

УДК: 615.23/458

# Экспериментальное исследование липосомальной формы фенотерола после совершенствования методики ее получения

©2020. Т.М. Устинова<sup>1</sup>, Н.Г. Венгерович<sup>1,2</sup>, М.А. Юдин<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины  
Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

\* e-mail: gniiivm\_15@mil.ru

Поступила в редакцию 20.05.2020 г.

После доработки 02.06.2020 г.

Принята к публикации 29.06.2020 г.

Проведено исследование влияния различной концентрации криопротектора (сахарозы) на показатель эффективности включения фенотерола в липидную матрицу в процессе лиофилизации. Показано, что липосомальная форма с содержанием криопротектора во внутренней среде липосом, равным 2,5%, а во внешней – 2%, обеспечивает длительное сохранение препарата в полости липосом. При данных условиях удается достичь монодисперсного распределения частиц с медианным диаметром  $4,28 \pm 1,62$  мкм. Предположительный количественный состав криопротектора обеспечивает технологичность процесса получения липосом, позволяет повысить стабильность структуры лиофилизата и предотвратить слипание частиц, обеспечивая их однородность.

В условиях *in vitro* показан профиль двухэтапного высвобождения фенотерола из липосомальной формы. Первый этап быстрого высвобождения характеризовался переходом в свободную форму до 42% инкапсулированного фенотерола в течение 15 минут. На втором в течение 480 минут высвобождение активного начала происходило медленнее.

На модели бронхоспазма, индуцированного 1%-м гистамином, показано преимущество липосомальной формы фенотерола по сравнению с его свободной формой в виде водного раствора. Интратрахеальное введение липосомальной формы фенотерола в дозе 17 мкг/кг обеспечивало в течение 360 минут сохранение функции внешнего дыхания на уровне исходных значений, несмотря на ингаляцию гистамином, тогда как длительность действия фенотерола не превышала 120 минут.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** липосомы; криопротектор; лиофилизация; pH-градиент; бронхоконстрикция; гистамин;  $\beta_2$ -агонисты; фенотерол; внешнее дыхание

DOI: 10.17816/phf34272/2713-153X-2020-2-2-30-37

## СОКРАЩЕНИЯ:

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких;

ФВД – функции внешнего дыхания;

ДО – дыхательный объем;

МОД – минутный объем дыхания.

## ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день подходы в лечении синдрома бронхиальной обструкции включают фармакологическое воздействие на бронхоспазм, воспаление и отек слизистой оболочки бронхов. В качестве препаратов купирования бронхоспазма используют ингаляционные  $\beta_2$ -агонисты короткого и длительного действия. По рекомендациям Министерства здравоохранения РФ «Хроническая обструктивная болезнь легких» пациентам предлагается использовать короткодействующие бронходилататоры (фенотерол, сальбутамол) по потребности [1]. В случае ХОБЛ средней тяжести используют сочетание короткодействующих бронходилататоров с антибиотиками/пероральными глюкокортикостероидами [2–5]. Одним из способов коррекции таких случаев может выступать липосомальная форма фенотерола, которая позволит увеличить длительность циркуляции короткодействующего  $\beta_2$ -агониста и обеспечит противовоспалительный эффект.

Эти обстоятельства послужили причиной разработки пролонгированной формы фенотерола на основе липидных матриц [6]. Показано, что включение его в липосомы улучшает проникновение в ткань легких и пролонгирует бронходилатирующее действие. Однако разработка таких матриц предполагает усложнение технологического процесса.

Создание композиций на основе липосом и их модификаций следует считать перспективным средством доставки, обеспечивающим пролонгированное и контролируемое высвобождение лекарственных средств в ткань легких при ингаляционной терапии [7]. В литературе показаны преимущества использования липосомальных форм лекарственных средств по сравнению с их свободной формой, а также возможность моделировать профиль их высвобождения за счет изменения состава липидных матриц [8]. Физико-химические свойства, контролируемый размер частиц, морфологические характеристики, мембранотропность и биосовместимость позволяют выделить липосомы как отдельную форму инертного носителя лекарственных средств. Липосомальная система представляет собой коллоидную дисперсную среду, которая характеризуется слабой термодинамической устойчивостью, что определяет необходимость подбора способов для ее стабилизации. К одному из таких способов следует отнести лиофилизацию [9, 10].

Лиофилизация представляет собой мягкий процесс высушивания липосомальной дисперсии путем возгонки растворителя и позволяет предотвратить процессы гидролиза фосфолипидов. При этом может произойти разрушение бислойной мембраны частиц, в связи с чем подбор условий и режимов лиофилизации с добавлением криопротектора приобретает особую значимость [11, 12].

