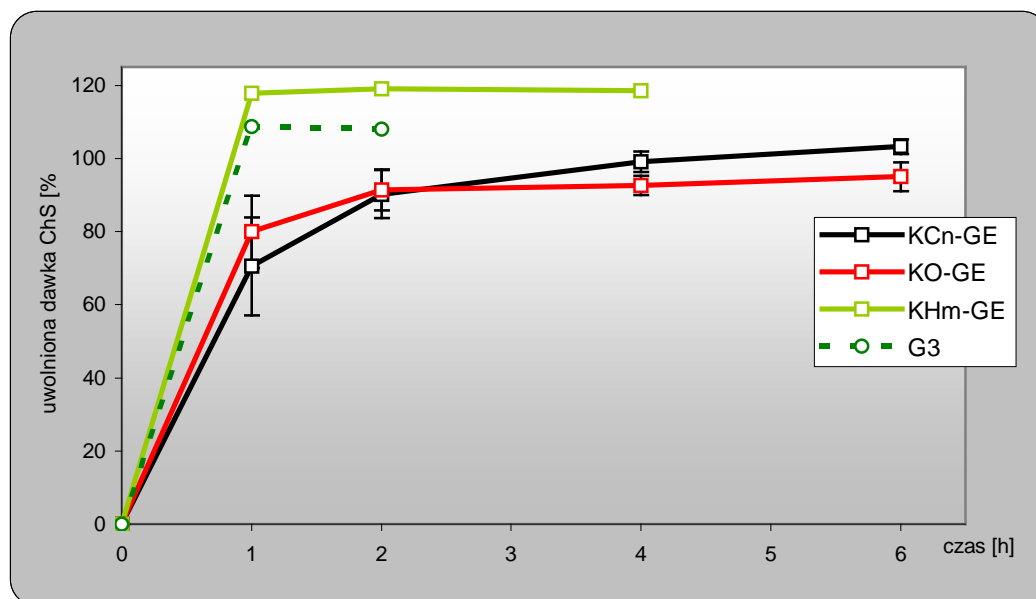
W tabeli 29 i na ryc. 35 zaprezentowano wyniki badania szybkości uwalniania ChS z krążków (o średnicy 13 mm), zawierających mikrogranulat powlekany Eudragitem RS.

Tab. 29. Uwalnianie ChS [% \pm sd, $n \geq 3$] z krążków zawierających sieciowany mikrogranulat powlekany Eudragitem RS (objaśnienia symboli podano w tekście)

Rodzaj krążka	Czas [h]			
	1	2	4	6
1KCn-GE	55,5 \pm 5,4	83,3 \pm 5,9	102,4 \pm 1,6	105,5 \pm 7,9
2KCn-GE	74,6 \pm 8,6	91,0 \pm 6,4	97,6 \pm 8,3	101,7 \pm 10,6
3KCn-GE	81,4 \pm 10,3	96,4 \pm 7,1	97,4 \pm 10,6	102,5 \pm 10,0
KO-GE	79,9 \pm 9,9	91,4 \pm 5,6	92,7 \pm 2,6	95,0 \pm 3,9
KHm-GE*	117,9	119,0	118,6	111,8

* n=2

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że nawet powlekanie mikrogranulatu sieciowanej pektyny serii G3, zaproponowaną metodą, przed zawieszeniem w matrycy mukoadhezyjnej, nie zapewnia przedłużonego uwalniania ChS z tych form. Profil uwalniania z krążków, których matrycę stanowiła hypromeloza (KHm-GE) pokrywa się z profilem uzyskanym dla mikrogranulatu przed powlekaniami (G3). Zastosowanie jako matrycy krążka karmelozy sodowej (KCn-GE) i Orabase (KO-GE) tylko nieznacznie spowolniło uwalnianie z mikrogranulatu.



Ryc. 35. Porównanie uwalniania ChS z mikrogranulatu G3 (linia przerywana) oraz krążków liofilizowanych zawierających ten mikrogranulat, powlekany Eudragitem RS (linia ciągła).

Właściwości krążków liofilizowanych zawierających zasadę selegiliny

Podjęto próbę zastąpienia w tworzonych preparatach ChS zasadą selegiliny. Na drodze alkalizacji roztworu ChS (*Metodyka*, p. 5.4.1.) otrzymywano zasadę selegiliny, która miała postać cieczy o charakterystycznym zapachu. Wydajność procesu otrzymywania zasady selegiliny wynosiła ok. 90%. Tożsamość substancji oceniano metodą HPLC.

Zawartość selegiliny w otrzymanej oleistej cieczy, oznaczona metodą HPLC (*Metodyka*, p. 7.2.) wynosiła 102,7%.

Czystość otrzymanej zasady selegiliny potwierdzono w badaniach zawartości jonów chlorkowych i wody, przeprowadzonych przez Zespół Preformulacji Zakładów Farmaceutycznych „Polpharma S.A.” w Starogardzie Gdańskim. Zawartość jonów Cl^- oznaczano metodą chromatografii jonowej, stosując detektor konduktometryczny [112], natomiast zawartość wody oznaczono przez miareczkowanie metodą Karla Fischera. W warunkach analizy nie stwierdzono obecności jonów Cl^- w badanej próbce (granica wykrywalności: 0,05 ppm), natomiast zawartość wody wynosiła 0,8%.

Uzyskaną zasadę selegiliny wykorzystywano do tworzenia 2 typów krążków liofilizowanych: zawierających zasadę selegiliny w formie wolnej (*Metody*, p. 5.4.2.) lub zamkniętą w mikrokapsułkach z etylocelulozy, tworzonych „in situ” w matrycy hydrożelowej (*Metodyka*, p. 5.4.3.).

W wyniku wprowadzenia zasady selegiliny do roztworu polimeru hydrofilowego (1% Carbopolu lub 2% hydroksyetylocelulozy) uzyskano homogenną dyspersję, z której po liofilizacji otrzymano krążki: SKCP-I i SKCP-II (matryca wykonana z CP) i SKHc (matryca wykonana z HEC). Krążki charakteryzowały się odpowiednią wytrzymałością mechaniczną, ale podobnie jak w badaniach z ChS powierzchnia krążków z Carbopolu była nierówna, co wynikało z konsystencji żelu przed liofilizacją. Skład i właściwości krążków podano w tabeli 30.

Tab. 30. Właściwości krążków liofilizowanych (średnica 13 mm) zawierających zasadę selegiliny w formie wolnej lub w mikrokapsułkach z etylocelulozy

Rodzaj krążka [▲]	Właściwości krążka			Skład krążka				
	Masa [mg]	Gęstość [mg/cm ³]	Wysokość [mm]	Zasada selegiliny			EC [mg]	Polimer tworzący matrycę [mg]
				* [mg]	**	***		
Zasada selegiliny								
SKCP-I	22,6 ± 1,5	24,3	7	9,2	11,0	83,6	–	13,4 ^C
SKCP-II	26,6 ± 3,8	28,6		14,1	27,7	50,9	–	12,5 ^C
SKHc	14,3 ± 0,4	25,3	5	0,3	11,0	2,7	–	14,0 ^H
Mikrokapsułki etylocelulozy z zasadą selegiliny (1:1)								
SKHc-EC1-I	104,3 ± 2,8	60,4	12 – 13	11,2	36,0	31,1	48,6	44,5 ^H
SKHc-EC1-II	147,9 ± 26,4	85,7		31,7	60,0	52,8	79,3	36,9 ^H
Mikrokapsułki etylocelulozy z zasadą selegiliny (2:1)								
SKCP-EC	40,2 ± 3,1	60,6	12 – 13	4,3	10,6	40,6	25,0	10,9 ^C
SKHc-EC2-I	105,1 ± 10,6	60,9		10,5	23,0	45,7	52,6	42,0 ^H
SKHc-EC2-II	141,5 ± 2,9	82,0		19,4	37,0	52,4	70,4	51,7 ^H

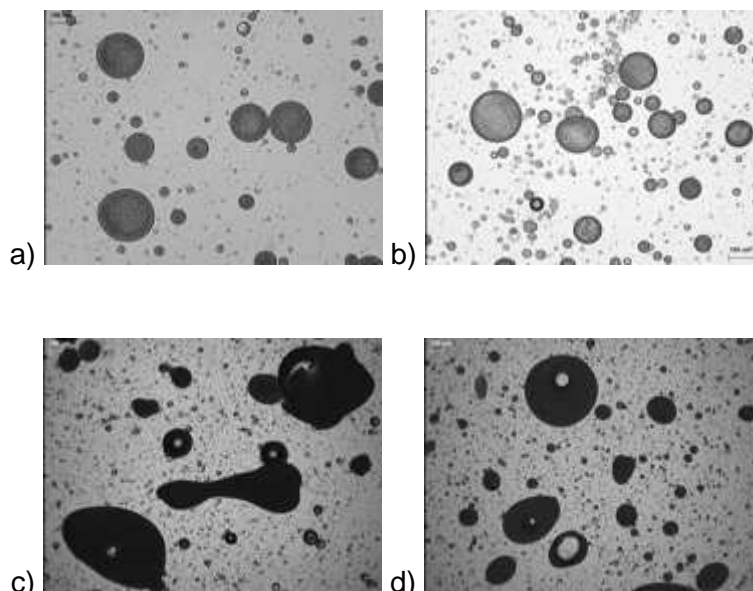
[▲] – objaśnienia – *Metodyka*, p. 5.4.

* – zawartość oznaczona analitycznie, ** – zawartość teoretyczna [mg], *** – zawartość w odniesieniu do teoretycznej [%]

^C – Carbopol, ^H – Hydroksyetyloceluloza

W celu otrzymania krążków zawierających zasadę selegiliny w mikrozbiorach, do roztworu CP i HEC wprowadzano roztwór (w chlorku metylenu) tej substancji leczniczej z etylocelulozą (w stosunku 1:1 lub 1:2). Obserwacje mikroskopowe uzyskanych układów wykazały, że zastosowanie mieszadła łopatkowego przy wprowadzaniu roztworu chlorku metylenu do 2% roztworu HEC zapewnia utworzenie homogennej i trwałej dyspersji o wielkości cząstek poniżej 200 μm (ryc. 36 a, b). Zastosowanie mieszadła łopatkowego przy sporządzaniu analogicznej dyspersji (w stosunku 2:1) z 1% roztworem Carbopolu okazało się niemożliwe. W obrazie mikroskopowym tworzonego układu obserwowano duże nieregularne, często silnie wydłużone cząstki (ryc. 36 c) i z tego powodu zdecydowano o zmianie sposobu mieszania przy sporządzaniu tej formacji. Zastosowanie mieszadła typu Ultra-Turrax zapewniało co prawda lepszą homogenność układu i utworzenie zawiesiny sferycznych cząstek, ale ich wielkość była zbyt duża, nawet do 500 – 700 μm (ryc. 36 d), dlatego dalsze modyfikacje składu dotyczyły wyłącznie układów zawierających HEC.

Krążki zawierające mikrokapsułki z zasadą selegiliny charakteryzowały się dobrymi właściwościami mechanicznymi. Z powodu obecności w ich składzie etylocelulozy, krążki te posiadały większą gęstość, niż krążki z substancją leczniczą w postaci wolnej.



Ryc. 36. Obraz mikroskopowy roztworu EC i zasady selegiliny w chlorku metylenu zdyspergowanego w 2% roztworze HEC (mieszadło łopatkowe): (a) w stosunku 2:1, (b) w stosunku 1:1 oraz w 1% Carbopolu w stosunku 2:1: (c) mieszadło łopatkowe lub (d) mieszadło Ultra-Turrax (znacznik skali=100 μm).

