

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΙΠΟΣΩΜΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ CEFUROXIME VANCOMYCIN ΚΑΙ MOXIFLOXACIN

Ε. Νατσαρίδης^{1,2*}, Μ. Κανναβού^{1,2}, Μ. Μάντζαρη¹, Π. Σωτηροπούλου¹, Σ. Γ. Αντιμησιάρη^{1,2}

1 Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο 26504

2.ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ, Πλατάνι Ρίο 26504

(*natsaridis.e@upnet.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα λιποσώματα είναι σφαιρικά κυστίδια, αποτελούμενα από φυσικά ή τεχνητά λιπίδια, τα οποία τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για βιοϊατρικούς και για βιοτεχνολογικούς σκοπούς χάρη στις ικανότητές τους ως φορείς φαρμάκων. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της λιπιδικής σύστασης της μεμβράνης και της τεχνικής παρασκευής στον εγκλωβισμό των αντιβιοτικών cefuroxime, vancomycin και moxifloxacin σε λιποσώματα, καθώς και η μελέτη του ρυθμού απελευθέρωσης των τριών αυτών αντιβιοτικών από τις λιποσωμικές τους μορφές. Μελετήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ενσωμάτωσης αλλά και ο ρυθμός απελευθέρωσης των αντιβιοτικών από τις λιποσωμικές τους μορφές (in vitro).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν τη διαφορετική ικανότητα ενσωμάτωσης και απελευθέρωσης των λιποσωμικών αντιβιοτικών cefuroxime, vancomycin και moxifloxacin ανάλογα με τη σύσταση, το μέγεθος αλλά και το φορτίο των λιποσωμάτων. Σήμερα, τα αντιβιοτικά αυτά χρησιμοποιούνται σε ασθενείς κατά τη διάρκεια καθώς και ύστερα από το χειρουργείο καταρράκτη για την αποφυγή της μετεγχειρητικής ενδοφθαλμίτιδας. Με την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ενσωμάτωσης των αντιβιοτικών, είτε μόνα τους, είτε σε συνδυασμούς στα λιποσώματα, μελλοντικός στόχος είναι ο in vivo έλεγχος της αντιβακτηριακής τους δράσης ύστερα από ενδοβολβική χορήγησή σε επίμυες.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα λιποσώματα είναι κολλοειδή σωματίδια σφαιρικού σχήματος τα οποία περιέχουν μία ή περισσότερες διπλοστιβάδες λιπιδίων που εναλλάσσονται με υδατικά τμήματα και τα οποία σχηματίζονται αυθόρμητα όταν τα λιπίδια διασπείρονται σε ένα υδατικό μέσο δημιουργώντας ένα πληθυσμό κυστιδίων το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από μερικές δεκάδες νανομέτρων έως δεκάδες μικρομέτρων σε διάμετρο. Τα λιποσώματα αποτελούν σημαντικό αντικείμενο έρευνας ως συστήματα μεταφοράς διαφόρων φαρμάκων εξαιτίας της ικανότητάς τους να ενσωματώνουν βιοδραστικά υδρόφιλα, αμφίφιλα αλλά και λιπόφιλα μόρια τόσο στην εσωτερική υδατική φάση, όσο και εσωτερικά της λιπιδικής διπλοστιβάδας^[1,2]. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η ικανότητα διαφορετικών λιποσωμικών συστάσεων να ενσωματώνουν τρία διαφορετικά αντιβιοτικά, τα cefuroxime, vancomycin και moxifloxacin^[3,4,5]. Τα τρία αντιβιοτικά αυτά χρησιμοποιούνται σήμερα σε ασθενείς κατά τη διάρκεια καθώς και ύστερα από το χειρουργείο καταρράκτη για την αποφυγή της μετεγχειρητικής ενδοφθαλμίτιδας ^[6,7,8] με τα τρία αντιβιοτικά αυτά να παρουσιάζουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση. Κατά τη λοίμωξη προκαλούνται ανεπανόρθωτες βλάβες στα φωτοϋποδεκτικά κύτταρα του αμφιβλίστροειδούς οι οποίες οδηγούν στην απώλεια της όρασης^[9]. Παρά την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών αυτών κατά τη διάρκεια και ύστερα από χειρουργική επέμβαση καταρράκτη, δεν έχει γίνει εκτενής μελέτη της ικανότητας εγκλωβισμού τους σε λιποσωμικές μορφές, του ρυθμού απελευθέρωσης καθώς και της αντιβακτηριακής δράσης τους.

ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Με στόχο τη μελλοντική μελέτη της δραστηριότητας των λιποσωμικών μορφών *in vivo* σε επίμυες ύστερα από ενδοβολβική χορήγηση, έγινε μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών λιπιδικών συστάσεων, καθώς και της προσθήκης αρνητικού φορτίου στην ενσωμάτωση των αντιβιοτικών cefuroxime, vancomycin και moxifloxacin στα λιποσώματα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Παρασκευή λιποσωμάτων: Λιποσωμικές μορφές PC (φωσφατιδυλοχολίνη), PC:CHOL (χοληστερόλη) (2:1), PC: CHOL (1:1), PC:PG(φωσφατιδυλγλυκερόλη):CHOL (8:2:5) και PC:PG:CHOL (9:1:5) προετοιμάστηκαν μέσω της τεχνικής σχηματισμού λεπτού υμενίου κατά την εξάτμιση του διαλύματος λιπιδίου σε οργανικό διαλύτη. Ακολούθησε ενυδάτωση του υμενίου με διάλυμα PBS και μηχανική ανάδευση της φιάλης (vortex). Στο στάδιο αυτό λαμβάνεται μία θολερή διασπορά με πολυστιβαδικά λιποσώματα μεγάλου μεγέθους MLV τα οποία μετατρέπονται σε SUV από την Ακίδα Υπερήχων. Το στάδιο του annealing ακολουθεί κατά το οποίο τα λιποσώματα επωάζονται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία μετάπτωσης των λιπιδίων. Τα προς ενσωμάτωση αντιβιοτικά προστίθενται στα άδεια λιποσώματα και τα δύο μαζί λυοφιλοποιούνται. Τα λιποσώματα διασπώνται από τη λυοφιλοποίηση και τότε κατά τη διάρκεια της ελεγχόμενης ενυδάτωσης τα αντιβιοτικά εισέρχονται στο εσωτερικό των ήδη διασπασμένων κυστιδίων τα οποία θα σχηματίσουν μεγάλα πολυστιβαδικά σφαιρίδια (MLV) με υψηλή συγκέντρωση ενσωματωμένου φαρμάκου. Τα πολυστιβαδικά σφαιρίδια περνούν σταδιακά από φίλτρα με διάμετρο πόρων 400 και 100nm αντίστοιχα, με αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε μικρά μονοστιβαδικά κυστίδια (SUV).^[10] Στη συνέχεια τα λιποσώματα περνούν από στήλη μοριακού αποκλεισμού (sephadex) έτσι ώστε το λιποσωμικό φάρμακο να διαχωρίζεται από το ελεύθερο φάρμακο το οποίο δεν έχει εγκλωβιστεί στα λιποσώματα.

Χαρακτηρισμός λιποσωμάτων: Το μέγεθος (size), η πολυδιασπορά (polydispersity) και το φορτίο (z potential) των λιποσωμάτων μετريούνται με το nanozetasizer.