Показано, что введение сахарозы как криопротектора на стадиях получения липосом позволяет минимизировать слипание и агрегацию частиц, снизить утечку включенного препарата, позволяет сохранить способность полученных частиц к регидратации, а также профиль их распределения.

К криопротекторам, разрешенным к клиническому использованию, относят следующие группы соединений: спирты (этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерин),

амиды (диметилацетамид), оксиды (диметилсульфоксид), синтетические полимеры (поливинилпирролидон, крахмал, полиэтиленгликоль), углеводы (сахароза, маннит, лактоза, трегалоза) [13–15]. При этом только дисахариды (сахароза и трегалоза) благодаря относительно высокой температуре стеклования сохраняют проницаемость мембраны и минимизируют процесс «утечки» препарата из липосомы [16, 17].

**Цель исследования** – исследовать влияние криопротектора сахарозы на физико-химические показатели качества липосом для ингаляционного введения фенотерола и оценить их эффективность на модели бронхоспазма индуцированного гистамином.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для приготовления липосом использовали L-а-фосфатидилхолин яичный 95% (Avanti Polar Lipids), холестерол 99% (Sigma Aldrich), янтарную кислоту 99% (Bioxta, Sigma Aldrich), D(+)-сахарозу 99% HPLC (Fluka), Сефадекс LH-60 (Pharmacia Fine Chemicals), Hepes буфер 1 М (Lonza), сульфат аммония ХЧ («Нева реактив»). В качестве растворителей применяли хлороформ ХЧ («Экос-1») и метанол ХЧ («Экос-1»).

Загрузку фенотерола в липосомы осуществляли при трансмембранном градиенте против сульфата аммония [18, 19]. Фенотерол (субстанция, Sigma-Aldrich) включали в липосомы (фосфолипид : холестерин – 7:3) в соотношении препарат/липид – 0,12/1.

Для получения липидной матрицы состава фосфолипид и холестерин в мольном соотношении 7:3 использовали «пленочный» метод. Для этого липидные компоненты растворяли в смеси хлороформ : метанол в соотношении 1:1 (об./об.). Полученный раствор упаривали на ротаторном испарителе HEI-VAP Value DIGITAL G3B при температуре выше температуры фазового перехода яичного фосфатидилхолина ( $38 \pm 2$  °C) до формирования однородной полупрозрачной липидной пленки. Пленку высушивали под вакуумом в течение 2 часов для удаления остатков растворителей. Для создания первичного рН-градиента полученную пленку гидратировали в 6 мл 125 мМ стерильного раствора сульфата аммония, содержащего 2,5% сахарозы, при 45 °C в течение 30 мин. В результате формировалась дисперсия больших многослойных липосом, из которых посредством последовательной экстракции (10 циклов) получали малые однослойные липосомы. Экстракцию проводили с использованием поликарбонатных мембранных фильтров Nuclepore с диаметром пор 400 нм с помощью ручного мини-экструдера Avanti Mini-Extruder при нагревании до 45 °C. Очистку липосомальной дисперсии от свободного сульфата аммония осуществляли с использованием гель-фильтрации на колонке, заполненной Сефадексом LH-60.

Очищенные липосомы смешивали с 4 мл буфера 10 мМ HEPES и 145 мМ хлорида натрия (рН 8,2–8,4), содержащего навеску фенотерола, рассчитанного согласно коэффициенту загрузки препарат/суммарные липиды, равному 0,12/1. Далее рН дисперсии доводили до значения 9,0 и инкубировали на водяной бане в течение 1,5 часа при температуре 45 °C.

Для очистки липосомальной формы от не включившегося в везикулы фенотерола использовали колоночную хроматографию. В хроматографическую колонку С 10/20, заполненную сефадексом LH-60 и предварительно уравновешенную 0,15 М раствором натрия хлорида, вносили 1 мл липосомальной формы и элюировали 0,15 М раствором натрия хлорида. Детекцию проводили при длине волны  $\lambda=223,5$  нм с помощью спектрофотометра HITACHI U-2900. Эффективность включения фенотерола рассчитывали по формуле:

$$\text{Эффективность включения} = \frac{\text{Количество фенотерола в липосомах, мкг}}{\text{Общее количество фенотерола, мкг}} \times 100\%$$

Свежеприготовленную дисперсию липосом дозировали по 2 мл во флаконы из темного стекла вместимостью 7,5 мл. Далее препарат подвергали быстрой заморозке до  $-45$  °С и выдерживали в течение 12 час. Замороженные липосомы помещали на охлажденную до  $-40$  °С полку сублимационной камеры FreeZone Triad (Labconco), выдерживали в течение 3 час. и подвергали лиофилизации.

