

А.Н. Куличенко, М.Е. Михайлова, Д.А. Ковалёв, С.В. Писаренко, Ю.В. Сирица, Л.В. Ляпустина

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь, Российская Федерация

Сравнительное изучение фармакокинетики офлоксацина в свободной и ниосомальной форме в эксперименте на белых мышах при введении *per os*

Цель исследования: изучить особенности фармакокинетики офлоксацина в составе анионных ПЭГ-содержащих ниосом на основе сорбитана моностеарата (Span 60) при пероральном введении экспериментальным белым мышам. **Материалы и методы:** офлоксацин включали в ниосомы, состоящие из Span 60 холестерина, ПЭГ 4000 и дицетилфосфата. Размеры ниосом оценивали с помощью зондовой микроскопии. Эффективность включения антибиотика в ниосомы определяли после удаления свободного действующего вещества путем центрифугирования. Анализ количественного содержания офлоксацина в образцах осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. **Результаты:** изучены основные фармакокинетические параметры офлоксацина при введении экспериментальным белым мышам *per os* свободной и ниосомальной формы антибиотика. Показано, что при пероральном введении ниосомальной формы наблюдается снижение максимальной концентрации в сыворотке крови и увеличение времени полувыведения офлоксацина в среднем в 7,4 раза по сравнению со свободной формой. Установлено, что биодоступность офлоксацина в ниосомальной форме составляет 154% относительно свободной формы антибиотика. **Выводы:** ниосомальные микроконтейнеры являются перспективной технологией инкапсулирования и направленного транспорта антибактериальных препаратов через биологические барьеры. Использование ниосомальной формы офлоксацина может позволить значительно повысить эффективность лечения по сравнению со свободной формой, а также способствовать значительному снижению проявления негативных эффектов при антибиотикотерапии.

Ключевые слова: ниосомы, офлоксацин, микрокапсулирование.
(Вестник РАМН. 2014; 1–2: 80–84)

80

Введение

Офлоксацин (левофлоксацин) — антимикробный препарат из группы фторхинолонов широкого спектра действия. Известно, что офлоксацин эффективен в отношении преимущественно грамотрицательных и некоторых грамположительных бактерий, продуцирующих β-лактамазы и

устойчивых к большинству антибиотиков и сульфаниламидам. Офлоксацин характеризуется хорошим накоплением в клетках и тканях, и его выраженное бактерицидное действие обусловлено подавлением обеих субъединиц ДНК-гиразы и разрушением клеточной стенки бактерий, в связи с чем вероятность возникновения плазмидо- или хромосомно-опосредованной резистентности при антибиотикоте-

A.N. Kulichenko, M.E. Mikhailova, D.A. Kovalev, S.V. Pisarenko, U.V. Siriza, L.V. Lyapustina

The Federal Government Health Institution «Stavropol Plague Control Research Institute» of the Federal Service for Supervision in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare

Comparative Study of Pharmacokinetics of Ofloxacin in a Free and Niosomal Forms in Experiments on White Mice when Administered *Per Os*

Aim: to study features of pharmacokinetics of ofloxacin as a part of anion PEGylated niosomes on a basis of sorbitan monostearate (Span 60) to experimental white mice *per os*. **Materials and methods:** ofloxacin was entrapped in niosomes consisting of Span 60, cholesterol, PEG 4000 and dicetylphosphate. Sizes of niosomes estimated by means of probe microscopy. Efficiency of inclusion of an antibiotic in niosomes defined after removal of free drug by a centrifugation. The analysis of the quantitative contents of ofloxacin in samples carried out a method of a high performance liquid chromatography. **Results:** we studied the main pharmacokinetic parameters of ofloxacin when used free and niosomal forms of antibiotic to experimental white mice *per os*. It is shown that use of oral niosomal forms leads to decrease of maximal concentration in serum and increase of ofloxacin half-life by 7.4 times in average compared to the free form. It is determined that bioavailability of ofloxacin in the niosomal form is 154% relative to the free form of the antibiotic. **Conclusions:** niosomal microcontainers are perspective technology of encapsulation and the directed transport of antibacterial preparations through biological barriers. Using of niosomal formulation of ofloxacin is able to afford to increase considerably efficiency of treatment in comparison with a free form and significantly decrease negative effects of antibiotic therapy.

Key words: niosomes, ofloxacin, microencapsulation.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014; 1–2: 80–84)

рапии невысока [2]. Особую актуальность его применение имеет для лечения сепсиса, туберкулеза и других опасных инфекционных болезней, в т.ч. связанных с внутриклеточной персистенцией возбудителей.