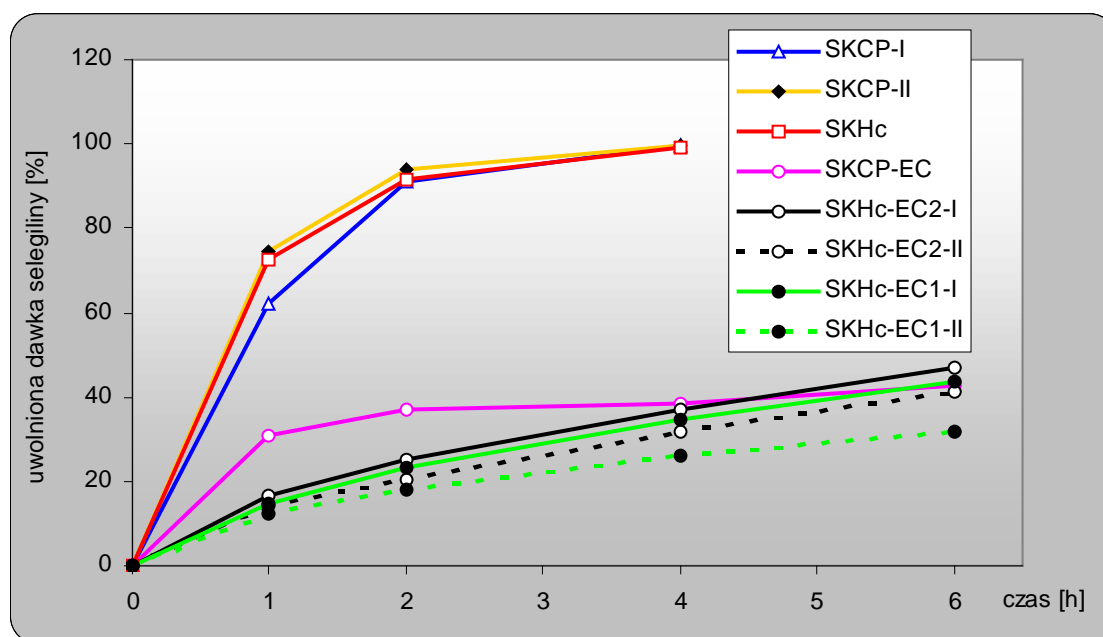
Przedstawione w tabeli 30 dane dotyczące składu krążków wskazują, że w wyniku liofilizacji układów dyspersyjnych zawierających zasadę selegiliny w formie wolnej, dochodziło do utraty substancji leczniczej, związanej z jej sublimacją w warunkach procesu liofilizacji. Największy spadek zawartości selegiliny (o ok. 97% w stosunku do wartości teoretycznej) dotyczył krążków wykonanych z hydroksyetylocelulozy typu SKHc, dla których oznaczona zawartość substancji leczniczej wynosiła jedynie 0,3 mg, zamiast 11,0 mg (wartość teoretyczna). Tak dużych strat substancji leczniczej podczas sublimacji nie notowano w przypadku stosowania Carbopolu jako matrycy krążka, a straty te były tym mniejsze, im mniejsza była ilość selegiliny wprowadzana do roztworu polimeru mukoadhezyjnego przed suszeniem i wynosiły ok. 50% dla krążków SKCP-II oraz 16% w przypadku krążków SKCP-I.

Wprowadzenie do matrycy krążka, wykonanego z HEC, zasady selegiliny zamkniętej w otoczce mikrokapsułek z etylocelulozy, pozwalało na ograniczenie ubytku substancji leczniczej, ale mimo to jej straty były istotne i wynosiły zazwyczaj ok. 50%. Wyjątek stanowiły tylko krążki typu SKHc-EC1-I, które w trakcie suszenia traciły ok. 68% dawki substancji leczniczej. Zauważono, że w trakcie liofilizacji z powierzchni płytki (ok. 24 cm²) dochodziło do sublimacji zawsze określonej, podobnej ilości selegiliny (ok. 300 mg w przypadku suszenia dyspersji z mikrokapsułkami 1:1 oraz ok. 150 mg w przypadku dyspersji z mikrokapsułkami 2:1), co wskazuje na możliwość zatrzymywania (wiązań) selegiliny przez etylocelulozę, tym większą im większy jest udział polimeru w składzie krążka. Zawartość selegiliny w krążkach z mikrokapsułkami wzrastała także przy wprowadzaniu do roztworu HEC dwukrotnie większej objętości roztworu etylocelulozy z zasadą selegiliny (SKHc-EC1-II i SKHc-EC2-II). Największą zawartością substancji leczniczej (31,7 mg) charakteryzowały się krążki typu SKHc-EC2-II, zawierające mikrokapsułki przygotowane z zasady selegiliny i etylocelulozy w stosunku 1:1.

Badanie dostępności farmaceutycznej zasady selegiliny z krążków zawierających formę wolną substancji lub mikrokapsułki, prowadzono stosując jako płyn akceptorowy bufor fosforanowy pH 7,4 (*Metodyka*, p. 6.3.). Wyniki badania zebrano w tabeli 31 i zaprezentowano graficznie na ryc. 37.

Tab. 31. Uwalnianie zasady selegiliny z krążków liofilizowanych [% uwolnionej dawki]

Rodzaj badanych krążków	Czas [h]				
	1	2	4	6	24
Zasada selegiliny w hydrożelu					
SKCP-I	62,3 ± 15,7	90,8 ± 4,3	99,6 ± 7,4	95,1 ± 8,2	–
SKCP-II	74,3 ± 11,6	93,9 ± 2,7	99,6 ± 5,9	92,1 ± 1,3	89,6 ± 2,2
SKHc	72,6 ± 9,3	91,5 ± 9,5	99,2 ± 12,6	92,0 ± 14,0	82,5 ± 11,5
Mikrokapsułki (etyloceluloza : zasada selegiliny 1:1)					
SKHc-EC1-I	14,7 ± 3,1	23,0 ± 4,4	34,6 ± 5,6	43,9 ± 6,7	72,0 ± 11,8
SKHc-EC1-II	12,3 ± 2,0	18,2 ± 2,2	26,2 ± 2,8	31,8 ± 3,6	53,6 ± 7,3
Mikrokapsułki (etyloceluloza : zasada selegiliny 2:1)					
SKCP-EC	30,9 ± 7,4	37,2 ± 5,5	38,4 ± 8,6	42,7 ± 14,4	38,7 ± 7,6
SKHc-EC2-I	16,8 ± 3,8	25,3 ± 5,8	37,1 ± 7,1	46,9 ± 7,5	68,6 ± 13,4
SKHc-EC2-II	14,2 ± 0,7	20,4 ± 0,9	31,7 ± 5,0	41,3 ± 8,7	60,5 ± 7,6

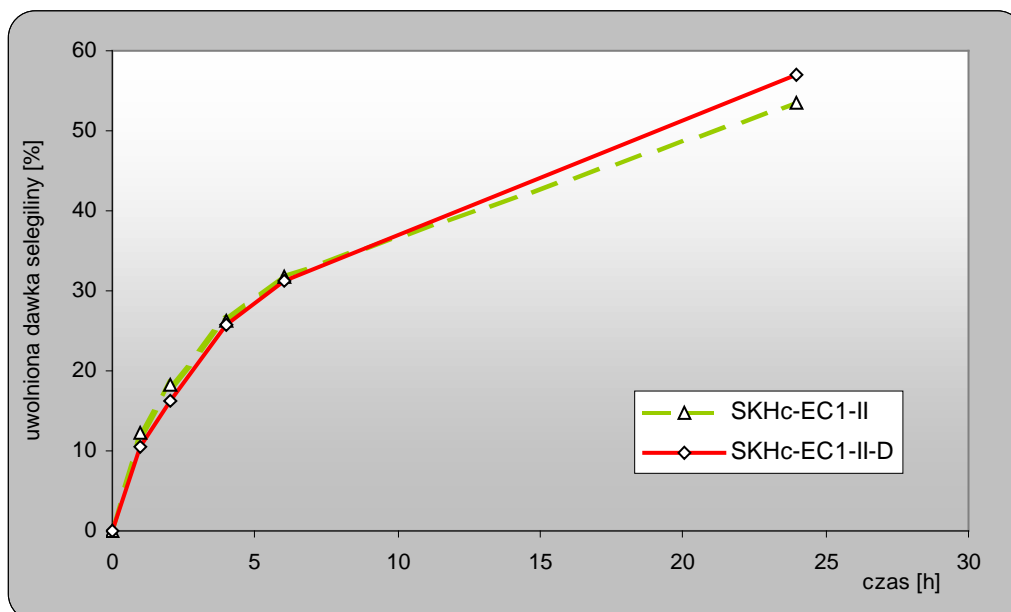


Ryc. 37. Uwalnianie zasady selegiliny z krążków liofilizowanych.

Profile uwalniania zasady selegiliny uzyskane dla 3 rodzajów krążków zawierających substancję leczniczą w formie wolnej, były niezależnie od dawki substancji leczniczej oraz rodzaju polimeru budującego matrycę krążka. W 1 h badania z tych krążków uwolniło się średnio od 62,3% (SKCP-I) do 74,3% (SKCP-II) zawartej dawki selegiliny, natomiast w 2 h wartości te przekroczyły 90%, co wskazuje, że matryca polimerowa, bez dodatkowej modyfikacji składu krążka nie zapewnia przedłużonego uwalniania zasady selegiliny.

Krażki zawierające mikrokapsułki z zasadą selegiliny charakteryzowały się przedłużonym uwalnianiem substancji leczniczej. Z krążka typu SKCP-EC, którego matrycę stanowił Carbopol, z nieznanymi przyczynami uwalnianie substancji leczniczej zostało zahamowane po 2 h, gdy uwolniło się tylko ok. 40% dawki. Kinetyka uwalniania z krążków HEC zawierających mikrokapsułki etylocelulozy z zasadą selegiliny była podobna dla wszystkich badanych układów. Nie obserwowano istotnych różnic w profilu uwalniania pomiędzy krążkami zawierającymi mikrosfery o różnym udziale EC i selegiliny (SKHc-EC1-I i SKHc-EC2-I), natomiast wzrost udziału EC w masie krążków, związany z wprowadzeniem dwukrotnie większej ilości składników budujących mikrokapsułki, powodował dalszy spadek szybkości uwalniania (krążki SKHc-EC1-II i SKHc-EC2-II). Przez 24 h z krążków zawierających mikrokapsułki z etylocelulozy uwolniło się średnio od ok. 54% (SKHc-EC1-II) do ok. 72% (SKHc-EC1-I) dawki selegiliny.

W celu określenia wpływu zmiany kształtu krążka na szybkość uwalniania selegiliny, niektóre z krążków (m. in. typu SKHc-EC1-II) zawierających mikrokapsułki przed badaniem zgniatano odważnikiem 500 g, symulując nacisk w trakcie aplikacji. Okazało się, że zmiana geometrii krążka spowodowana jego prasowaniem nie wpływała na szybkość uwalniania zasady selegiliny (ryc. 38).



Ryc. 38. Wpływ geometrii krążka na szybkość uwalniania zasady selegiliny z krążka liofilizowanego typu SKHc-EC1-II (D – krążek prasowany).

Przenikanie selegiliny przez błonę śluzową policzka świni

Badanie przenikania selegiliny przez błonę śluzową policzka świni przeprowadzono dla następujących form, zawierających chlorowoderek lub zasadę tej substancji leczniczej (*Metodyka*, p. 6.4.):

- roztwór wodny chlorowodoru selegiliny,
- roztwór zasady selegiliny w makroglu 600,
- dyspersja zasady selegiliny w 2% roztworze HEC,
- krążek zawierający roztwór ChS (KCn-ChS i KO-ChS) lub powlekany mikrogranulat sieciowanej pektyny z ChS (KCn-GE),
- krążek zawierający zasadę selegiliny w matrycy CP (SKCP-I),
- krążek zawierający mikrosfery etylocelulozy z zasadą selegiliny typu: SKHc-EC1-II.

Niezależnie od postaci i formy selegiliny na powierzchnię błony śluzowej nanoszono ilość preparatu zawierającą ok. 5 mg selegiliny (w przeliczeniu na chlorowoderek). Wyniki przenikania uzyskane dla poszczególnych układów (w przeliczeniu na chlorowoderek) zebrano w tabeli 32 i przedstawiono graficznie na ryc. 39.

Tab. 32. Przenikanie selegiliny z roztworu, dyspersji i krążków liofilizowanych (objaśnienia symboli w tekście) przez błonę śluzową policzka świni [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$, $\bar{X} \pm \text{sd}$]

Badana postać**		Czas [h]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Forma selegiliny: chlorowodorek									
Roztwór (n=8)	W	–	9,1 ± 4,5	13,1 ± 4,3	14,0 ± 4,9	16,6 ± 5,8	19,7 ± 6,5	19,4 ± 8,5	22,5 ± 10,2
KCn-ChS (n=3)	W	–	8,1 ± 2,5	10,8 ± 3,6	11,8 ± 3,2	12,7 ± 1,3	14,3 ± 0,7	15,1 ± 2,1	18,2 ± 1,8
KO-ChS (n=4)	W	–	7,0 ± 1,4	7,2 ± 1,0	7,2 ± 0,6	7,3 ± 0,9	7,7 ± 1,2	7,1 ± 1,7	8,3 ± 1,7
KCn-GE (n=4)	M	–	4,9 ± 1,2	6,1 ± 1,0	7,4 ± 2,3	8,4 ± 1,7	9,7 ± 3,0	11,2 ± 4,3	12,8 ± 5,2
Forma selegiliny: zasada									
Roztwór (n=2)*	W	6,6 ± 0,2	8,1 ± 0,6	–	10,1 ± 0,3	–	12,3 ± 0,4	–	17,0 ± 1,2
Dyspersja (n=3)	W	10,6 ± 1,9	25,0 ± 1,8	–	38,9 ± 3,8	–	42,2 ± 1,4	–	49,9 ± 3,0
SKCP-I (n=2)*	W	7,8	22,3 ± 0,7	–	33,8 ± 4,7	–	39,6 ± 7,8	–	47,4 ± 4,9
SKHc-EC1-I (n=5)	M	7,2 ± 0,6	14,7 ± 3,8	–	22,5 ± 4,5	–	27,8 ± 5,3	–	32,1 ± 8,5