После включения вакуумного насоса и выравнивания вакуума осуществляли:

- нагрев полки от  $-40$  до  $-25$  °С со скоростью 5 °С/ч с последующим выдерживанием при этой температуре в течение 30 час.;
- нагрев полки от  $-25$  до 0 °С со скоростью 5 °С/ч с последующим выдерживанием при этой температуре в течение 5 час.;
- нагрев полки от 0 до  $+20$  °С со скоростью 5 °С/ч с последующим выдерживанием при этой температуре в течение 5 час.

После достижения температуры 20 °С (при неизменности остаточного давления паров в сублимационной камере) образец выдерживали в течение 3 час. (досушивание).

Содержимое флакона регидратировали 2 мл деионизированной водой, встряхивали и проводили измерения распределения везикул по размеру, определяли содержание фенотерола в липосомах. Анализ распределения липосом по размерам проводили с использованием лазерного дифракционного анализатора размера частиц Mastersizer 3000 с модулем диспергирования серии Hydro MV.

Оценку высвобождения инкапсулированного фенотерола из липосом методом *in vitro* осуществляли с помощью диализа. Для этого 1 мл липосомальной дисперсии вносили для диализа в мешочек, концы которого были закреплены. Диализный мешочек помещали в 20 мл буфера PBS (рН=7,4), устанавливали на магнитную мешалку при 37 °С и перемешивали со скоростью 50 об./мин. Через определенные промежутки времени (0, 15, 30, 60, 90, 120, 360, 480, 720 мин) из среды отбирали пробы по 1 мл, которые анализировали на спектрофотометре HITACHI U-2900. Степень высвобождения фенотерола из липосомальной формы препарата сравнивали с высвобождением его свободной формы в эквивалентном количестве.

Экспериментальные исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах. Животные были получены из сертифицированного питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.) и содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабора-

торными грызунами и кроликами». Все работы с животными выполняли по общепринятым этическим нормам обращения с животными, соответствующим правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Эффективность липосомальной формы фенотерола исследовали на модели бронхоспазма, вызываемого у ненаркотизированных крыс с помощью бронхоконстриктора. Бронхоспазм индуцировали аэрозольным воздействием 1%-ного раствора гистамина посредством ультразвукового небулайзера. Крысу помещали в камеру плетизмографа (Emka Technologies), к которой подсоединяли небулайзер. Время экспозиции составляло 45 сек.

Бронхоконстрикцию оценивали по изменениям функции внешнего дыхания (дыхательный объем, мл; минутный объем дыхания, мл/мин; частота дыхания, ед./мин; интегральный показатель бронхоконстрикции). Интегральный показатель (penh) зависит от отношения времени эластичного сокращения легких к общему времени выдоха и от отношения максимального экспираторного потока к максимальному инспираторному потоку (формула 1).

$$\text{Penh} = \left( \frac{TE}{RT} - 1 \right) \times \frac{PEF}{PIF}$$

- где TE – время выдоха, мс;
- RT – время релаксации, мс;
- PEF – максимальное время выдоха, мл/с;
- PIF – максимальное время вдоха, мл/с.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 2010. Данные представлены в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD). Проверку на нормальность распределения количественных данных осуществляли по критерию нормальности Колмогорова – Смирнова и критерию Шапиро – Уилка. Равенство дисперсий определяли в тесте Левена. При сравнении двух независимых групп и определении статистической значимости использовали непараметрический метод не связанных выборок U-критерий Манна – Уитни. Для сравнения нескольких независимых групп и определения значимости межгрупповых различий в исследуемых показателях использовали критерий Краскела – Уоллиса. Для всех видов анализа различия считали статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основной задачей подбора оптимальных условий лиофилизации является оптимизация температурных процессов сублимации и необходимого количества криопротектора. Определение данных условий позволяет предотвратить коллапс аморфной структуры, который может возникнуть в ходе лиофилизации.