Офлоксацин, как и другие препараты группы фторхинолонов, имеет побочные эффекты, такие как полиорганная токсичность, фотосенсибилизация, угнетение функции органов кроветворения и др. [2–4].

В настоящее время одной из перспективных стратегий повышения эффективности действия лекарственных препаратов является создание их новых форм с применением методов микрокапсулирования.

Ниосомы — это стабильные микроскопические везикулы, образованные одной или несколькими бислойнными мембранами различного состава. Широкое применение неионных поверхностно-активных веществ и липидов в конструировании подобных систем обусловлено их биосовместимостью, способностью к биодegradации, а также низкой токсичностью [5, 6].

Разработка ниосомальной формы офлоксацина может позволить снизить токсические эффекты при его применении, уменьшить оптимальную дозу препарата, а также обеспечить пролонгированное действие лекарственной субстанции в составе ниосом [7]. Снижение проявлений системной токсичности при использовании ниосомальных форм связано в первую очередь с уменьшением пиковой концентрации действующего вещества в крови за счет медленного высвобождения инкапсулята из ниосом вследствие диффузии через мембрану микровезикул и их деструкции под воздействием ферментов организма.

Ранее нами сообщалось об оптимизации технологии получения и стабилизации новой анионной полиэтиленгликоль (ПЭГ)-содержащей ниосомальной формы офлоксацина и оценке физико-химических свойств полученного ниосомального препарата [8].

Цель исследования: изучить особенности фармакокинетики офлоксацина в составе анионных ПЭГ-содержащих ниосом на основе сорбитана моностеарата при пероральном введении экспериментальным белым мышам.

Материалы и методы

Материал для исследования

Химические реактивы и фармацевтическая субстанция

При изготовлении ниосом использовали сорбитан моностеарат Span 60 молярной массой (ММ) 430,6 г/моль (Sigma Aldrich, США), холестерин ММ 513,67 г/моль (Sigma Aldrich, США), полиэтиленгликоль PEG 4000 ММ_{ср.} 4000 г/моль (Fluka, США), дицетилфосфат ММ 546,9 г/моль (Sigma Aldrich, США), хлороформ — степень чистоты для ВЭЖХ (Sigma Aldrich, США), калия фосфат однозамещенный (Amresco, США), кислоту трифторуксусную более 99% (Sigma-Aldrich, США), ацетонитрил — степень чистоты для ВЭЖХ (Sigma-Aldrich, США). Для определения эффективности включения антибиотика в ниосомы использовали спирт изопропиловый (Химсервис, Россия), офлоксацин (Sigma, США; Fluka, США, аналитический стандарт). Во всех описанных процедурах использовали воду типа 1, очищенную с помощью системы Simplicity (Millipore, США).

Изготовление ниосом

Ниосомальную форму офлоксацина получали методом обращенно-фазовой отгонки, описанным ранее [8].

Размер ниосомальных микровезикул

Размеры частиц ниосомальной дисперсии изучали с помощью сканирующей зондовой микроскопии в режиме контактной АСМ (универсальная сканирующая зондовая нанолaborатория NTEGRA Prima, NT-MDT, Россия) [8].

Очистка препарата от не включенного в ниосомы офлоксацина

Для определения эффективности включения офлоксацина в ниосомы невключенный антибиотик удаляли при помощи центрифугирования готовой дисперсии [8].

Методы исследования

Определение эффективности включения офлоксацина в ниосомы

Микровезикулы в составе свежечищенной дисперсии разрушали при помощи 50% раствора изопропилового спирта. Смесь фильтровали через фильтр Millex-GV 0,22 мкм/33 мм (Millipore, США) и центрифугировали при 2700 г в течение 10 мин. Супернатант использовали для количественного анализа содержания антибиотика и последующего расчета эффективности включения. Количественный анализ на содержание офлоксацина проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Эффективность включения (ЭВ) офлоксацина определяли относительно исходной концентрации по формуле:

$$\text{ЭВ} = C/C_{\text{исх.}} \times 100,$$

где ЭВ — эффективность включения офлоксацина в ниосомы, %; С — концентрация офлоксацина, инкапсулированного в ниосомы, мг/мл; С_{исх.} — исходная концентрация офлоксацина в растворе, мг/мл.