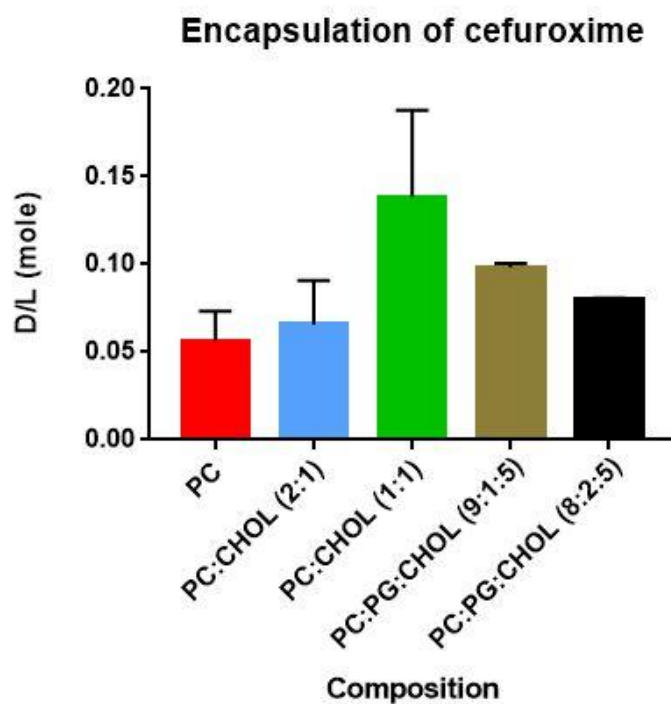
Μέτρηση της ενσωμάτωσης των αντιβιοτικών: Μέσω του πρωτοκόλου stewart ^[11] μετρήθηκε η λιπιδική συγκέντρωση στο φωτόμετρο καθώς ενώ η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της HPLC. Τελικά υπολογίσθηκε ο λόγος **D (συγκέντρωση φαρμάκου σε mole)/L (συγκέντρωση λιπιδίου σε mole)** των δειγμάτων για να γίνει η σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών συστάσεων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της ενσωμάτωσης και χαρακτηρισμού των τριών αντιβιοτικών στις διαφορετικές λιποσωμικές συστάσεις φαίνονται στα παρακάτω σχήματα.

composition	size	pdi	zeta (-)
pc	156.37± 17.52	0.134	3.76± 0.58
pc:chol 2:1	188.57± 10.89	0.244	3.16± 0.25
pc:chol 1:1	173.5± 21.78	0.178	3.51± 0.82
pc:pg:chol 9:1:5	162.1± 2.05	0.111	12.47± 0.15
pc:pg:chol 8:2:5	144.07± 1.19	0.097	22.97± 0.75

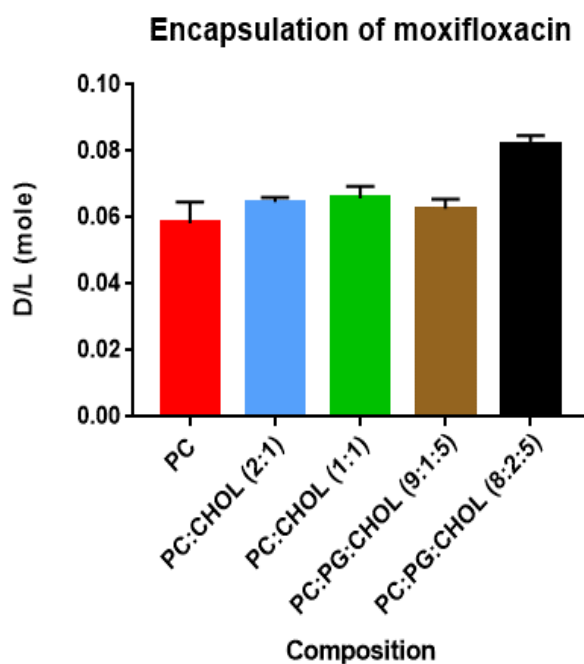
Σχήμα 1. Χαρακτηρισμός των διαφορετικών λιποσωμικών συστάσεων για το αντιβιοτικό *cefuroxime*.