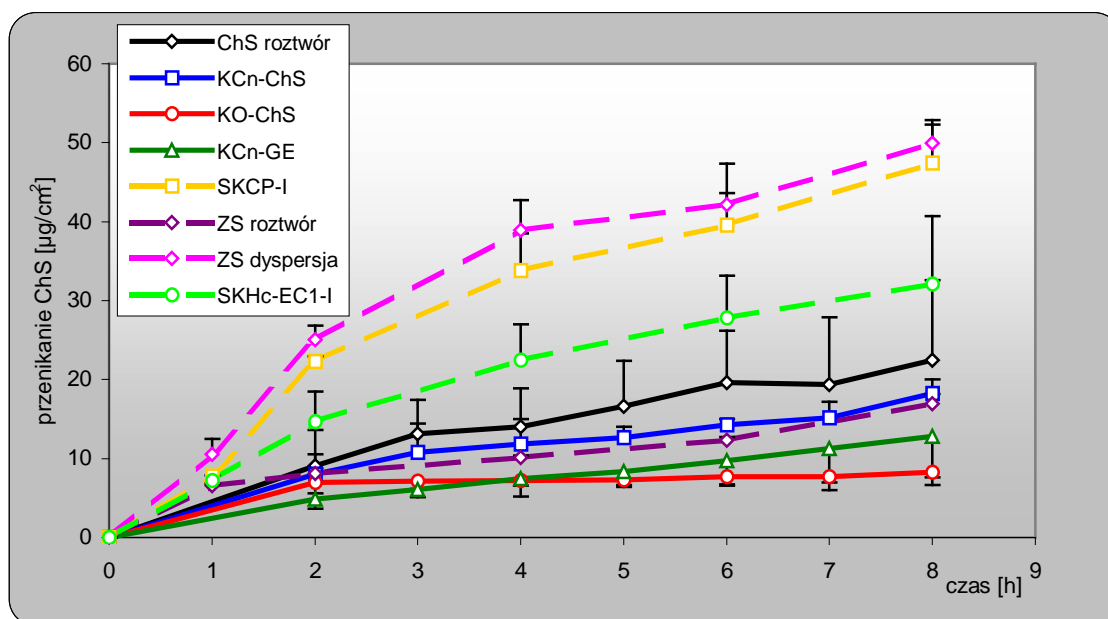
* - podano $\bar{X} \pm r$, gdzie r = rozrzut

** - W – preparat z niemodyfikowaną formą selegiliny, M – krążki z mikroziarnikami z selegiliną

Uzyskane wyniki wskazują, że o intensywności przenikania selegiliny przez błonę śluzową policzka decyduje forma tej substancji leczniczej – ChS przenika słabiej niż zasada selegiliny. Największą szybkością przenikania chlorowodoru selegiliny, spośród wszystkich badanych układów zawierających tę formę substancji leczniczej, obserwowano dla roztworu wodnego. Niewiele mniejszą szybkość przenikania oznaczono dla krążka liofilizowanego zawierającego ChS, zbudowanego z karmelozы sodowej (KCn-ChS), natomiast wprowadzenie do tej samej matrycy mukoadhezyjnej mikrogranulatu z ChS (KCn-GE) spowodowało spowolnienie procesu przenikania.

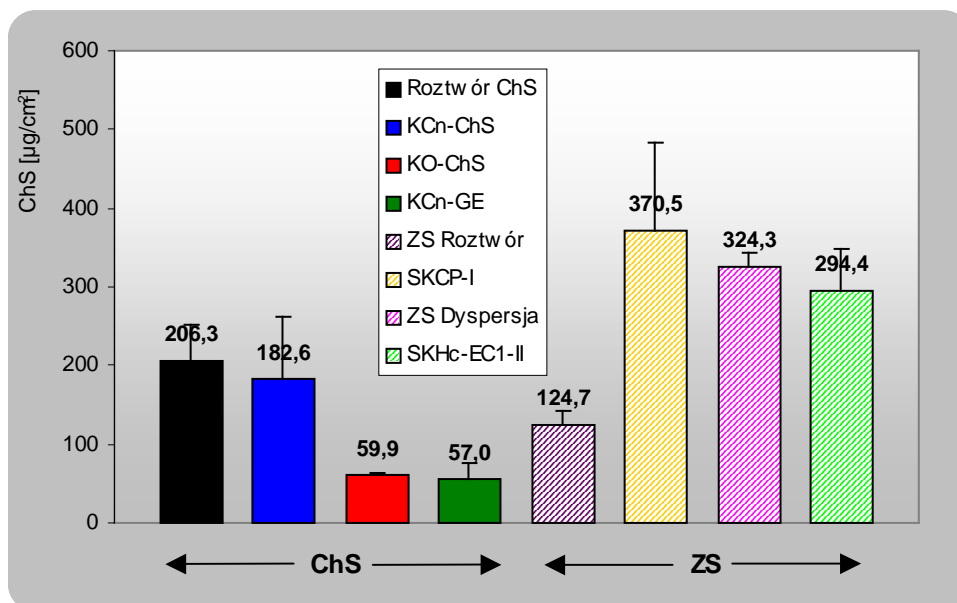
Podobny profil szybkości przenikania selegiliny przez błonę śluzową policzka uzyskano dla roztworu zasady selegiliny w makroglu, chociaż spodziewano się, że wzrost lipofilowości substancji zwiększy przenikanie. Małe przenikanie przez błonę

śluzową z tego układu wynika z bardzo dobrej rozpuszczalności selegiliny w makrogolu i niekorzystnego współczynnika podziału rozpuszczalnik/błona śluzowa. Efekt promocji wchłaniania uzyskano natomiast, gdy zasada selegiliny (w formie wolnej) znajdowała się w krążku Carbopolu (SKCP-I) lub w żelu z hydroksyetylocelulozy, w których to układach nie rozpuszczając się tworzyła dyspersję. Inkorporowanie do krążka z HEC mikrokapsulek z zasadą selegiliny spowodowało spowolnienie przenikania w stosunku do obserwowanego dla „wolnej” zasady, ale przenikanie było większe niż w przypadku układów zawierających ChS.



Ryc. 39. Przenikanie selegiliny (ZS – zasady lub ChS – chlorowodoru) z roztworu, dyspersji i krążków liofilizowanych przez błonę śluzową policzka świni (objaśnienia symboli – tab. 32).

Ilość selegiliny przenikająca w czasie 8 h badania do błony śluzowej, wykrywana na drodze 2-etapowej (36-godzinnej) ekstrakcji przedstawiona została na ryc. 40. Największa ilość selegiliny (zasady) uległa przenikaniu z krążka Carbopolu, dyspersji w 2% roztworze HEC oraz krążka z mikrokapsułkami (odpowiednio 370,5 µg, 324,3 µg i 294,4 µg). Chlorowodorek selegiliny przenikał w największej ilości do błony śluzowej z roztworu oraz krążka typu KCn-ChS. W obu przypadkach ekstrahowano z błony śluzowej ok. 180 – 210 µg ChS. Znacznie mniejsze ilości selegiliny oznaczano w błonie śluzowej po przenikaniu z roztworu zasady selegiliny (ok. 125 µg) oraz krążków KO-ChS i KCn-GE (57 – 60 µg).



Ryc. 40. Ilość selegiliny oznaczona w błonie śluzowej po 8 h przenikania substancji (ChS – chlorowodorek selegiliny, ZS – zasada selegiliny) z różnych nośników.

Uzyskane wyniki wskazują, że niezależnie od postaci leku, ilość ChS przenikająca przez błonę śluzową jest niewielka i stanowi tylko do 0,4% całkowitej dawki substancji zawartej w aplikowanym preparacie. Ilości wykrywane w błonie śluzowej po ekstrakcji stanowią od 0,6% (krążek Orabase – KO-ChS) do 2,2% (roztwór ChS). Tak małe przenikanie należy tłumaczyć stopniem dysocjacji selegiliny. Przenikanie następowało ze środowiska o pH 5,4. Biorąc pod uwagę pK_a selegiliny (7,5) można obliczyć, że w tym pH tylko 0,7% jest w postaci niezdisocjowanej, zdolnej do przenikania przez błony biologiczne.

Zmiana formy selegiliny na zasadę spowodowała ponad dwukrotne zwiększenie przenikania substancji leczniczej przez błonę śluzową policzka świni. W tym przypadku ilości selegiliny wykrywane w błonie śluzowej, po 8 h aplikacji, stanowiły 4 – 5% dawki substancji leczniczej zawartej w tych formach.

V. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Prezentowane badania dotyczą możliwości opracowania nowej formy farmaceutycznej selegiliny – bioadhezyjnego liofilizatu dopoliczkowego, charakteryzującego się przedłużonym uwalnianiem tej substancji leczniczej. Założono w pracy, że nowy preparat będzie miał postać liofilizowanego krążka. Krążek po aplikacji na błonę śluzową policzka, dzięki obecności polimeru mukoadhezyjnego (stanowiącego matrycę krążka), powinien utrzymywać się w miejscu podania przez kilka godzin (4–6) i uwalniać przez ten czas substancję leczniczą. Opracowywana postać farmaceutyczna, w odróżnieniu od istniejących na rynku doustnych form ChS, powinna charakteryzować się przedłużonym uwalnianiem substancji leczniczej, która ma wchłaniać się przez błonę śluzową policzka do krwiobiegu. Umożliwi to znaczną redukcję metabolizmu wątrobowo – jelitowego selegiliny, a tym samym pozwoli na obniżenie dawki substancji leczniczej z zachowaniem skuteczności terapeutycznej (patrz str. 43). Założono, że szybkość uwalniania selegiliny z postaci leku powinna być niezależna od właściwości matrycy mukoadhezyjnej krążka, a regulowana jedynie przez zastosowanie odpowiednich mikroziorników substancji leczniczej, inkorporowanych w liofilizacie.

Prace nad otrzymaniem mikroziorników zawierających selegilinę, charakteryzujących się przedłużonym uwalnianiem substancji leczniczej dotyczyły takich form jak: peletki powlekane, mikrokapsułki, mikrosfery oraz sieciowany mikrogranulat. Aby uzyskać odpowiednie profile uwalniania substancji leczniczej, przy sporządzaniu tych form korzystano z polimerów nierozpuszczalnych w wodzie np.: etylocelulozy, kopolimerów kwasu metakrylowego oraz polimerów sieciowanych. Najczęściej formowano mikroziorniki i inkorporowano je do matrycy polimerowej w osobnych procesach, lecz poza tym przygotowano także krążki zawierające mikrokapsułki etylocelulozy z zasadą selegiliny tworząc je „in situ”, w trakcie etapu liofilizacji krążka mukoadhezyjnego. Badania nad otrzymywaniem krążków liofilizowanych prowadzono dla dwóch form selegiliny: chlorowodoru oraz zasady.

Mimo jasno określonego celu badań, nie ograniczono się tylko do poszukiwań ostatecznej postaci aplikacyjnej, ale każdy z etapów projektu starano się realizować możliwie szeroko, traktując selegilinę jako substancję modelową (z tego też powodu korzystano z dwóch różnych form selegiliny o odmiennych właściwościach fizykochemicznych – chlorowodoru i zasady). Takie postępowanie umożliwiło lepsze poznanie specyfiki tworzenia doustnych form w procesie liofilizacji i rozwijało wiedzę na temat możliwości wykorzystania tej techniki suszenia ochronnego do opracowania w

przyszłości matryc zawierających inkorporowane preparaty peptydowe (biotechnologiczne).

Wybór polimeru mukoadhezyjnego stanowiącego matrycę krążka

Badania nad opracowaniem nowej dopoliczkowej formy charakteryzującej się przedłużonym uwalnianiem selegiliny rozpoczęto od doboru polimeru mukoadhezyjnego, który stanowiąc matrycę krążka liofilizowanego zapewniałby odpowiednie utrzymanie formy w miejscu aplikacji. Do badań wytypowano następujące polimery hydrofilowe: karbomer (Carbopol 974P), pektynę, alginian sodu, karmelozę sodową, hydroksyetylocelulozę, Gantrez MS 955 (mieszanka soli sodowej i wapniowej kopolimeru kwasu maleinowego oraz eteru winylo-metylowego) oraz mieszaninę 3 polimerów (żelatyny, karmelozy sodu i pektyny) występującą w preparacie handlowym o nazwie Orabase [113]. Wszystkie oceniane polimery posiadają uznane właściwości adhezyjne, udokumentowane w licznych publikacjach [20, 24, 65, 70], jednakże brakuje w piśmiennictwie informacji na temat możliwości wykorzystania tych substancji w tworzeniu dopoliczkowych form liofilizowanych.

Krążki liofilizowane placebo otrzymywano przez suszenie sublimacyjne roztworów wodnych wymienionych polimerów, po uprzednim rozdozowaniu do gniazd blistrów. Chociaż opracowywana postać leku miała mieć formę liofilizatu doustnego, badania mukoadhezji przeprowadzono nie tylko dla formy liofilizowanego krążka, ale także dodatkowo dla dwóch innych potencjalnych postaci leku – żeli oraz dysków prasowanych (tabletkowanych). Oceniano w ten sposób wpływ postaci farmaceutycznej polimeru na jego właściwości mukoadhezyjne.