В липосомальной системе криопротектор может находиться во внутренней среде липосомы, во внешней среде или как во внешней, так и во внутренней. Исходя из этого, на разных стадиях получения липосом в систему вводится криопротектор. Выбор необходимого количества криопротектора основывается на результатах качественного и количественного анализа так, чтобы происходила минимальная потеря

фенотерола и сохранность липосомальной дисперсии в ходе лиофилизации. В качестве криопротектора использовали сахарозу, концентрация которой во внутреннем пространстве липосом была постоянна и составляла 2,5%, а ее концентрация во внешней среде находилась в диапазоне от 0 до 8%. Данные о распределении размера частиц и эффективности включения фенотерола в липосомы представлены в табл. 1.

Установлено, что в процессе лиофилизации утечка препарата происходила независимо от количества криопротектора во внешнем пространстве. Увеличение концентрации сахарозы снижало концентрацию фенотерола в липосоме. Так, при содержании сахарозы 2% регистрировали снижение с  $31,1 \pm 4,15$  до  $19,1 \pm 4,98$ %. При 8% эффективность включения была минимальной и после лиофилизации составляла  $4,64 \pm 1,37$ %. В образцах с содержанием сахарозы 4 и 8% регистрировали коллапс. Лيوфилизат при этом представлял собой неоднородную массу с расслоением пористой структуры по поверхности флакона. Коллапс был связан с тем, что в ходе сублимационной сушки образовывавшаяся структура липосомальной дисперсии разрушалась при прохождении границы сублимационного раздела фаз.

Введение сахарозы (от 2 до 8%) во внешнюю среду готовых липосомальных частиц приводило к увеличению медианного объемного диаметра частиц. При этом для эффективного ингаляционного введения лекарственных средств необходимо поддержание масс-медианного аэродинамического диаметра частиц в диапазоне 2–5 мкм, что обеспечивает поступление липосомальной формы в терминальные отделы трахеобронхиального дерева.

Так, липосомальная дисперсия, не содержащая во внешней среде сахарозу, склонна к увеличению размера липосом после лиофилизации примерно в 20 раз выше по сравнению с размером липосом до процесса лиофилизации. При использовании криопротектора в максимальных концентрациях прирост составляет 10 раз. Количественное содержание криопротектора также оказывает влияние на профиль распределения частиц липосом по объему (рис. 1).

Из представленных графиков видно, что сахароза в долевом содержании 0–2% обеспечивала монодисперсное распределение частиц с одним узким и симметричным пиком с медианным размером 4,28–5,94 мкм. Увеличение концентрации сахарозы до 4–8% способствовало агрегации частиц в диа-

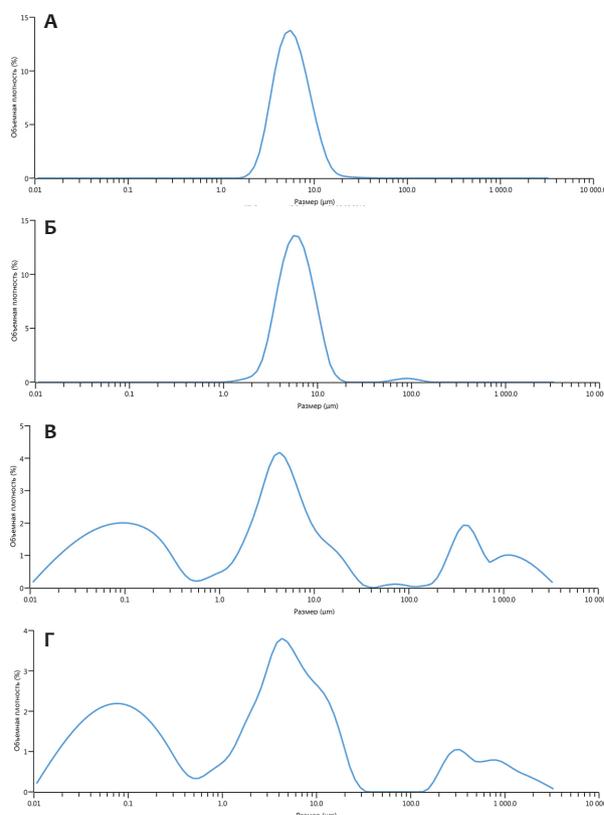


Рис. 1. Распределение липосом фенотерола по объему при различном содержании сахарозы А – 0%, Б – 2%, В – 4%, Г – 8%

Fig. 1. Distribution of fenoterol liposomes by volume with different sucrose content

пазоне от 0 до 1 мкм и от 100 до 1000 мкм и характеризовалось полимодальным распределением. Основной пик с медианным распределением по размеру частиц имел асимметричный вид с широкой площадью под кривой распределения, размер полученных частиц составил от 2,69 до 3,78 мкм.