Σχήμα 2. Ενσωμάτωση του αντιβιοτικού *cefuroxime* σε διαφορετικής σύστασης λιποσωμικές μορφές.

composition	size	pdi	zeta (-)
pc	140.87± 1.88	0.132	1.24± 0.41
pc:chol 2:1	193.67± 6.5	0.335	3.02± 0.28
pc:chol 1:1	183.07 ± 6.13	0.192	3.02± 0.27
pc:pg:chol 9:1:5	139.87± 1	0.118	13.37± 0.05
pc:pg:chol 8:2:5	133.1± 1.24	0.089	22.9± 0.7

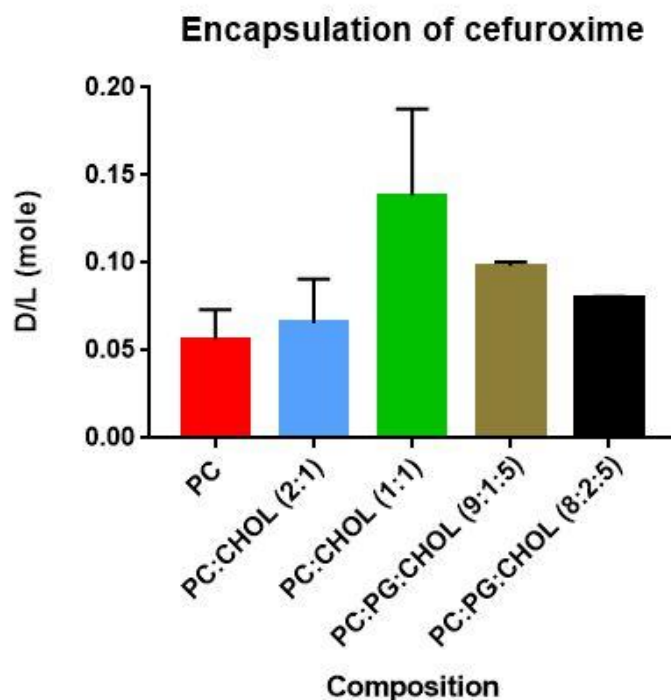
Σχήμα 3. Χαρακτηρισμός των διαφορετικών λιποσωμικών συστάσεων για το αντιβιοτικό *moxifloxacin*.



Σχήμα 4. Ενσωμάτωση του αντιβιοτικού *moxifloxacin* σε διαφορετικής σύστασης λιποσωμικές μορφές.

composition	size	pdi	zeta (-)
pc	127.37± 0.76	0.211	1.24± 0.59
pc:chol 2:1	154.47± 11.19	0.282	3.02± 0.35
pc:chol 1:1	180.17± 4.63	0.193	3.02± 0.32
pc:pg:chol 9:1:5	153.84± 3.42	0.135	13.37± 0.55
pc:pg:chol 8:2:5	147.83± 3.28	0.124	22.9± 0.3

Σχήμα 5. Χαρακτηρισμός των διαφορετικών λιποσωμικών συστάσεων για το αντιβιοτικό *vancomycin*.