Badania mukoadhezji w warunkach *in vitro* prowadzono przy użyciu analizatora tekstury wyposażonego w przystawkę A/Muc zapewniającą wykonanie testów w środowisku zbliżonym do fizjologicznego. Niestety, mimo dużej popularności pomiarów tensometrycznych w określaniu właściwości mukoadhezyjnych polimerów, w dalszym ciągu brak jest standardowych procedur prowadzenia tego typu analiz. Konieczna więc była optymalizacja metodyki badania polegająca na doborze takich parametrów jak: sposób zwilżania badanego materiału, szybkość przesuwania głowicy pomiarowej, czas trwania i siła docisku (tabela 19). Aby uprościć model badawczy, zrezygnowano z używania naturalnej błony śluzowej i zastąpiono ją warstwą żelatyny lub dyskiem celulozowym nasączonym 10% roztworem mucyny [31, 32, 39–43]. Do odpowiedniego mocowania tych warstw w przystawce A/Muc, używano kleju cyjanoakrylowego lub dwustronnej taśmy klejącej [31, 41].

Korzystając z analizatora tekstury, wykonano w sumie ponad 500 pomiarów mukoadhezji (dla każdego badanego układu co najmniej 6 powtórzeń), dzięki czemu

możliwe było potwierdzenie przydatności zaproponowanego modelu badawczego i opracowanie odpowiedniej metody analizy danych pomiarowych. Wyniki badania przedstawiano graficznie jako zależność pomiędzy siłą odrywania polimeru od substytutu błony śluzowej i czasem trwania testu, a dzięki zastosowaniu odpowiedniego oprogramowania wyliczano pracę mukoadhezji (wyrażoną w μJ), która w sposób ilościowy określała właściwości polimerów. Ponieważ w literaturze fachowej nie znaleziono wytycznych dotyczących matematycznej analizy danych pomiarowych, w obliczeniach korzystano z dwóch opracowanych wzorów, uwzględniających różne profile krzywych uzyskanych w trakcie badania (str. 73).

Analizując uzyskane wyniki (tabela 25) zaobserwowano, że zarówno postać farmaceutyczna polimeru, jak również rodzaj warstwy naśladowującej naturalną błonę śluzową, mają wpływ na mierzone wartości pracy mukoadhezji. Wartości najniższe uzyskano dla roztworów polimerów, natomiast znacznie silniej z błoną śluzową wiązały się polimery w formie preparatów stałych (dysków prasowanych oraz krążków liofilizowanych). Co ciekawe, mimo że masa polimeru mukoadhezyjnego użytego do przygotowania dysków prasowanych, a w konsekwencji gęstość dysku, była od ok. 4 do nawet 25 razy większa niż masa liofilizowanych krążków polimerowych placebo, to właśnie forma liofilizatu zapewniała najsilniejszą mukoadhezję polimeru do błony śluzowej w zaproponowanych warunkach badania *in vitro*. Prawdopodobnie tak korzystne właściwości krążków wynikały z wewnętrznej struktury liofilizatu, którą charakteryzuje duża porowatość i silna higroskopijność. Cechy te zapewniały dobre zwilżenie preparatu, a także szybką hydratację łańcuchów polimeru, dzięki czemu możliwe było natychmiastowe, trwałe połączenie krążków liofilizowanych z błoną śluzową. Wyższe wartości pracy mukoadhezji krążków liofilizowanych uzyskano dla modelu wykorzystującego 10% roztwór mucyny, co prawdopodobnie wynikało z interakcji pomiędzy łańcuchami badanych polimerów i mucyny.

Aby ocenić wpływ pH roztworu polimeru poddawanego suszeniu sublimacyjnemu na jego właściwości adhezyjne, przygotowano roztwory Carbopolu i pektyny o wzrastającej wartości pH od 3 do 6. Okazało się, że alkalizacja roztworu Carbopolu umożliwia uzyskanie liofilizatów o lepszych właściwościach mechanicznych, w przeciwieństwie do form otrzymanych z pektyny. Im wyższe było pH roztworu pektyny poddawanego liofilizacji, tym niższa była wytrzymałość i gorsza jakość sporządzonych krążków. Nie udało się natomiast jednoznacznie określić, czy pH roztworu polimeru i otrzymanego z tego roztworu krążka decyduje o właściwościach adhezyjnych tych preparatów. Co prawda wzrost pH krążka Carbopolu z pH 3 do pH 6 spowodował 2-krotny wzrost wartości pracy adhezji mierzonej z udziałem warstwy mucyny (tabela 25), ale nie potwierdziły tego wyniki uzyskane przy pomiarach z

warstwą żelatyny. Dodatkowo, na przykładzie krążków wykonanych z tych dwóch polimerów badano, czy wstępne prasowanie, naśladujące warunki aplikacji, wpływa na siłę ich adhezji do błony śluzowej. Wykazano, że zmiana kształtu, spowodowana prasowaniem krążków, niezależnie od materiału stanowiącego matrycę, nie ma wpływu na ich właściwości adhezyjne (ryc. 26). Interesujące były także wyniki pracy mukoadhezji oznaczone dla krążków Carbopolu, w matrycy których inkorporowano celetki o wielkości 200 – 300 μm . Okazało się, że wprowadzenie mikroziarników do składu krążka, prawdopodobnie z powodu zmiany struktury wewnętrznej liofilizatu, zapewniało wzrost jego adhezji tym większy, im większy był udział cząstek w krążku (ryc. 27).

Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że analizator tekstury wyposażony w przystawkę A/Muc jest cennym narzędziem badawczym w oznaczaniu, w warunkach *in vitro*, mukoadhezyjnych właściwości polimerów. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było określenie grupy polimerów wyróżniających się wysokimi wartościami pracy mukoadhezji, niezależnie od tego, jaką nadano im postać farmaceutyczną (tabela 25). Do grupy tej należały: karmeloza sodowa, Carbopol oraz mieszanina Orabase, których dobre właściwości adhezyjne opisano także w piśmiennictwie [22, 39, 64, 67, 113, 114]. Te polimery, a także hydroksyetylocelulozę, wykazującą bardzo dobre właściwości adhezyjne w formie liofilizowanej, wykorzystywano w dalszych badaniach, opracowując ostateczną formę aplikacyjną.

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych w warunkach *in vitro*, krążki liofilizowane Carbopolu (otrzymane z roztworu o pH 3 i pH 6) oraz krążki Orabase (placebo), badano także w warunkach *in vivo* na 5 ochotnikach, którzy umieszczali je w jamie ustnej, w przestrzeni między górnym łukiem zębów a policzkiem (badanie miało charakter próbny i nie zostało opisane w pracy). Badane formy wykazywały bardzo dobrą adhezję do błony śluzowej, natomiast tylko w przypadku krążków Carbopolu o pH 3, ochotnicy skarżyli się na nieprzyjemny – kwaśny smak tej postaci. Prawdopodobnie z tego powodu wzrastała produkcja i przepływ śliny w jamie ustnej i przez to formy te ulegały rozpuczeniu lub rozpadowi już po ok. 30 min. Czas przebywania krążków pozostałych typów w miejscu aplikacji był znacznie dłuższy i wynosił ok. 2 h w przypadku krążków alkalizowanego Carbopolu i nawet ok. 6 h dla krążków Orabase, co potwierdziło celowość używania polimerów, wytypowanych w badaniu *in vitro*, w dalszych etapach pracy.

Sporządzenie krążków zawierających roztwór ChS

Po wyłonieniu polimerów o dobrych właściwościach adhezyjnych, a jednocześnie tworzących liofilizaty o zadowalających właściwościach mechanicznych, wykonano z ich udziałem matryce krążków, do których wprowadzano substancję leczniczą. Początkowo badania dotyczyły chlorowodoru selegiliny, który jako substancja bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie (>1 g/ml), bez trudu rozpuszczano w roztworach polimerów hydrofilowych przed liofilizacją. W ten sposób ChS (w formie „wolnej” substancji) inkorporowano do krążków wykonanych z: Carbopolu, karmelozy sodowej, Orabase, hypromelozy (zastosowano 3 różne rodzaje tego polimeru różniące się lepkością roztworu) oraz metylocelulozy.

W wyniku liofilizacji tych układów uzyskano krążki o różnych właściwościach mechanicznych. Odpowiednią wytrzymałością charakteryzowały się krążki wykonane z karmelozy sodowej (KCn-ChS), Orabase (KO-ChS), Carbopolu (KCP-ChS) i hypromelozy typu Pharmacoat 615 (KHm-ChS), natomiast liofilizacja roztworów pozostałych typów hypromelozy (Metolose 60 SH 50 i Metolose 60 SH 4000) oraz metylocelulozy nie zapewniała otrzymania krążków zadowalającej jakości (ryc. 29).

Aby ocenić wpływ dodatku ChS w formie substancji na właściwości adhezyjne krążków, przeprowadzono badanie mukoadhezji w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem 10% roztworu mucyny. Na przykładzie krążków typu KCn-ChS wykazano, że wprowadzenie substancji leczniczej do matrycy krążka (ChS stanowił ok. 42% masy krążka) wykonanego z karmelozy sodowej nie zmniejsza jego siły adhezji do błony śluzowej, przeciwnie uzyskana wartość pracy mukoadhezji była 2-krotnie większa od wartości zmierzonej dla krążka placebo (ryc. 28). Tak duży wzrost pracy mukoadhezji wynikał prawdopodobnie z 2-krotnie większego udziału polimeru w masie krążka z ChS, w stosunku do postaci placebo.

Krążki o dobrych właściwościach mechanicznych zostały wytypowane do badań dostępności farmaceutycznej, przy czym dla krążków wykonanych z Carbopolu oceniano także wpływ wstępnego prasowania na szybkość uwalniania ChS.

Uzyskane wyniki (tabela 26, ryc. 30) wskazują, że o szybkości uwalniania ChS z liofilizowanego krążka decydują właściwości polimeru tworzącego matrycę, co jest zjawiskiem niekorzystnym dla opracowywanego układu. Mimo że zastosowanie karmelozy sodowej oraz mieszaniny Orabase jako matrycy krążka liofilizowanego, zapewniało przedłużone uwalnianie ChS przez 4–6 h, tego samego efektu nie uzyskano w przypadku krążków zbudowanych z Carbopolu i hypromelozy. Wynikało to przede wszystkim z różnego zachowania krążków w płynie akceptorowym: zwilżone matryce Orabase i karmelozy tworzyły hydrożel, natomiast matryce wykonane z

Carbopolu i hypromelozy ulegały całkowitej erozji już w ciągu ok. 30 min, szybko uwalniając całą dawkę substancji leczniczej. Ponadto okazało się, że zmiana geometrii krążka Carbopolu, związana z jego zgnieceniem, powodowała dalszy wzrost szybkości uwalniania. Ponieważ założeniem pracy było otrzymanie form o przedłużonym uwalnianiu, niezależnym od właściwości matrycy mukoadhezyjnej, postanowiono do matryc polimerów mukoadhezyjnych inkorporować ChS w formie mikroziarników, kontrolujących uwalnianie substancji leczniczej.

Tworzenie mikroziarników ChS

W trakcie dalszych badań opracowano metody otrzymywania różnych form mikroziarników zawierających ChS, m. in: powlekanych peletek, mikrosfer oraz mikrogranulatu.

Ze względu na dużą popularność we współczesnej technologii postaci leku, pierwszym analizowanym typem mikroziarników były peletki, otrzymywane metodą ekstruzji i sferonizacji. Aby uzyskać formy charakteryzujące się przedłużonym uwalnianiem, sporządzone rdzenie powlekano filmem polimerowym. Wytypowano etylocelulozę jako polimer powlekający i kontrolujący uwalnianie, z kinetyką niezależną od pH środowiska [1].

Sporym jednak problemem okazał się wybór odpowiedniej metody powlekania mikroziarników, co wynikało nie tylko z niewielkich rozmiarów cząstek, ale także z małej wielkości serii (poniżej 5 g). Początkowo podjęto próbę tworzenia otoczki z etylocelulozy na rdzeniach peletek metodą koacerwacji, z wykorzystaniem zjawiska wytrącenia etylocelulozy z roztworu cykloheksanu podczas chłodzenia układu [115]. Niestety, mimo wielu prób modyfikacji składu i sposobu prowadzenia procesu, nie udało się opracować skutecznej metody mikrokapsułkowania rdzeni peletek. Peletki po zakończeniu powlekania nie posiadały kompletnej otoczki, co potwierdzono zarówno w obserwacjach mikroskopowych, jak również w badaniu dostępności farmaceutycznej.

Kolejna próba tworzenia otoczek na rdzeniach peletek polegała na ich powlekanii w warstwie fluidalnej wodną dyspersją etylocelulozy. Ponieważ minimalny wsad do komory zastosowanego aparatu fluidalnego typu Uni-Glatt wynosi ok. 200 g, konieczne było uzupełnienie masy rdzeni o większe peletki placebo, które można było w łatwy sposób oddzielić od właściwych mikroziarników.