Определение концентрации офлоксацина в сыворотке крови экспериментальных мышей при введении препаратов *per os*

Эксперименты проведены на модели белых беспородных мышей весом 18–20 г, содержащихся в обычных условиях вивария. Животным однократно перорально вводили раствор офлоксацина (1-я группа, *n* =45) и ниосомальную форму антибиотика (2-я группа, *n* =45). Однократная доза составляла 0,16 мг офлоксацина. Контролем служили животные (3-я группа, *n* =27), получавшие стерильный физиологический раствор в аналогичном объеме. Концентрацию антибиотика в сыворотке крови экспериментальных животных определяли методом ВЭЖХ. Для этого пробы крови отбирали из сердца биопробных мышей через 30 мин, 1; 1,5; 3; 5; 8; 24; 30 и 48 ч после однократного введения соответствующего препарата. Образцы обрабатывали 30% по объему трифторуксусной кислотой и центрифугировали. Супернатант использовали в качестве образца для ВЭЖХ.

ВЭЖХ-анализ количественного содержания офлоксацина

Условия ВЭЖХ: хроматографическая система Konik Q12C (Konik, Испания), колонка Reprosil-Pur 300 ODS-3 250×3 мм, 5 мкм; предколонка Teknokroma Novafix C18 (ODS), 1×0,4 см; подвижные фазы: А — 0,025 М раствор калия фосфорнокислого однозамещенного, В — ацетонитрил. Режим элюирования градиентный: 80% А — 20% В → 20% А — 80% В в течение 10 мин. Скорость подвижной фазы — 1,0 мл/мин.

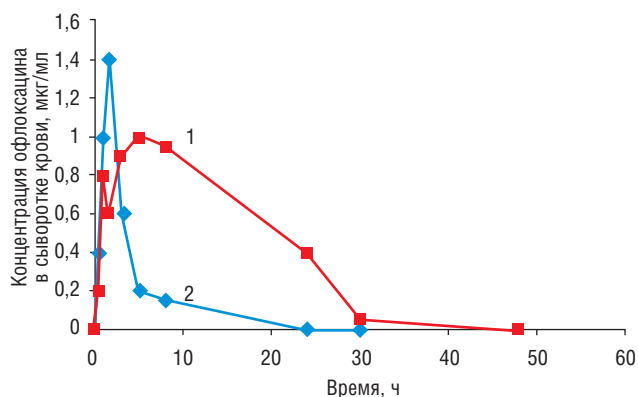


Рис. Усредненные фармакокинетические профили офлоксацина после однократного введения *per os* экспериментальным белым мышам в количестве 0,16 мг в ниосомальной (кривая 1) и в свободной форме (кривая 2).

Объем вводимой пробы составил 20 мкл. Температура термостата колонки — 30 °С; детекция — фотометрический детектор Konik UV-560 (Konik, Испания), определение проводили при аналитической длине волны $\lambda = 291$ нм. Для вычисления времени удерживания, площадей хроматографических пиков при детектировании и графического представления хроматограмм использовали программу Konikrom Plus (Konik, Испания). Время удерживания анализируемого пика офлоксацина составило $2,30 \pm 0,10$ мин.

Калибровочную кривую строили на основании значений площади пика офлоксацина на хроматограммах, полученных при анализе образцов сыворотки крови белых мышей, содержащих офлоксацин в диапазоне концентраций 0,08–40,0 мкг/мл (0,08; 0,8; 8,0; 40,0 мкг/мл). Линеаризацию кривой производили при помощи программы Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Коэффициент вариации результатов измерений составил 17,2% (при анализе образцов с концентрацией 0,08 мкг/мл) и 5,9% (при анализе образцов с концентрацией 40,0 мкг/мл).

Фармакокинетический анализ

Фармакокинетические параметры рассчитывали на основании кривой зависимости средней концентрации офлоксацина от времени после однократного введения свободной или ниосомальной формы антибиотика. Значения максимальной концентрации в сыворотке крови (C_{max}), времени достижения максимальной концентрации после введения препарата (T_{max}) и времени полувыведения антибиотика ($T_{1/2}$) определяли по индивидуальным графикам зависимости концентрации офлоксацина в сыворотке крови от времени. Площадь под фармакокинетическими кривыми «концентрация – время» ($AUC_{0-\infty}$) рассчитывали методом трапеций. Относительную биодо-

ступность ниосомальной формы антибиотика по отношению к свободной определяли по отношению:

$$AUC_{0-\infty, N} / AUC_{0-\infty}$$

Статистическая обработка данных

Для математико-статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ STATISTICA for Windows v. 6 (Statsoft Inc., США). Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения (M) \pm стандартное отклонение (SD). В качестве критерия прецизионности количественного определения содержания офлоксацина в ниосомальных препаратах использовали значение коэффициента вариации не более 2%. Анализ групповых различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента для несвязанных выборок при 95% уровне значимости. Различия между выборками считали достоверными при $p < 0,05$. В качестве критерия линейности результатов количественного определения содержания офлоксацина использовали значение коэффициента корреляции (r) $\geq 0,999$.