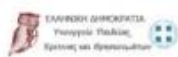
Σχήμα 6. Ενσωμάτωση του αντιβιοτικού vancomycin σε διαφορετικής σύστασης λιποσωμικές μορφές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Και τα τρία αντιβιοτικά που μελετήθηκαν φαίνεται ότι έχουν τη δυνατότητα ενσωμάτωσης σε λιποσωμικές μορφές. Από τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι όσον αφορά το αντιβιοτικό cefuroxime, το φορτίο δεν επηρεάζει την ικανότητα ενσωμάτωσης του αντιβιοτικού ενώ η υψηλότερη ενσωμάτωση παρατηρείται στη σύσταση PC:CHOL (1:1). Στο αντιβιοτικό moxifloxacin η ενσωμάτωση του αντιβιοτικού δεν επηρεάζεται ούτε από τη σύσταση αλλά ούτε και από το φορτίο των λιποσωμάτων. Στο αντιβιοτικό vancomycin η μικρότερη ενσωμάτωση του αντιβιοτικού παρατηρείται στη σύσταση PC, η λιπιδική σύσταση PC:CHOL (2:1) παρουσιάζει μεγαλύτερη ενσωμάτωση του αντιβιοτικού, ενώ η υψηλότερη ενσωμάτωση παρουσιάζεται στη λιπιδική σύσταση PC:CHOL (1:1). Η προσθήκη αρνητικού φορτίου δεν προκάλεσε καμία αλλαγή στην ικανότητα ενσωμάτωσης του αντιβιοτικού vancomycin. Με την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ενσωμάτωσης των αντιβιοτικών, είτε μόνα τους, είτε σε συνδυασμούς στα λιποσώματα, μελλοντικός στόχος είναι ο *in vitro* αλλά και ο *in vivo* έλεγχος της αντιβακτηριακής τους δράσης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε την Ειδική Υπηρεσία Διαχείρισης Επιχειρησιακού Προγράμματος, Ανταγωνιστικότητα Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία (ΕΥΔ ΕΠΑνΕΚ) και την Ειδική Υπηρεσία Διαχείρισης και Εφαρμογής Δράσεων στους τομείς Έρευνας Τεχνολογικής Ανάπτυξης και Καινοτομίας (ΕΥΔΕ ΕΤΑΚ) που υπάγονται στο επιχειρησιακό πρόγραμμα «ΕΠΑνΕΚ 2014-2020 Ανταγωνιστικότητα-Επιχειρηματικότητα-Καινοτομία», στο πλαίσιο της Δράσης Εθνικής Εμβέλειας «ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ», για τη χρηματοδότηση της παρούσας έρευνας με τίτλο: «Προκλινική ανάπτυξη καινοτόμων μορφών αντιβιοτικών για ενδοφθάλμια χορήγηση για τη θεραπεία/πρόληψη της μετεγχειρητικής ενδοφθαλμίτιδας (INNOFOR-I)» και κωδικό πράξης (MIS) 5031792.



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Antimisiaris, P Kallinteri, & D.G Fatouros, Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing, (2010), 1-91.
- [2] R. Nisini, N. Poerio, S. Mariotti, F, De Santis, & Fraziano, M. Frontiers in immunology, (2018), 9, 155.
- [3] B, Singh, P. R. Vuddanda, M.R. Vijayakumar, V. Kumar, P.S. Saxena, & S. Singh, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, (2014), 121, 92-98
- [4] A. Hamed, R. Osman, S. Mansour and A. S. Geneidi. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research (2016)
- [5] J. Liu, Z. Wang, F. Li, J. Gao, L. Wang, & G. Huang. asian journal of pharmaceutical sciences, (2015) 10(3), 212-222.
- [6] M. C. García-Sáenz, A. Arias-Puente, G. Rodríguez-Caravaca, & J.B. Bañuelos,. Journal of Cataract & Refractive Surgery, (2010), 36(2), 203-207.
- [7] A. Haripriya, D.F. Chang, S. Namburar, A. Smita, & R.D. Ravindran, Ophthalmology, (2016), 123(2), 302-308.
- [8] K.J. Chen, T.L Chen, C.C. Lai, & M.H. Sun, Journal of clinical microbiology, (2008),46(6), 2149-2149.
- [9] Callegan, M. C., Engelbert, M., Parke, D. W., Jett, B. D., & Gilmore, M. S. (2002). Bacterial endophthalmitis: epidemiology, therapeutics, and bacterium-host interactions. Clinical Microbiology Reviews, 15(1), 111-124
- [10] S.G. Antimisiaris, In Liposomes (pp. 23-47). Humana Press, New York, NY, (2017).
- [11] J.C.M. Stewart, Analytical biochemistry, (1980),104(1), 10-14.