Stosując tę metodę udało się powlec rdzenie o wielkości 315 – 630 µm, a utworzona otoczka (ryc. 18) zapewniała przedłużone uwalnianie ChS z peletek (tabela 22, ryc. 19). Najkorzystniejszy profil uwalniania uzyskano stosując zwiększoną ilość dyspersji etylocelulozy, co jednak wydłużyło proces (układ P-I). Niestety, pomimo zadowalającej szybkości uwalniania substancji leczniczej uznano, że wielkość peletek

uniemożliwi otrzymanie odpowiedniej formy krążka liofilizowanego, zarówno ze względu na możliwość sedymentacji w roztworze polimeru adhezyjnego, jak również z powodu zbyt dużej ziarnistości preparatu wyczuwanej przez pacjenta po aplikacji na błonę śluzową.

Z powodu niskiej wydajności procesu otrzymywania peletek o wielkości $<315 \mu\text{m}$ metodą ekstruzji i sferonizacji w kolejnym etapie pracy podjęto badania nad opracowaniem metody tworzenia mikroziorników, których wielkość mieściłaby się w zakresie $100 - 200 \mu\text{m}$.

Przy sporządzaniu mikrosfer z ChS korzystano z dwóch metod opartych na odparowywaniu lotnego rozpuszczalnika organicznego z układu o/o (metoda 1) [116] lub w/o/w (metoda 2) [117]. W obu metodach jako tworzywo mikrosfer stosowano etylocelulozę.

Mikrosfery otrzymane metodą 1 charakteryzowały się odpowiednią wielkością ($40 - 150 \mu\text{m}$), kształtem (ryc. 20) oraz właściwościami. Formy te zapewniały przedłużone uwalnianie ChS w warunkach *in vitro* przez 24 h (tabela 22, ryc. 19).

Zastosowanie metody 2 do sporządzania mikrosfer z ChS okazało się bardzo trudne. Problemy dotyczyły zarówno etapu otrzymywania cząstek, jego wydajności ($<30\%$), jak również właściwości mikroziorników. Bardzo niska zawartość ChS w mikrosferach tego typu była prawdopodobnie wynikiem obecności zewnętrznej fazy wodnej w układzie emulsyjnym, w której badana substancja lecznicza jest bardzo dobrze rozpuszczalna. Powodowało to szybką dyfuzję ChS do fazy wodnej i tym samym ograniczało możliwość zamknięcia substancji leczniczej w mikrosferach polimerowych. Niepowodzenia w sporządzaniu mikrosfer tą metodą spowodowały, że zaniechano badań nad mikroziornikami otrzymywanymi metodą 2.

Kolejna metoda tworzenia mikroziorników z ChS wykorzystywała zjawisko sieciowania dwóch naturalnych polimerów liniowych: niskoestryfikowanej pektyny cytrusowej oraz alginianu sodu. Strukturę tych polimerów tworzą kwasy: D-galakturonowy (pektyna) oraz kwas D-mannuronowy i kwas L-guluronowy (alginian sodu), warunkujące zdolność tych substancji do żelowania w obecności jonów dwuwartościowych: Ca^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} [118–120]. Mechanizm żelowania (sieciowania) obu polimerów polega na łączeniu kationów z ujemnie naładowanymi grupami karboksylowymi dwóch łańcuchów pektyny lub alginianu i w rezultacie połączeniu ich ze sobą. Reakcja ta prowadzi do formowania uporządkowanej struktury określanej jako „egg-box model” [97, 121].

Sieciowanie polimeru w roztworze zawierającym ChS (polimer:ChS – 2:1) następowało w momencie kontaktu kropli tego roztworu z roztworem CaCl_2 (alginian sodu) lub roztworem ZnSO_4 (pektyna). Zazwyczaj metoda ta umożliwia uzyskanie

formy mikrokapsulek, natomiast celowe zastosowanie długiego (24 h) etapu inkubacji tworzonych form w środowisku elektrolitu, miało zapewnić penetrację kationów do ich wnętrza i całkowite sieciowanie matrycy polimerowej, w wyniku czego otrzymywano mikrosfery. W procesie sieciowania dążono do minimalizacji objętości płynu sieciującego, obawiając się znacznego przenikania ChS do płynu sieciującego i w konsekwencji niskiej zawartości substancji leczniczej w otrzymanych cząstkach.

Mikrosfery o najkorzystniejszym wyglądzie i najwyższej zawartości ChS uzyskano metodą sieciowania alginianu sodu (ryc. 21 a) i dlatego ten rodzaj cząstek wykorzystywano w dalszych badaniach. Wielkość otrzymanych mikrosfer z sieciowanego alginianu wapnia wynosiła ok. 1 mm, przez co nie nadawały się one do bezpośredniej inkorporacji w matrycy krążka liofilizowanego. Mikrogranulat (XA), o wielkości ziarna w zakresie 100 – 200 μm , uzyskiwano w procesie mielenia cząstek (ryc. 21 b). Mimo znacznego rozdrobnienia, mikrogranulat zachował zdolność uwalniania substancji leczniczej w sposób przedłużony (tabela 23, ryc. 23). Wadą tej formy ChS była natomiast stosunkowo niska wydajność inkorporacji substancji leczniczej w sieciowanej matrycy, wynosząca ok. 40% wartości teoretycznej, co wynikało z bardzo dobrej rozpuszczalności substancji leczniczej i prowadzenia procesu sieciowania w środowisku wodnym.

Zastosowanie pektyny w powyższym procesie, pomimo doniesień o możliwości tworzenia cząstek sieciowanych z jonami Zn^{2+} [122, 123], nie zapewniało niestety uzyskania mikroziorników o zadowalających właściwościach. Wynikało to przede wszystkim z problemów na etapie sieciowania. Już w czasie wkraplania roztworu pektyny z ChS do roztworu ZnSO_4 , obserwowano sklejanie tworzących się form w duże aglomeraty, co znacznie utrudniało penetrację jonów Zn^{2+} do ich wnętrza i uniemożliwiało skuteczne sieciowanie. Efektem tych niekorzystnych zjawisk była niska wydajność inkorporacji substancji leczniczej w sieciowanej matrycy oraz brak spowolnionego uwalniania z otrzymanych form.

Mimo że nie udało się uzyskać sieciowanych mikroziorników z roztworu pektyny, nie zaniechano dalszych badań nad tym polimerem i opracowano inną metodę tworzenia mikrogranulatu z pektyny. Polegała ona na mieszanii sproszkowanego ChS z pektyną w różnych stosunkach wagowych (2:1 – 20:1) i wkraplaniu roztworu ZnSO_4 . Prowadziło to do utworzenia granulatu o wielkości 1 – 2 mm, który podobnie jak mikrosfery z sieciowanego alginianu wapnia mielono, aby uzyskać mikrogranulat o wielkości 100 – 200 μm (ryc. 22).

Zaproponowana metoda umożliwiała uzyskanie mikrocząstek z sieciowanej pektyny w prosty i szybki sposób, a jednocześnie zapewniała inkorporację całej dawki substancji leczniczej w sieciowanej matrycy. Dodatkowo, badanie dostępności

farmaceutycznej wykazało, że ChS z sieciowanych mikrogranulatów wszystkich typów uwalniał się w sposób przedłużony, przez co najmniej 4–6 h (tabela 23, ryc. 23). Profile uwalniania ChS z mikrogranulatów przygotowanych w różnych stosunkach wagowych (substancja lecznicza:pektyna – 1:2, 1:5, 1:10 i 1:20), przy zachowaniu stałego stosunku jonów Zn^{2+} do pektyny (2,3 mmol Zn^{2+} /1,0 g pektyny) wskazują, że istnieje zależność pomiędzy udziałem pektyny a szybkością uwalniania substancji leczniczej. Im wyższa była zawartość sieciowanego polimeru w mikrogranulacie tym wolniej następowała dyfuzja ChS do płynu akceptorowego. Najwolniej ChS uwalniał się z cząstek przygotowanych w stosunku 1:20, ale przedłużone uwalnianie uzyskano nawet dla mikrogranulatu o składzie 1:2. Niestety przy zwiększeniu ilości sporządzanego granulatu (granulat G3), mimo zachowania tego samego stosunku wagowego wszystkich składników uzyskiwano produkt, który uwalniał całą dawkę substancji leczniczej już w ciągu 1 h, co dowodziło problemu ze zwiększeniem skali produkcji cząstek tą metodą.

Dość duże ograniczenie w możliwości wykorzystania sieciowanego mikrogranulatu jako nośnika ChS w matrycy krążka stanowi dawka substancji leczniczej. Otrzymanie krążka liofilizowanego zawierającego 10 mg ChS wymaga bowiem wprowadzenia do matrycy krążka ważącej ok. 20 mg, w zależności od typu zastosowanych cząstek (1:2 – 1:20), 40 mg a nawet ok. 290 mg sieciowanego mikrogranulatu. Z tego powodu w badaniach nad otrzymaniem formy aplikacyjnej stosowano mikrogranulat o największym udziale ChS (stosunek ChS:pektyna – 1:2).

Tworzenie krążków zawierających mikroziorniki ChS

W celu otrzymania formy aplikacyjnej mikroziorniki charakteryzujące się przedłużonym uwalnianiem ChS (powlekane peletki, mikrosfery oraz mikrogranulat sieciowany) zawieszano w roztworze polimeru mukoadhezyjnego (Carbopolu, Orabase, pektyny, karmelozy sodowej lub hypromelozy – Pharmacoat 615) i suszono liofilizacyjnie otrzymując krążki mukoadhezyjne.

Zawieszenie w liofilizowanej matrycy Carbopolu powlekanych peletek lub mikrosfer spowodowało dalsze spowolnienie uwalniania ChS z otrzymanych form (tabela 28, ryc. 32 i 33). Najkorzystniejszy profil uwalniania ChS uzyskano dla krążków z peletkami, ale ten układ z powodu zbyt dużych cząstek nie nadawał się do aplikacji, natomiast z układu z mikrosferami w ciągu 24 h uwolniło się tylko ok. 40% dawki substancji leczniczej zawartej w krążku.

W przypadku mikrogranulatu z sieciowanej pektyny okazało się, że Carbopol nie może stanowić nośnika dla sieciowanych mikroziorników, ponieważ z powodu interakcji pomiędzy jonami Zn^{2+} a roztworem tego polimeru dochodziło do upłynnienia

zelu przygotowanego do liofilizacji. Nadmiar jonów Zn^{2+} niekorzystnie wpływał także na mieszaninę Orabase. Tym razem obserwowano zjawisko odmienne – wzrost gęstości układu, wynikający prawdopodobnie z dodatkowego sieciowania pektyny zawartej w Orabase pod wpływem jonów cynku. Ten rodzaj niezgodności nie dyskwalifikował jednak tego układu, chociaż utrudniał dozowanie do gniazd blistra. Podobnych problemów nie odnotowywano przy łączeniu mikrogranulatu z sieciowanego alginianu wapnia z roztworem Orabase przed liofilizacją, co wynikało prawdopodobnie z innej metody otrzymywania cząstek, przebiegającej w roztworze wodnym o mniejszym stężeniu elektrolitu sieciującego. Niestety badania dostępności farmaceutycznej dowiodły bardzo szybkiego uwalniania ChS z tak otrzymanego liofilizatu, co uniemożliwiło wykorzystanie tego układu w dalszych pracach (ryc. 34).

Aby zapobiec interakcjom związanym z obecnością nadmiaru wolnych jonów cynku w składzie mikrogranulatu z sieciowanej pektyny, jego cząstki powlekano dodatkową otoczką wykonaną z pektyny (wiązanie powierzchniowego nadmiaru jonów cynku) lub Eudragitu RS (powlekanie metodą koacerwacji, bez etapu suszenia). Mikrogranulat powlekany inkorporowano do matrycy krążków zbudowanych z karmelozy sodowej, Orabase oraz hypromelozy (Pharmacoat 615).

Okazało się niestety, że zabieg dodatkowego powlekania cząstek mikrogranulatu roztworem pektyny, jak również otoczką Eudragitu, nie zniósł niekorzystnych interakcji pomiędzy mikroziornikami a matrycą krążka. Potwierdziła to nie tylko ocena wizualna, ale również wyniki uwalniania ChS z krążków zawierających sieciowany mikrogranulat. Okazało się, że żaden z badanych układów, w skład których wchodził ten typ cząstek, nie zapewniał przedłużonego uwalniania substancji leczniczej – dawka ChS uwalniała się całkowicie już w ciągu 1 – 2 h badania (ryc. 35).

Żaden z proponowanych mikroziorników o wielkości $<200 \mu m$ nie umożliwił uzyskania krążków liofilizowanych o pożądanej szybkości uwalniania substancji leczniczej. Pod tym względem najkorzystniejszy był układ złożony z peletek powlekanych, ale jak wcześniej wskazano cząstki o wielkości $315\text{--}630 \mu m$ są zbyt duże i stwarzają problemy technologiczne i aplikacyjne (str. 122).

Otrzymywanie krążków z zasadą selegiliny

Bardzo dobra rozpuszczalność chlorowodoru selegiliny w wodzie znacznie utrudniała opracowanie postaci dopoliczkowej o przedłużonym uwalnianiu, dlatego rozpoczęto badania nad możliwością użycia substancji leczniczej w formie zasady.