Результаты и обсуждение

В работе была получена анионная ПЭГ-содержащая экспериментальная ниосомальная форма офлоксацина состава Span60 – холестерин – ПЭГ-4000 – дицетилфосфат. На основании данных зондовой микроскопии было установлено, что среднее значение размера ниосом с включенным офлоксацином составляет 400 ± 50 нм (SD 3,13). Эффективность включения офлоксацина в ниосомы в опытных препаратах, согласно результатам проведенного анализа ВЭЖХ, была равна $75,0 \pm 2,0\%$.

Усредненные фармакокинетические профили офлоксацина в образцах сыворотки крови экспериментальных животных после однократного введения свободной или ниосомальной формы антибиотика, соответствующей 0,16 мг действующего вещества, представлены на рис.

Сравнительный анализ фармакокинетических параметров (табл.) офлоксацина показал, что максимальная концентрация антибиотика при введении ниосомальной формы в среднем на 28,4% ниже по сравнению со свободной формой. Уменьшение пиковой нагрузки при использовании новой лекарственной формы офлоксацина с сохранением терапевтической концентрации может в значительной степени способствовать минимизации проявления возможных побочных эффектов при проведении курса антибиотикотерапии.

При использовании раствора офлоксацина максимальная его концентрация в сыворотке крови достигалась в среднем через 1,5 ч после введения препарата, в то время как для препарата ниосомы офлоксацин C_{max} наблюдалась спустя 5 ч после введения. Ранее пролонгированное высвобождение офлоксацина в составе ниосом было отмечено в экспериментах по диализу препаратов

Таблица. Фармакокинетические параметры офлоксацина у экспериментальных белых мышей после однократного введения 0,16 мг антибиотика в свободной и ниосомальной форме, $\pm SD$

Исследуемые параметры	Раствор офлоксацина	Ниосомальная дисперсия с включенным офлоксацином
C_{max} , мкг/мл	$1,401 \pm 0,0502$	$1,002 \pm 0,1963$
T_{max} , ч	$1,5 \pm 0,5$	$5,0 \pm 2,0$
$T_{1/2}$, ч	$2,8 \pm 0,7$	$20,8 \pm 2,1$
$AUC_{0-\infty}$, мкг/мл·ч	$64,850 \pm 11,215$	$99,795 \pm 20,587$

в условиях *in vitro* [8]. Значительное смещение значения T_{max} при использовании ниосом с включенным антибиотиком может быть связано с тем, что ниосомальные микроконтейнеры выполняют функцию депо, медленно высвобождая инкапсулят.

При пероральном введении ниосомальные микровезикулы способны преодолевать кишечный барьер, после чего, вероятно, вступают в прямое взаимодействие с клетками нескольких типов, включая клетки крови, фагоциты в ретикуло-эндотелиальных тканях (в синусах печени и желчного пузыря) и эндотелий сосудов, высокоспециализированные клетки поверхности стенок кровеносных сосудов. Под воздействием специализированных ферментов происходит расщепление ковалентных химических связей отдельных компонентов на поверхности ниосом. Например, под действием эстераз сложноэфирные связи сорбитана моностеарата (Span 60) подвергаются гидролизу с образованием сорбитола и стеариновой кислоты, что приводит к медленному разрушению микрокапсул с высвобождением инкапсулированного вещества.

Следствием проявления эффекта медленного высвобождения действующего вещества в составе ниосом является увеличение площади под кривой «концентрация — время» ($AUC_{0-\infty}$) при использовании ниосомальной дисперсии в среднем в 1,54 раза по сравнению со свободной формой антибиотика, что свидетельствует о повышении эффективности применения офлоксацина в составе микрокапсулированного препарата.

Время полувыведения офлоксацина ($T_{1/2}$) в составе ниосом значительно превышало аналогичный показатель свободной формы (в среднем в 7,4 раза).

Установленные фармакокинетические параметры офлоксацина в составе ниосомальной дисперсии подтверждают сформулированные ранее предположения о стабильности ПЭГ-содержащих ниосомальных микровезикул на основе сорбитана моностеарата в условиях *in vivo* [8].