Концентрация криопротектора 2,5% во внутреннем пространстве липосомы и 2% во внешней фазе дисперсии позволяет сохранить концентрацию фенотерола, предотвращает агрегацию частиц и обеспечивает получение монодисперсных частиц с размером 4,28±1,62 мкм.

Влияние содержания криопротектора на качество лиофилизированной формы фенотерола (n=8, M±SE)

Табл. 1.

Influence of cryoprotector content on the quality of the lyophilized form of fenoterol (n=8, M±SE)

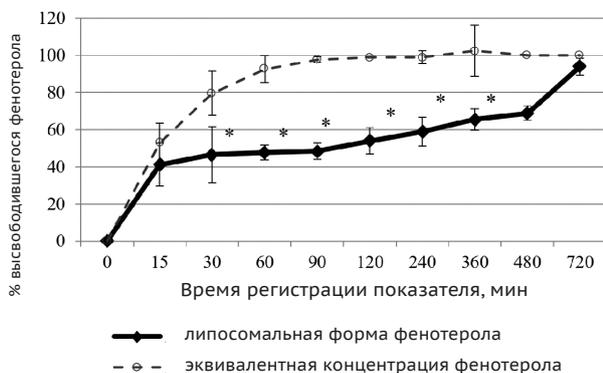
Table 1.

Криопротектор, %	Эффективность включения, %		Распределение размера частиц по объему, мкм			
	До лиофилизации	После лиофилизации	Dv <sub>50</sub> до лиофилизации	Dv <sub>10</sub>	Dv <sub>50</sub>	Dv <sub>90</sub>
Внешняя фаза						
0	29,9±2,90	16,0±2,73	0,26±0,127	3,62±1,81	5,94±0,025	10,4±3,22
2	31,1±4,50	19,06±4,98		0,087±0,025	4,28±1,62	12,4±2,39
4	26,7±4,15	7,92±2,71		0,052±0,014	3,78±1,78	579±177,7
8	32,7±2,32	4,64±1,37		0,033±0,018	2,69±1,01	396±120,9

Примечания:

1. Dv<sub>10</sub> – размер, меньше которого оказывалось 10% частиц образца;
2. Dv<sub>50</sub> – медианный диаметр;
3. Dv<sub>90</sub> – размер, меньше которого оказывалось 90% частиц образца.

В экспериментах *in vitro* с имитацией физиологической среды для контроля качества липосомальной формы оценивали профиль высвобождения действующего вещества из полости липосом. Результаты высвобождения фенотерола из липосомальной формы с концентрацией криопротектора во внутреннем пространстве 2,5% и во внешней фазе 2% представлены на рис. 2.



**Рис. 2.** Высвобождение из липосомальной формы фенотерола в сравнении с его свободной формой в эквивалентном количестве методом *in vitro* в фосфатно-солевом буфере pH = 7,4, n=8, M±SD  
**Fig. 2.** Release from the liposomal form of fenoterol in comparison with its free form in an equivalent amount by the *in vitro* method in phosphate buffered saline pH = 7.4, n = 8, M±SD

Примечание – \* – значения статистически значимы по сравнению со значениями свободной формы фенотерола при  $p < 0,05$ .

Динамика высвобождения липосомальной формы фенотерола свидетельствовала о том, что по сравнению с его свободной формой выход действующего начала замедляется. В течение первых 15 минут эксперимента высвобождение фенотерола из липосом было сопоставимо с группой контроля. В опытной группе регистрировали высвобождение 41,1±11,7% активного начала, в группе контроля данный показатель был равен 52,7±10,6%. Далее регистрировали, что выход фенотерола замедлялся. К 480-й минуте из полости липосом высвободилось 68,9±3,8% препарата, в то время как в группе контроля показатель был равен 100%. Завершение выхода фенотерола из липосомальной формы регистрировали через 720 минут после начала эксперимента.

Изучение длительности фармакологической активности липосомальной формы фенотерола оценивали по функции внешнего дыхания у крыс на модели бронхоспазма, индуцированного ингаляционным воздействием 1% гистамина. Свободную

## ВЫВОДЫ

1. Введение сахарозы как во внешнюю, так и во внутреннюю среду обеспечивает более эффективную защиту липосом в процессе лиофилизации.
2. Содержание сахарозы во внешней среде липосомальной формы фенотерола, равное 2%, обеспечивает минимальную утечку препарата из полости липосом. Данные частицы характеризуются медианным диаметром, равным 4,28±1,62 мкм, что обеспечивает проникновение в дистальные отделы трахеобронхиального дерева.