Zasada selegiliny (ZS), ze względu na zwiększoną lipofilowość (Log P 3,4), charakteryzuje się większą zdolnością przenikania przez bariery biologiczne, co wykorzystano w handlowym preparacie Emsam, pozwalającym na przezskórne

dozowanie tej substancji leczniczej. Wprowadzając do krążka dopoliczkowego selegilinę w postaci zasady można było spodziewać się więc także znacznie lepszego przenikania przez błonę śluzową policzka.

Zastosowanie zasady wiązało się jednak z koniecznością rozwiązania nowych problemów technologicznych. Ze względu na postać (zasada selegiliny jest oleistą cieczą), jak również właściwości organoleptyczne (intensywny zapach) konieczne było opracowanie techniki izolowania substancji leczniczej od matrycy mukoadhezyjnej poprzez jej inkorporowanie w mikrozbiornikach. Nie powiodły się próby przygotowania mikrosfer zawierających ZS, gdyż płynna postać substancji leczniczej uniemożliwiała sporządzenie granulatu z sieciowanej pektyny metodą ucierania w moździerzu. Ostatecznie tworzono więc mikrokapsułki z otoczką wykonaną z etylocelulozy.

Celowość tworzenia mikrokapsułek potwierdziły wstępne próby polegające na otrzymaniu krążków w wyniku liofilizacji dyspersji zasady selegiliny (w stanie wolnym) w 1% roztworze Carbopolu lub 2% roztworze hydroksyetylocelulozy (HEC). Utworzone formy charakteryzowały się dobrymi właściwościami mechanicznymi, a dodatek selegiliny nie ograniczał mukoadhezji krążków (ryc. 28). Okazało się jednak, że w procesie liofilizacji dochodziło do utraty nawet 97% dawki substancji leczniczej, co wynikało z sublimacji selegiliny w formie wolnej w warunkach procesu suszenia. Ponadto, niezależnie od rodzaju matrycy krążka liofilizowanego i zawartości ZS, cała dawka substancji leczniczej uwalniała się z krążków tego typu w ciągu 2 h badania (tabela 31, ryc. 37).

Aby uprościć metodę otrzymywania krążków oraz zminimalizować straty substancji leczniczej zdecydowano, że proces tworzenia mikrokapsułek będzie następował „in situ”, w trakcie liofilizacji dyspersji roztworu organicznego (w chlorku metylenu) z etylocelulozą i ZS w roztworze wodnym polimeru mukoadhezyjnego. Obserwacje mikroskopowe wykazały, że korzystniejszym polimerem adhezyjnym do otrzymywania tego typu układów była hydroksyetyloceluloza. W żelu HEC bez trudu tworzyły się trwałe i homogenne dyspersje fazy organicznej, niezależnie od ilości użytych składników (ryc. 36). Uzyskanie podobnego, jednolitego, trwałego i odpowiednio subtelnego rozproszenia fazy organicznej w Carbopolu, ze względu na zbyt silne żelowanie, było znacznie utrudnione, nawet po zmianie sposobu mieszania (zastąpienie mieszadła łopatkowego na homogenizator). W wyniku liofilizacji sporządzonych dyspersji uzyskano krążki, których matrycę stanowił Carbopol lub HEC, zawierające mikrokapsułki różniące się udziałem etylocelulozy i substancji leczniczej.

Mimo że w przypadku suszenia tych układów także dochodziło do strat selegiliny, to jednak dzięki obecności otoczki z etylocelulozy, stanowiącej barierę mechaniczną, możliwe było częściowe ograniczenie sublimacji substancji leczniczej z

mikrokapsulek (straty wynosiły zazwyczaj ok. 50%). Niestety problemu tego nie wyeliminowało modyfikowanie sposobu zamrażania (gwałtowne chłodzenie m. in. w ciekłym azocie), jak również wstępne wytrącanie etylocelulozy, polegające na częściowym odparowaniu chlorku metylenu z dyspersji w temp. pokojowej, przy obniżonym ciśnieniu.

Otrzymane liofilizaty posiadały dobre właściwości mechaniczne, a najwyższą zawartością selegiliny (ok. 32 mg) charakteryzowały się krążki typu SKHc-EC1-II (przygotowane z układu zawierającego równe ilości ZS i etylocelulozy). Uzyskane profile uwalniania, niezależnie od składu mikrokapsulek, gęstości i geometrii krążków, były do siebie zbliżone i wskazywały na uwolnienie ok. 40% dawki selegiliny w ciągu 6 h (tabela 31, ryc. 37 i 38). Wykazano tym samym, że możliwe jest utworzenie liofilizowanych krążków dopoliczkowych, dozujących w warunkach *in vitro*, zasadę selegiliny w sposób przedłużony z kinetyką niezależną od matrycy mukoadhezyjnej, jak założono w celu pracy.

Badanie mukoadhezji tego typu krążków do warstwy mucyny wykazało, że chociaż oznaczano ponad 2-krotny spadek wartości pracy mukoadhezji w porównaniu z krążkami placebo (wykonanymi z hydroksyetylocelulozy), to w dalszym ciągu matryca zawierająca inkorporowane mikrokapsułki etylocelulozy z zasadą selegiliny zapewniała silne wiązanie krążka z błoną śluzową (wartość pracy mukoadhezji wynosiła 172 μJ) – ryc. 28.

Badanie przenikania selegiliny z krążków liofilizowanych przez błonę śluzową

Celem pracy było sporządzenie dopoliczkowej formy leku pozwalającej na wchłanianie selegiliny przez błonę śluzową w czasie adhezji i w ten sposób umożliwiającej przedłużone działanie leku. Ponieważ w warunkach *in vitro* potwierdzono przedłużone uwalnianie selegiliny zamkniętej w mikroziornikach inkorporowanych w liofilizowanej matrycy mukoadhezyjnej, końcowym etapem była ocena wpływu struktury mikroziorników na przenikanie substancji leczniczej przez błonę śluzową i do tej tkanki. W badaniu posłużono się powszechnie stosowanym modelem *in vitro*, z użyciem izolowanej błony śluzowej, umieszczonej w komorze dyfuzyjnej [124].

Stosując chlorowodorek selegiliny uzyskiwano małą szybkość przenikania i małą ilość substancji leczniczej oznaczano w błonie śluzowej, zarówno przy badaniu przenikania z roztworu, jak również z krążków liofilizowanych. W przypadku liofilizatów, intensywność przenikania ChS zależała od ich składu (tabela 32, ryc. 39). Gdy matrycę form liofilizowanych stanowił Orabase, następował spadek szybkości przenikania, natomiast efektu tego nie obserwowano, gdy liofilizat zbudowany był z karmelozy

sodowej (podobna kinetyka przenikania jak dla roztworu ChS). Obecność mikrozbiorników z ChS spowalniała uwalnianie z krążków i zmniejszała wchłanianie do błony śluzowej (ryc. 40). Niewielkie wchłanianie ChS z krążków, a także roztworu, wynikało z niskiej wartości pH tych postaci. W warunkach fizjologicznych, po zwilżeniu krążka powstaje kwaśne środowisko, co prowadzi do znacznej dysocjacji ChS (ok. 99,3% dawki leku występuje w formie zdysocjowanej), utrudniającej transport substancji leczniczej przez błonę śluzową. Co prawda w piśmiennictwie istnieją doniesienia na temat dobrego wchłaniania ChS z jamy ustnej, ale dotyczą one niebuforowanych preparatów szybko rozpuszczalnych w jamie ustnej. Ich odczyn nie zmienia pH śliny (ok. 7) w miejscu aplikacji, dzięki czemu nawet ok. 50% dawki leku może występować w postaci niezdisocjowanej, łatwo przenikającej do tkanki [106].

W celu zwiększenia przenikania zmieniono formę selegiliny na zasadę. Z powodu braku obojętnego dla tkanek rozpuszczalnika zasady selegiliny we wstępnych badaniach zastosowano roztwór makrogolu. W tym badaniu nie udało się wykazać wzrostu przenikania substancji leczniczej w formie zasady, co wynikało z bardzo dobrej rozpuszczalności w makroglu i niekorzystnego współczynnika podziału rozpuszczalnik – błona śluzowa (ryc. 39). Odmienne wyniki uzyskano w przypadku pozostałych preparatów stanowiących dyspersję zasady selegiliny w układach hydrofilowych. Niezależnie od postaci (forma płynna lub żel utworzony na skutek zwilżenia liofilizatu) obserwowano 2-krotny wzrost wchłaniania substancji leczniczej do błony śluzowej, w porównaniu do formy roztworu ChS (ryc. 40). Większe przenikanie selegiliny wynikało z odmiennego pH tych układów (wartość pH 8,2 – 8,4), przez co nawet ponad 86% dawki substancji leczniczej może występować w formie niezdisocjowanej. Najwyższą zawartość selegiliny w błonie śluzowej (ok. 370 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) oznaczono po aplikacji krążka Carbopolu z wolną zasadą (ryc. 40).

Zgodnie z założeniami pracy po inkorporacji mikrozbiorników z substancją leczniczą należy oczekiwać spowolnionego i wydłużonego w czasie przenikania tej substancji. Taki efekt obserwowano w przypadku krążków zawierających mikrokapsułki etylocelulozy z zasadą selegiliny. Chociaż przenikanie z tych układów było wolniejsze niż z preparatów zawierających zasadę selegiliny w stanie wolnym, to w porównaniu z postaciami, do których inkorporowano ChS, przenikanie było większe (tabela 32, ryc. 39). Z krążka zawierającego mikrokapsułki do błony śluzowej w czasie 8 h wchłaniało się ok. 300 μg selegiliny (ryc. 40).

Szybkość przenikania zasady selegiliny z krążków liofilizowanych była najwyższa w pierwszej godzinie badania i wynosiła dla krążków Carbopolu ok. 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, natomiast ok. 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ dla krążków zawierających mikrokapsułki z etylocelulozy. Pomiar w kolejnych przedziałach czasowych wykazały spadek

szybkości przenikania z tych krążków do odpowiednio ok. 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ i 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Uzyskana szybkość przenikania była niższa niż opisana dla systemu transdermalnego w warunkach *in vivo* – ok. 18 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ [101]. Wyższa szybkość przenikania selegiliny uzyskiwana z systemu transdermalnego gwarantuje znacznie większą dawkę leku dostarczanego do organizmu, również z powodu możliwej większej powierzchni wchłaniania, np. 10–20 cm^2 . Takiej powierzchni nie można osiągnąć w systemie dopoliczkowym (powierzchnia przy tej formie leku nie będzie przekraczać 2 cm^2).

Należy jednak zwrócić uwagę, że szybkość przenikania przez błonę śluzową oceniano w warunkach *in vitro*. Dzięki dobremu unaczynieniu tkanki i szybkiemu przepływowi krwi (tabela 1) nie jest wykluczone, że przenikanie przez błonę śluzową w warunkach *in vivo* może być większe niż w warunkach *in vitro* i może dojść do szybkiej eliminacji selegiliny z tkanki. Jak wynika z przeprowadzonych badań w stanie stacjonarnym zawartość substancji leczniczej wynosiła aż 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Jest to znaczący magazyn selegiliny, pozwalający na wchłanianie *in vivo* być może jeszcze efektywniejsze niż z systemu transdermalnego.

Proponowana dopoliczkowa postać leku powinna być dobrą alternatywą wobec handlowego liofilizatu doustnego charakteryzującego się szybkim rozpadem i natychmiastowym uwolnieniem selegiliny w jamie ustnej. Tylko postać dopoliczkowa, utrzymująca się przez kilka godzin na błonie śluzowej może zapewnić kierunkowe dozowanie substancji leczniczej do błony śluzowej i zapewnić jej wchłanianie do krwiobiegu z ominięciem efektu pierwszego przejścia. Prawdopodobnie pozwoli to na redukcję dawki selegiliny, przy zachowaniu skuteczności terapeutycznej oraz ograniczy liczbę działań niepożądanych.

W podsumowaniu należy jednak wskazać na konieczność doskonalenia proponowanej postaci leku. Dalsza modyfikacja warunków procesu liofilizacji (dobór ciśnienia i szybkości zmian temperatury) oraz zmiana składu jakościowego i ilościowego otoczki mikrokapsułek (np. dodatkowy polimer) mogłaby pozwolić na redukcję strat selegiliny. Dalsze prace musiałyby potwierdzić, czy w warunkach *in vivo* dochodzi do wchłaniania odpowiedniej dawki leku przy uzyskanym profilu uwalniania.

Wybrana substancja lecznicza stwarzała liczne problemy technologiczne i dlatego nie otrzymano postaci leku całkowicie odpowiadającej przyjętym założeniom (uwalnianie w ciągu 6 h tylko 40% dawki lub zbyt duża wielkość cząstek inkorporowanych). Mimo to opracowana nowa forma leku – podpoliczkowy liofilizat mikrozbiornikowy o kontrolowanym uwalnianiu substancji leczniczej może służyć z pewnością jako nośnik innych substancji leczniczych.