Наличие двух максимумов ($C_{max1} = 0,8$ мкг/мл, $T_{max1} = 0,5$ ч; $C_{max2} = 1,4$ мкг/мл, $T_{max2} = 5,0$ ч) на усредненной фармакокинетической кривой ниосомальной

формы офлоксацина, вероятно, обусловлено наличием в используемом препарате как действующего вещества в составе микровезикул, так и свободного антибиотика (до $25 \pm 2\%$ общей концентрации офлоксацина).

Основными причинами повышения биодоступности амфифильных соединений, в т.ч. и офлоксацина, включенных в ниосомы, по отношению к соответствующим свободным формам могут быть повышение эффективности абсорбции интактного антибиотика в присутствии неионогенного поверхностно-активного вещества (сорбитана моностеарата), обладающего способностью повышать проницаемость кишечной стенки, а также эффективным транспорт через кишечный барьер с высвобождением инкапсулированных в ниосомы веществ в отдельных органах и тканях организма в зависимости от размеров и состава ниосомальных микровезикул [9].

Заключение

Ниосомальные микроконтейнеры являются перспективной современной технологией инкапсулирования и направленного транспорта биологически активных веществ через биологические барьеры. В связи с этим особую значимость приобретает разработка и стандартизация методов конструирования и изучение новых ниосомальных форм лекарственных препаратов, в т.ч. антибиотиков, позволяющих значительно повысить эффективность лечения по сравнению с их свободными формами.

На основании данных, полученных в ходе исследований, доказано, что при введении анионной ПЭГ-содержащей ниосомальной формы офлоксацина на основе сорбитана моностеарата наблюдается снижение пиковой концентрации антибиотика по сравнению со свободной формой, что может способствовать снижению токсических эффектов при его применении, а также пролонгированию действия препарата вследствие эффекта депо, обеспечивающего постепенное высвобождение антибиотика в организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Солодовник В.Д. Микрокапсулирование. М.: Химия. 1980. 216 с.
2. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. М.: Догмат. 1998. 352 с.
3. Eva C.W., Ryan T., Norma A. A novel technique for localized drug delivery. *BioPhys. J.* 2009; 96: 681–687.
4. Pandey V.P., Deivasigamani K. Preparation and characterization of ofloxacin non-ionic surfactant vesicles for ophthalmic use. *J. Pharm. Res.* 2009; 2 (8): 1330–1334.
5. Mozafari M.R. Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications. Berlin: Springer. 2007. 166 p.
6. Uchegbu I.F., Vyas S.P. Nonionic surfactant-based vesicles (niosomes) in drug delivery. *Int. J. Pharm.* 1998; 172: 33–70.
7. Jain C.P., Vyas S.P. Preparation and characterization of niosomes containing rifampicin for lung targeting. *J. Microencap.* 1995; 12: 401–407.
8. Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Ашихмина М.А., Куличенко А.Н. Конструирование и характеристика ниосомных микровезикул для инкапсулирования офлоксацина на основе сорбитана моностеарата. *Биотехнология.* 2012; 6: 23–31.
9. Attia I.A., El-Gizawy S.A., Fouda M.A., Donia A.M. Influence of a niosomal formulation on the oral bioavailability of acyclovir in rabbits. *AAPS PharmSciTech.* 2007; 8 (4): Article 106.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Куличенко Александр Николаевич, доктор медицинских наук, директор ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15, тел.: (8652) 26-11-21, 26-03-49, e-mail: snipchi@mail.stv.ru

Михайлова Марина Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории подготовки специалистов ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15, тел.: (8652) 26-11-21, 26-03-49, e-mail: snipchi@mail.stv.ru

Ковалев Дмитрий Анатольевич, кандидат химических наук, руководитель сектора биохимии лаборатории подготовки специалистов ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15, **тел.:** (8652) 26-11-21, 26-03-49, **e-mail:** alcheem@mail.ru

Писаренко Сергей Владимирович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник сектора биохимии лаборатории подготовки специалистов ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15, **тел.:** (8652) 26-11-21, 26-03-49, **e-mail:** snipchi@mail.stv.ru

Сирица Юлия Владимировна, младший научный сотрудник сектора биохимии лаборатории подготовки специалистов ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15, **тел.:** (8652) 26-11-21, 26-03-49, **e-mail:** snipchi@mail.stv.ru

Ляпустина Лариса Вениаминовна, доктор медицинских наук, руководитель лаборатории подготовки специалистов ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15, **тел.:** (8652) 26-11-21, 26-03-49, **e-mail:** snipchi@mail.stv.ru