и липосомальную форму фенотерола вводили крысам интратрахеально в дозе 17 мкг/кг (соответствует разовой дозе при межвидовом переносе с человека) через одну минуту после ингаляции гистамина. Полученные данные изменения функции внешнего дыхания крыс представлены в табл. 2.

В течение первых 90 минут ингаляции гистамином у крыс регистрировали развитие бронхоспазма, что проявлялось снижением дыхательного объема и частоты дыхания до 0,9±0,2 мл и 103,41±12,34 ед./мин соответственно и увеличением показателя ренh до 0,92±0,2. Длительность нарушений функции внешнего дыхания (ФВД) сохранялась в течение 360 минут после введения гистамина.

Интратрахеальное введение фенотерола в свободной форме на модели бронхоспазма, индуцированного гистамином, позволяло сохранить показатели функции внешнего дыхания на уровне исходных показателей в течение первого часа. В более поздние сроки, на фоне сниженного показателя ДО, фиксировали статистически значимо более высокие значения МОД в сравнении с группой контроля за счет роста ЧД. Установлено, что показатель бронхоконстрикции через 15 минут после интратрахеального введения фенотерола в свободной форме находился на уровне 0,81±0,22, что свидетельствовало о сохранении бронхоспазма у животных. В остальные сроки отмечали снижение ренh, однако уровня исходных значений показатель не достигал. Эти особенности могли быть связаны с быстрым периодом полувыведения фенотерола.

Введение липосомальной формы фенотерола обеспечивало сохранение регистрируемых показателей ФВД у животных на уровне исходных значений на протяжении 360 минут после ингаляции гистамина. Установлено статистически значимое снижение показателя бронхоконстрикции через 30 минут после введения липосомальной формы фенотерола по сравнению с контрольной группой и группой, которой его вводили в свободной форме. Через 240 минут интегральный показатель достигал уровня исходных значений, тогда как в группах сравнения данный показатель был выше (0,48±0,07 против 0,71±0,11 в контрольной группе и 0,55±0,09 – в группе введения фенотерола в свободной форме). Полученные результаты подтверждают данные *in vitro* об увеличении длительности действия и высвобождения фенотерола из липидной матрицы и позволяют рекомендовать использование методики получения лиофилизированной липосомальной формы для получения ретардных форм ингаляционных β<sub>2</sub>-агонистов. Отдельно следует отметить, что липосомальные формы за счет собственного противовоспалительного действия могут способствовать снижению дозы глюкокортикостероидов в составе комплексной терапии.

3. Содержание сахарозы во внешней фазе – 2,5% и внутренней фазе – 2% позволяет избежать коллапса структуры лиофилизата, предотвращает агрегацию частиц и обеспечивает их однородное монодисперсное распределение по размеру.
4. Профиль высвобождения липосомальной формы фенотерола характеризуется выходом 42% активного начала в первые 15 минут и замедленным высвобождением оставшейся части до 720 минут.
5. Применение липосомальной формы β<sub>2</sub>-адреномиметика пролонгирует бронходилатацию с одного часа (для фенотерола в свободной форме) до не менее чем шести часов.

Изменение показателей функции внешнего дыхания у крыс после интратрахеального введения липосомальной формы фенотерола в дозе 17 мкг/кг на модели бронхоспазма, индуцированного 1%-м гистамином, n=6, M±SD  
 Changes in respiratory function of rats following intratracheal administration of the liposomal form of fenoterol at a dose of 17 µg/kg on a model of bronchospasm induced by 1% histamine, n=6, M±SD

Табл. 2.  
 Table 2.