VI. WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań, których celem było otrzymanie metodą liofilizacji mukoadhezyjnego systemu wielokompartimentowego z selegiliną, uwalniającego po aplikacji podpoliczkowej substancję leczniczą przez około 6 h uzyskano następujące wnioski:

1. W warunkach *in vitro* udowodniono, że liofilizowane matryce z polimerów mukoadhezyjnych odznaczają się bardzo dobrymi właściwościami mukoadhezyjnymi i przewyższają pod tym względem dyski polimerowe otrzymane metodą tabletkowania, pomimo dużo mniejszej zawartości polimeru w przeliczeniu na jednostkę powierzchni. Prasowanie krążka liofilizowanego, imitujące nacisk wytwarzany podczas aplikacji, nie ma wpływu na właściwości mukoadhezyjne. Największą siłę mukoadhezji wykazywały preparaty przygotowane z takich polimerów jak: Carbopol, karmeloza sodowa, Orabase i hydroksyetyloceluloza.
2. Peletki z chlorowodorkiem selegiliny powlekane otoczką z etylocelulozy wykazywały przedłużone uwalnianie substancji leczniczej, lecz rozmiary cząstek w zakresie 315 – 630 μm uniemożliwiały przygotowanie systemu podpoliczkowego ze względu na niehomogenną dystrybucję w liofilizatach i wyczuwalną ziarnistość po aplikacji.
3. Cząstki mniejsze o wielkości do 200 μm otrzymywano jako mikrosfery i mikrogranulat, lecz nie udało się uzyskać odpowiedniej wydajności zamykania lub spowolnionego uwalniania ChS, co wynikało z bardzo dobrej rozpuszczalności substancji leczniczej w wodzie. Ze względu na ich mały rozmiar żadna z zastosowanych metod powlekania nie zapewniała utworzenia otoczki na cząstkach.
4. Mikrogranulat o przedłużonym uwalnianiu ChS uzyskiwano stosując metodę sieciowania alginianu sodu lub pektyny roztworem chlorku wapnia lub siarczanu cynku. Z powodu interakcji z żelem tworzącym matrycę krążków, następowało jednak szybkie uwalnianie ChS z tak przygotowanych liofilizatów.
5. Mikrozbiornikowy liofilizowany system mukoadhezyjny otrzymano poprzez tworzenie „*in situ*”, w czasie liofilizacji krążków, mikrokapsulek z zasadą selegiliny, zamkniętą w otoczce z etylocelulozy. Stosując hydroksyetylocelulozę i Carbopol, jako polimery mukoadhezyjne, otrzymano systemy uwalniające selegilinę w sposób przedłużony w czasie ponad 6 h. Geometria i gęstość

krążka liofilizowanego nie miały wpływu na kinetykę uwalniania substancji leczniczej w warunkach in vitro. Nie udało się jednak całkowicie zredukować straty selegiliny w wyniku sublimacji w procesie liofilizacji.

6. Stosując błonę śluzową policzka świni, w warunkach in vitro wykazano, że przenikanie selegiliny w formie chlorowodoru, niezależnie od aplikowanej formy leku (roztwór, krążek) jest mniejsze od przenikania zasady selegiliny, która w znacznym stopniu ulegała wchłanianiu do tkanki ($300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Inkorporacja selegiliny w mikrokapsułkach nie ograniczała wchłaniania do błony śluzowej, a szybkość przenikania przez tkankę była tylko ok. 30% mniejsza, niż z form zawierających substancję leczniczą w formie wolnej.

VII. PIŚMIENNICTWO

1. Janicki S., Fiebig A., Sznitowska M. (red.): Farmacja Stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji, PZWL, Warszawa (2003)
2. Singh B. N., Kim K. H.: Drug delivery: oral route, w: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Swarbrick J. (red.), Informa Healthcare, Nowy Jork (2007), 1242 – 1265
3. Sznitowska M., Żebrowska W.: Doustne postacie leku o modyfikowanym uwalnianiu. Część II – Kapsułki o przedłużonym uwalnianiu, Ordynator Leków, 6 (2003), 10 – 17
4. Sawicki W.: Histologia, PZWL, Warszawa (2003)
5. Salamat-Miller N., Chittchang M., Johnston T. P.: The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery, Adv. Drug Del. Rev., 57 (2005) 1666 – 1691
6. Bruschi M. L., Freitas O.: Oral bioadhesive drug delivery systems, Drug Dev. Ind. Pharm., 31 (2005), 293 – 310
7. Squier C. A., Wertz P. W.: Structure and function of the oral mucosa and implications for drug delivery, w: Oral Mucosal Drug Delivery, Rathbone M. J. (red.), Marcel Dekker, Nowy Jork (1996), 1 – 25
8. Squier C. A., Kremer M. J.: Biology of oral mucosa and esophagus, J. Natl. Cancer Inst. Monogr., 29 (2001), 7 – 15
9. Smart J. D.: The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion, Adv. Drug Del. Rev., 57 (2005) 1556 – 1568
10. Junginger H. E., Verhoef J. C., Thanou M.: Drug delivery: mucoadhesive hydrogels, w: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Swarbrick J. (red.), Informa Healthcare, Nowy Jork (2007), 1169 – 1182
11. Peppas N. A., Huang Y.: Nanoscale technology of mucoadhesive interactions, Adv. Drug Del. Rev., 56 (2004) 1675 – 1687
12. Hao J., Heng P. W. S.: Buccal delivery systems, Drug Dev. Ind. Pharm., 29 (2003), 821 – 832
13. McElnay J. C., Hughes C.M.: Drug delivery: buccal route, w: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Swarbrick J. (red.), Informa Healthcare, Nowy Jork (2007), 1071 – 1081
14. Webber W.: Mucosal drug delivery, buccal, w: Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, Mathiowitz E. (red.), John Wiley & Sons, Nowy Jork (1999), 553 – 563
15. Veuillez F., Kalia Y. N., Jacques Y. i in.: Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides, Eur. J. Pharm. Biopharm., 51 (2001), 93 – 109

16. Mitra A. K., Alur H. H., Johnston T. P.: Peptides and proteins: buccal absorption, w: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Swarbrick J. (red.), Informa Healthcare, Nowy Jork (2007), 2664 – 2677
17. Rossi S., Sandri G., Caramella C. M.: Buccal drug delivery: a challenge already won?, Drug Discov. Today: Technol., 2 (2005), 59 – 65
18. Giunchedi P., Juliano C., Gavini E. i in.: Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres, Eur. J. Pharm. Biopharm., 53 (2002), 233 – 239
19. Patel J.: Bioadhesive microspheres and their pharmaceutical applications, Drug Deliv. Technol., 6 (2007), 54 – 61
20. Gurny R., Junginger H. E.: Bioadhesion – Possibilities and Future Trends, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart (1990)
21. Mathiowitz E., Chickering D., Jacob J. S., Santos C.: Bioadhesive drug delivery systems, w: Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, Mathiowitz E. (red.), John Wiley & Sons, Nowy Jork (1999), 9 – 45
22. Lee J. W., Park J. H., Robinson J. R.: Bioadhesive-based dosage forms: the next generation, J. Pharm. Sci., 89 (2000), 850 – 866
23. Peppas N. A., Sahlin J. J.: Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review, Biomaterials, 17 (1996) 1553 – 1561
24. Sudhakar Y., Kuotsu K., Bandyopadhyay A. K.: Buccal bioadhesive drug delivery – a promising option for orally less efficient drugs, J. Control. Release, 114 (2006), 15 – 40
25. Kellaway I. W., Warren S. J.: Mucoadhesive hydrogels for buccal delivery, w: Oral Mucosal Drug Delivery, Rathbone M. J. (red.), Marcel Dekker, Nowy Jork (1996), 221 – 239
26. Ali J., Khar R., Ahuja A., Kalra R.: Buccoadhesive erodible disk for treatment of oro-dental infections: design and characterisation, Int. J. Pharm., 238 (2002), 93 – 103
27. Singh B., Ahuja N.: Development of controlled-release buccoadhesive hydrophilic matrices of diltiazem hydrochloride: optimization of bioadhesion, dissolution and diffusion parameters, Drug Dev. Ind. Pharm., 28 (2002), 431 – 442
28. Desai K. G. H., Kumar T. M. P.: Preparation and evaluation of a novel buccal adhesive system, AAPS Pharm. Sci. Tech., 5 (2004), art. 35
29. Choi H.-G., Kim Ch-K.: Development of omeprazole buccal adhesive tablets with stability enhancement in human saliva, J. Control. Release 68 (2000), 397 – 404
30. Langoth N., Kalbe J., Bernkop-Schnürch A.: Development of buccal drug delivery systems based on a thiolated polymer, Int. J. Pharm., 252 (2003), 141 – 148

31. Llabot J. M., Manzo R. H., Allemandi D. A.: Double-layered mucoadhesive tablets containing nystatin, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 3 (2002), art. 22
32. Llabot J. M., Manzo R. H., Allemandi D. A.: Drug release from carbomer:carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system, *Int. J. Pharm.*, 276 (2004), 59 – 66
33. Alur H. H., Pather I., Mitra A. K. i in.: Transmucosal sustained-delivery of chlorpheniramine maleate in rabbits using a novel, natural mucoadhesive gum as an excipient in buccal tablets, *Int. J. Pharm.*, 188 (1999), 1 – 10
34. Alur H. H., Beal J. D., Pather S. I.: Evaluation of a novel, natural oligosaccharide gum as a sustained-release and mucoadhesive component of calcitonin buccal tablets, *J. Pharm. Sci.*, 88 (1999), 1313 – 1319
35. Shojaei A. H., Li X.: Mechanisms of buccal mucoadhesion of novel copolymers of acrylic acid and polyethylene glycol monomethylether monomethacrylate, *J. Control. Release*, 47 (1997), 151 – 161
36. Shojaei A. H., Paulson J., Honary S.: Evaluation of poly(acrylic acid-co-ethylhexyl acrylate) films for mucoadhesive transbuccal drug delivery: factors affecting the force of mucoadhesion, *J. Control. Release*, 67 (2000), 223 – 232
37. Akbari J., Nokhodchi A., Farid D. i in.: Development and evaluation of buccoadhesive propranolol hydrochloride tablet formulations: effect of fillers, *Il Farmaco*, 59 (2004), 155 – 161
38. Bonacucina G., Cespi M., Misici-Falzi M. i in.: Rheological, adhesive and release characterisation of semisolid Carbopol/tetraglycol systems, *Int. J. Pharm.*, 307 (2006), 129 – 140
39. Varshosaz J., Dehghan Z.: Development and characterization of buccoadhesive nifedipine tablets, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 54 (2002), 135 – 141
40. Jain A. C., Aungst B J., Adeyeye M. Ch.: Development and in vivo evaluation of buccal tablets prepared using danazol-sulfobutylether 7 β -cyclodextrin (SBE 7) complexes, *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002), 1659 – 1668
41. Rossi S., Bonferoni M. C., Ferrari F. i in.: Characterization of mucin interaction with three viscosity grades of sodium carboxymethylcellulose. Comparison between rheological and tensile testing, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 4 (1996), 189 – 196
42. Kelly H. M., Deasy P. B., Busquet M. i in.: Bioadhesive, rheological, lubricant and other aspects of an oral gel formulation intended for the treatment of xerostomia, *Int. J. Pharm.*, 278 (2004), 391 – 406
43. Gavini E., Sanna V., Juliano C. i in.: Mucoadhesive vaginal tablets as veterinary delivery system for the controlled release of an antimicrobial drug, acriflavine, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 3 (2002), art. 20

44. Jones D. S., Woolfson A. D., Brown A. F. i in.: Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease, *J. Control. Release*, 67 (2000), 357 – 368
45. Park C. R., Munday D. L.: Development and evaluation of a biphasic buccal adhesive tablet for nicotine replacement therapy, *Int. J. Pharm.*, 237 (2002), 215 – 226
46. İkinci G., Senel S., Akincibay H. i in.: Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*, *Int. J. Pharm.*, 235 (2002), 121 – 127
47. Accili D., Menghi G., Bonacucina G. i in.: Mucoadhesion dependence of pharmaceutical polymers on mucosa characteristics, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 22 (2004), 225 – 234
48. Eouani C., Piccerelle Ph., Prinderre P. i in.: In-vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 52 (2001), 45 – 55
49. Bredenberg S., Nyström Ch.: In-vitro evaluation of bioadhesion in particulate systems and possible improvement using interactive mixtures, *J. Pharm. Pharmacol.*, 55 (2003), 169 – 177
50. Tobyn M., Johnson J., Gibson S.: Use of a TA.XT2 Texture Analyser in mucoadhesive research, *International Labmate*, 17 (1994), 6
51. Caramella C. M., Rossi S., Bonferoni M. C.: A rheological approach to explain the mucoadhesive behavior of polymer hydrogels, w: *Bioadhesive Drug Delivery Systems: Fundamentals, Novel Approaches and Development*, Mathiowitz E., Chickering D. E., Lehr C. M. (red.), Marcel Dekker, Nowy Jork (1999), 25 – 65
52. Rossi S., Ferrari F., Bonferoni M. C.: Characterization of chitosan hydrochloride-mucin rheological interaction: influence of polymer concentration and polymer:mucin weight ratio, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 12 (2001), 479 – 485
53. Tur K. M., Ch'ng H. S.: Evaluation of possible mechanism(s) of bioadhesion, *Int. J. Pharm.*, 160 (1998), 61 – 74
54. Kockisch S., Rees G. D., Young S. A. i in.: A direct-staining method to evaluate the mucoadhesion of polymers from aqueous dispersion, *J. Control. Release*, 77 (2001), 1 – 6
55. Patel D., Smith J. R., Smith A. W. i in.: An atomic force microscopy investigation of bioadhesive polymer adsorption onto human buccal cells, *Int. J. Pharm.*, 200 (2000) 271 – 277