Срок регистрации, мин	Дыхательный объем, мл	Минутный объем дыхания, мл/мин	Частота дыхания, ед./мин	Интегральный показатель бронхоконстрикции (penh)
<b>Контроль (гистамин)</b>				
Исходные значения	1,4±0,32	197,6±43,9	138,4±16,31	0,52±0,07
15	1,1±0,15*	167,0±55,93	123,8±10,81	0,92±0,23*
30	1,1±0,27	120,8±32,56	103,7±14,14*	0,85±0,19*
60	1,2±0,51	134,8±39,25*	105,6±12,58*	0,89±0,21*
90	0,9±0,20*	93,7±23,15*	103,41±12,34*	0,84±0,18*
120	0,9±0,24*	89,6±29,19*	94,83±12,60*	0,73±0,13
240	1,03±0,32*	109,8±21,99*	104,29±12,58	0,71±0,09
360	0,94±0,29*	126,5±11,35*	142,3±14,28	0,66±0,11
<b>Свободная форма фенотерола</b>				
Исходные значения	1,4±0,35	186,1±25,52	133,6±15,8	0,47±0,06
15	1,6±0,21	193,9±24,12	119,2±22,59	0,81±0,22*
30	1,4±0,35	238,6±78,91	169,4±36,38#	0,69±0,07*
60	1,4±0,29	214,8±42,29	148,8±9,17*	0,69±0,16
90	1,0±0,15*	194,0±34,3#	149,8±29,25	0,69±0,10
120	1,1±0,12*	214,2±43,45#	142,7±27,24	0,58±0,18
240	0,9±0,26*	205,5±31,77#	143,6±41,89	0,55±0,09
360	1,1±0,14*	204,4±44,01	151,2±36,44	0,60±0,08
<b>Липосомальная форма фенотерола</b>				
Исходные значения	1,1±0,34	172,8±26,63	156,5±31,02	0,40±0,11
15	1,6±0,24	244,3±12,48	156,5±28,68	0,87±0,34*
30	1,7±0,32	261,2±24,78	151,4±20,48#	0,54±0,11#0
60	1,5±0,43	219,9±38,99	149,2±26,77#	0,51±0,11#
90	1,4±0,25	161,3±32,04	141,2±17,54	0,53±0,16
120	1,3±0,24	183,8±35,53	136,5±26,29	0,51±0,16
240	1,3±0,27	200,5±33,8	163,2±28,25#	0,48±0,07
360	1,4±0,37	195,9±50,7	128,7±24,02	0,47±0,09#0

**Примечания:**

- 1 – \* – значения статистически значимы по сравнению с исходными значениями, p < 0,05;
- 2 – # – значения статистически значимы по сравнению с группой введения контроля, p < 0,05;
- 3 – 0 – значения статистически значимы по сравнению с группой введения свободной формы фенотерола, p < 0,05.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Хроническая обструктивная болезнь легких / Российское респираторное общество // Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2018. – 76 с.
2. Лебедева, М.В. Тройная терапия двумя длительно действующими бронходилататорами и ингаляционным глюкокортикостероидом при ХОБЛ / М.В. Лебедева, М.Ю. Бровка, С.В. Моисеев // Клиническая фармакология и терапия. – 2019. – Т. 28, № 1. – С. 50–56.
3. Чучалин, А.Г. Российское респираторное общество. Федеральные клинические рекомендации по

- диагностике и лечению хронической обструкции болезни легких / А.Г. Чучалин, С.Н. Авдеев, З.Р. Авдеев [и др.] // Пульмонология. – 2014. – Т. 3. – С. 15–36.
4. Janjua S, Schmidt S, Ferrer M, Cates CJ. Inhaled Steroids With and Without Regular Formoterol for Asthma: Serious Adverse Events Full text links. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019; 25 (9): 9.
  5. Kopsaftis ZA, Sulaiman NS, Mountain OD, et al. Short-acting bronchodilators for the management of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease in the hospital setting: systematic review. *Systematic Reviews.* 2018; 7: 13.
  6. Ong HX, Young P. Liposomes for Inhalation. *The ISAM Textbook of Aerosol Medicine.* 2015; 303–29.
  7. Hamedinasab H, Rezayan AH, Mellat M. Development of chitosancoated liposomalfor pulmonary delivery of N-acetylcysteine. *Int J Biol Macromol.* 2019; 19: S0141–8130.
  8. Dogbe MG, Mafilaza AY, Eleuterio CV. Pharmaceutical Benefits of Fluticasone Propionate Association to Delivery Systems: In Vitro and In Vivo Evolution. *Pharmaceutics.* 2019; 11 (10): 521.
  9. Pomin VN. Main non-glycosaminoglycan sulfated glycans as potential pharmaceuticals. *Pharm.* 2015; 8 (4): 848–64.
  10. Franzé S, Selmin F, Samaritani E, et al. Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging. *Pharmaceutics.* 2018; 10 (3): 139.
  11. Аршинова, О.Ю. Особенности лиофилизации липосомальных лекарственных препаратов (Обзор) / О.Ю. Аршинова, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46. – № 4. – С. 29–34.
  12. Wang Y, Grainger DW. Lyophilized liposome-based parenteral drug development: Reviewing complex product design strategies and current regulatory environments. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2019; 151–152: 56–71.
  13. Краснопольский, Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине: учеб. пособие / Ю.М. Краснопольский, А.С. Дудниченко, В.И. Швеце. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2011. – 228 с.
  14. Блынская, Е.В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов / Е.В. Блынская, С.В. Тишко, К.В. Алексеев // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16. – С. 6–11.
  15. Wolfe J, Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology.* 1999; 39: 103–29.
  16. Чан, Иен Тхи Хай. Липосомальная лекарственная форма фотодитазина / Чан Тхи Хай Иен, В.И. Поздеев, Г.А. Меерович // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 2. – № 9. – С. 105–107.
  17. Mulyadi, N. A. Physical Characterization of Liposomes Formulation Lyophilized in the Presence of Disaccharide and HPMC as Dispersed Matrix / N. A. Mulyadi, N. Rosita, H. Yusuf // *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering.* – 2017. – V.33. – P. 88–94.
  18. Fritze A, Hens F, Kimpfler A, et al. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2006; 1758: 1633–40.
  19. Ju R-J, Li X-T. Preparation and Characterization of Drug Liposomes by Ammonium Sulfate Gradient. *Liposome-Based Drug Delivery Systems.* 2017; 1–19.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Татьяна Михайловна Устинова**, канд. биол. наук, научный сотрудник научно-исследовательского отдела Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: gniiivm\_15@mil.ru