56. Kockisch S., Rees G. D., Young S. A. i in.: In situ evaluation of drug-loaded microspheres on a mucosal surface under dynamic test conditions, *Int. J. Pharm.*, 276 (2004), 51 – 58
57. Nielsen L. S., Schubert L., Hansen J.: Bioadhesive drug delivery systems. I. Characterisation of mucoadhesive properties of system based on glyceryl monooleate and glyceryl monolinoleate, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 6 (1998), 231 – 239
58. Qaqish R. B., Amiji M. M.: Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan-mucin interactions, *Carbohydr. Polym.*, 38 (1999), 99 – 107
59. Bernkop – Schnürch A.: Mucoadhesive polymers, w: *Polymeric Biomaterials*, Dumitriu S. (red.), Marcel Dekker, Nowy Jork (2001), 147 – 165
60. Bernkop – Schnürch A.: Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers, *Adv. Drug Del. Rev.*, 57 (2005) 1569 – 1582
61. Kubis A. A.: Zastosowanie polimerów jonowych w technologii postaci leku, XX Naukowy Zjazd PTFarm., Katowice (2007), S.18.W-1
62. Bernkop – Schnürch A., Steininger S.: Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers, *Int. J. Pharm.*, 194 (2000), 239 – 247
63. Bernkop – Schnürch A.: Mucoadhesive systems in oral drug delivery, *Drug Discov. Today: Technol.*, 2 (2005), 83 – 87
64. Smart J. D., Kellaway I. W., Worthington H. E. C.: An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.*, 36 (1984), 295 – 299
65. Tobby M. J., Johnson J. R., Dettmar P. W.: Factors affecting in vitro gastric mucoadhesion. II. Physical properties of polymers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 42 (1996) 56 – 61
66. Wong Ch. F., Yuen K. H., Peh K. K.: An in-vitro method for buccal adhesion studies: importance of instrument variables, *Int. J. Pharm.*, 180 (1999), 47 – 57
67. Prudat-Christiaens C., Arnaud P., Allain P. i in.: Aminophylline bioadhesive tablets attempted by wet granulation, *Int. J. Pharm.*, 141 (1996) 109 – 116
68. Tamburic S., Craig D. Q. M.: A comparison of different in vitro methods for measuring mucoadhesive performance, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 44 (1997), 159 – 167
69. Jacques Y., Buri P.: An investigation of the physical behaviour of moisture-activated mucoadhesive hydrogels upon contact with biological and non-biological substrates, *Pharm. Acta Helv.*, 72 (1997), 225 – 232
70. Grabovac V., Guggi D., Bernkop-Schnürch A.: Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57 (2005), 1713 – 1723

71. Madsen F., Eberth K., Smart J. D.: A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration, *J. Control. Release*, 50 (1998), 167 – 178
72. Sznitowska M., Płaczek M.: Tabletki liofilizowane i inne tabletki szybko rozpuszczalne w jamie ustnej, *Ordynator Leków*, 7-8 (2004), 33 – 38
73. Rey L., May J. C. (red.): *Freeze-drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, Marcel Dekker, Nowy Jork (2004)
74. Pfister W. R., Ghosh T. K.: Orally disintegrating tablets: products, technologies and development issues, *Pharm. Technol.*, 29 (2005), 136 – 150
75. Dobbetti L.: Fast-melting tablets: developments and technologies, *Pharm. Technol. Europe*, 9 (2000), 32 – 42
76. Sastry S. V., Nyshadham J. R., Fix J. A.: Recent technological advances in oral drug delivery – a review, *Pharm. Sci. Technol. Today*, 3 (2000), 138 – 145
77. Agarwal V., Kothari B. H., Moe D. V., Khankari R. K.: Drug delivery: fast-dissolve systems, w: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Swarbrick J. (red.), Informa Healthcare, Nowy Jork (2007), 1104 – 1114
78. Corveleyn S., Remon J. P.: Formulation and production of rapidly disintegrating tablets by lyophilisation using hydrochlorothiazide as a model drug, *Int. J. Pharm.*, 152 (1997), 215 – 225
79. Corveleyn S., Remon J. P.: Formulation of a lyophilized dry emulsion tablet for the delivery of poorly soluble drugs, *Int. J. Pharm.*, 166 (1998), 65 – 74
80. Aurora J., Pathak V.: Oral disintegrating dosage forms: an overview, *Drug Deliv. Technol.*, 3 (2005), 50 – 54
81. Bauer K. H.: A partially freeze-dried lyophilization technology for producing fast-melting tablets, *Pharm. Technol. Europe*, 9 (2007), 63 – 69
82. Van Weeren R., Gibboni D. J.: Barrier packaging as an integral part of drug delivery, *Drug Deliv. Technol.*, 4 (2002), art. 2
83. Corveleyn S., Remon J. P.: Stability of freeze-dried tablets at different relative humidities, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 25 (1999), 1005 – 1013
84. Seager H.: Drug-delivery products and the Zydis fast-dissolving dosage form, *J. Pharm. Pharmacol.*, 50 (1998), 375 – 382
85. Michaud J., Haest G.: Erythritol: a new multipurpose excipient, *Pharm. Technol. Europe*, 10 (2003), 69 – 72
86. Fraher J.: A matter of taste, *Scrip Magazine*, 1 (2004), 28 – 29
87. Yaginuma Y., Yoshida N.: Preparing rapid disintegrating tablets containing taste-masking microgranules, *Pharm. Technol. Europe*, 9 (2007), 21 – 26

88. Frijlink H. W.: Benefits of different drug formulations in psychopharmacology, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 13 (2003), S77 – S84
89. Van den Heuvel M. W., Kleijn H. J., Peeters P. A. M.: Bioequivalence trial of orally disintegrating mirtazapine tablets and conventional oral mirtazapine tablets in healthy volunteers, *Clin. Drug Invest.*, 21 (2001), 437 – 442
90. Roose S. P.: Compliance: the impact of adverse events and tolerability on the physician's treatment decisions, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 13 (2003), S85 – S92
91. Janicki St.: Urzeczywistnienie idei leku wielokompartmentowego, *Farm. Pol.*, 3 (1999), 139 – 148
92. Park K, Yeo Y.: Microencapsulation technology, w: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Swarbrick J. (red.), Informa Healthcare, Nowy Jork (2007), 2315 – 2327
93. Sznitowska M.: Technologia mikrocząstek i nanocząstek jako nośników leku, *Farm. Pol.*, 21 (2001), 962 – 969
94. Mainardes R. M., Urban M. C., Cinto P. O i in.: Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery, *Curr. Drug Targets*, 6 (2005), 363 – 371
95. Thies C.: A survey of microencapsulation process, w *Microencapsulation. Methods and Industrial Applications*, Benita S. (red.), Marcel Dekker, Nowy Jork (1996), 1 – 19
96. Burgess D. J., Hickey A. J.: Microsphere technology and applications, w *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Swarbrick J. (red.), Informa Healthcare, Nowy Jork (2007), 2328 – 2338
97. Simpson N. E., Stabler Ch. L., Simpson Ch. P. i in.: The role of the CaCl₂ – guluronic acid interaction on alginate encapsulated βTC3 cells, *Biomaterials*, 25 (2004), 2603 – 2610
98. Danysz A.: *Kompendium farmakologii i farmakoterapii*, Urban i Partner, Wrocław (2002)
99. Deleu D., Northway M. G., Hanssens Y.: Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs used in the treatment of Parkinson's disease, *Clin. Pharmacokinet.*, 41 (2002), 261 – 309
100. Gerlach M., Youdim M. B. H., Riederer P.: Pharmacology of selegiline, *Neurology*, 47 (suppl. 3, 1996), S137 – S145
101. Rohatagi S., Barrett J. S., McDonald L. J. i in.: Selegiline percutaneous absorption in various species and metabolism by human skin, *Pharm. Res.*, 14 (1997), 50 – 55

102. Podlewski J. K., Chwalibogowska – Podlewska A., Adamowicz A. i in.: *Leki współczesnej terapii*, Split Trading, Warszawa (2007)
103. Keith S.: *Advances in psychotropic formulations*, Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry, 30 (2006), 996 – 1008
104. De la Torre R., Farre M., Navarro M.: *Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances*, Clin. Pharmacokinet., 43 (2004), 157 – 185
105. Pae Ch-U., Lim H-K., Han Ch. i in.: *Selegiline transdermal system: current awareness and promise*, Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry, 31 (2007), 1153 – 1163
106. Tetrad J. W., Koller W. C.: *A novel formulation of selegiline for the treatment of Parkinson's disease*, Neurology, 63 (2004), S2 – S6
107. Clarke A., Johnson E. S., Mallard N. i in.: *A new low-dose formulation of selegiline: clinical efficacy, patient preference and selectivity for MAO-B inhibition*, J. Neural. Transm., 110 (2003), 1257 – 1271
108. Allen L. V.: *Selegiline hydrochloride 10 mg/ml in Pluronic lecithin organogel*, Int. J. Pharm. Compound., 1 (2004), 59
109. Sriamornsak P., Kennedy R. A.: *Effect of drug solubility on release behavior of calcium polysaccharide gel-coated pellets*, Eur. J. Pharm. Sci., 32 (2007), 231–239
110. Sriamornsak P., Prakongpan S., Puttipatkhachorn S. i in.: *Development of sustained release theophylline pellets coated with calcium pectinate*, J. Control. Release, 47 (1997), 221 – 232
111. Sungthongjeen S., Sriamornsak P., Pitaksuteepong T. i in.: *Effect of degree of esterification of pectin and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets*, AAPS Pharm. Sci. Tech., 5 (2004), art. 9
112. Lopez – Ruiz B.: *Advances in the determination of inorganic anions by ion chromatography*, J. Chromatography A, 881 (2000), 607 – 627
113. Petelin M., Sentjurc M., Stolic Z., i in.: *EPR study of mucoadhesive ointments for delivery of liposomes into the oral mucosa*, Int. J. Pharm., 173 (1998), 193 – 202
114. Petelin M., Pavlica Z., Bizimoska S.: *In vivo study of different ointments for drug delivery into oral mucosa by EPR oximetry*, Int. J. Pharm., 270 (2004), 83 – 91
115. Wieland-Berghausen S., Schote U., Frey M. i in.: *Comparison of microencapsulation techniques for the water-soluble drugs nitenpyram and clomipramine HCl*, J. Control. Release, 85 (2002), 35 – 43
116. Lamprecht A., Yamamoto H., Takeuchi H. i in.: *Design of pH-sensitive microspheres for the colonic delivery of the immunosuppressive drug tacrolimus*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 58 (2004) 37 – 43

117. Safwat S. M., Al-Kassas R. S.: Evaluation of gentamicin-Eudragit microspheres as ophthalmic delivery systems in inflamed rabbit's eyes, *S. T. P. Pharma Sci.*, 12 (2002) 357 – 361
118. Vandamme Th. F., Lenourry A., Charrueau C. i in.: The use of polysaccharides to target drugs to the colon, *Carbohydr. Polym.*, 48 (2002), 219-231
119. Liu L., Fishman M. L., Kost J. i in.: Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route, *Bioamterials*, 24 (2003), 3333 – 3343
120. Sriamornsak P., Sungthongjeen S.: Modification of theophylline release with alginate gel formed in hard capsules, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 8 (2007), art. 51
121. Grant G.T., Morris E. R., Rees D. A. i in.: Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model, *FEBS Lett.*, 32 (1973), 195-198
122. El-Gibaly I.: Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 232 (2002), 199 – 211
123. Hagesaether E., Bye R., Sande S. A.: Ex vivo mucoadhesion of different zinc-pectinate hydrogel beads, *Int. J. Pharm.*, 347 (2008), 9 –15
124. Cal K., Janicki St., Sznitowska M.: In vitro studies on penetration of terpens from matrix-type transdermal systems through human skin, *Int. J. Pharm.*, 224 (2001), 81 – 88
125. Xu Q. A., Trissel L. A.: *Stability-Indicating HPLC Methods for Drug Analysis*, Pharmaceutical Press, Londyn (2003)
126. Dhalleine C., Doyen C., Assifaoui A.: Interactions between microparticles and dissolution media. How can be sure to use the right media for the development of an oral solid dosage forms?, 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona (2008)