**Николай Григорьевич Венгерович**, д-р мед. наук, профессор кафедры промышленной экологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; заместитель начальника научно-исследовательского отдела Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: nikolai.vengerovich@phaminnotech.com

**Михаил Анатольевич Юдин**, д-р мед. наук, доцент кафедры токсикологии, экстремальной и водолазной медицины Северо-Западного государственного университета имени И.И. Мечникова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; начальник научно-исследовательского управления Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: gniiivm\_15@mil.ru

## ADDITIONAL INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Tatiana M. Ustinova**, Ph.D. in Biology, Scientific Researcher at State Research Institute of Military Medicine, Russian Federation of Ministry of Defense, Saint Petersburg, Russia; e-mail: gniiivm\_15@mil.ru

**Nikolai G. Vengerovich**, Doctor of Medicine (MD), Professor of the Industrial Ecology Department, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; Deputy Head of Department, State Research Institute of Military Medicine, Russian Federation of Ministry of Defense, Saint Petersburg, Russia; e-mail: nickolai.vengerovich@pharminnotech.com

**Mikhail A. Yudin**, Doctor of Medicine (MD), Assisting professor of Toxicology and Experimental Medicine Department, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; Chief of Department, State Research Institute of Military Medicine, Russian Federation of Ministry of Defense, Saint Petersburg, Russia; e-mail: gniiivm\_15@mil.ru

**Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов**

# Experimental study of the liposomal form of fenoterol following improvement of the method to obtain it

©2020. T.M. Ustinova<sup>1</sup>, N.G. Vengerovich<sup>1,2</sup>, M.A. Yudin<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Military Medicine, the Russian Federation of Ministry of Defense, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

<sup>3</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

\* e-mail: gniiivm\_15@mil.ru

Received May 20, 2020;

Revised June 02, 2020;

Accepted June 29, 2020

The effect of different concentrations of cryoprotector (sucrose) on the efficiency of fenoterol inclusion in the lipid matrix during lyophilization has been studied. It has been shown that the liposomal form with the content of cryoprotector in the internal environment of liposomes – 2.5% and in the external environment equal to 2% provides long-term preservation of the drug in the liposome cavity. Under these conditions, it is possible to achieve a monodisperse distribution of particles with a median diameter of  $4.28 \pm 1.62 \mu\text{m}$ . The assumed quantitative composition of the cryoprotector ensures the manufacturability of the liposome production process, increases the stability of the lyophilizate structure and prevents the particles from sticking together, ensuring their uniformity.

The profile of two-stage release of fenoterol from the liposomal form has been shown in vitro. The first stage of rapid release was characterized by a transition to free form within 15 minutes to 42% of the encapsulated fenoterol. At the second stage the active principle was released more slowly during 480 minutes.

The model of bronchospasm induced by 1% histamine has shown the advantage of the liposomal form of fenoterol in comparison with its free form in the form of an aqueous solution. Intra-tracheal administration of the liposomal form of fenoterol at a dose of  $17 \mu\text{g}/\text{kg}$  provided for 360 minutes the preservation of external respiratory function at the level of initial values, despite histamine inhalation, while the duration of action of fenoterol did not exceed 120 minutes.

**KEYWORDS:** liposomes; cryoprotector; lyophilization; pH gradient; bronchoconstriction; histamine;  $\beta_2$ -agonists; fenoterol; external respiration