

Ингаляционная доставка нано- и субмикронных частиц антибактериальных агентов

Валиулин С.^{1*}, Аньков С.^{1,2}, Толстикова Т.^{1,2}, Бакланов А.¹, Дульцева Г.¹,
Онищук А.¹

¹ Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

* valiuilin@kinetics.nsc.ru

Ключевые слова: нано- и субмикронные частицы; аэрозоль; антибактериальные вещества; ингаляция

Мотивация и цель: Серьезным вызовом для современной системы здравоохранения является развитие бактериальной устойчивости к большинству известных антибактериальных средств. По данным Всемирной организации здравоохранения [1] бактериальные инфекции и опосредованные ими заболевания входят в топ-10 причин смерти в мире. Смертность от устойчивых штаммов составляет порядка 700 тыс. человек в год и продолжает расти, что к 2050 году может привести к десяткам миллионов смертей по всему миру. Для преодоления этой проблемы проводят поиск новых типов антибактериальных агентов и разработку способов повышения эффективности уже существующих лекарственных средств. Так, адресная доставка с созданием высокой локальной концентрации действующего вещества может потенциально позволить преодолеть устойчивость и в то же время снизить общую лекарственную нагрузку на организм. При поражении дыхательной системы таким методом адресной доставки является ингаляция, когда лекарственное средство в виде мелкодисперсных частиц движется по каналам дыхательной системы и оседая локально в ней оказывает свое терапевтическое действие. Однако такой способ требует технических средств, позволяющих осуществлять генерацию частиц заданного размерного диапазона для их осаждения в определенных пораженных участках дыхательной системы и точного контроля доставляемой таким способом дозы лекарственного средства.

Целью настоящей работы являлась разработка метода генерации аэрозольных частиц антибиотиков цефалоспоринового ряда в нано- и субмикронном диапазоне размеров и исследование фармакокинетики и специфической активности после их ингаляционной доставки.

Методы и алгоритмы: Исследование было проведено на антибактериальных препаратах цефазолин, цефуроксим, цефтриаксон и цефепим. Генерация аэрозоля осуществлялась методом ультразвукового распыления водного раствора лекарственных веществ. Принцип работы блока генератора аэрозоля заключается в следующем: в дно цилиндрической стеклянной кюветы, объемом 200 см³, встроен пьезоэлемент, а раствор исследуемого вещества (≈ 20 см³) заливается в кювету через боковой штуцер. За счет колебаний пьезоэлемента происходит образование аэрозоля в виде капель раствора. Этот аэрозоль увлекается потоком фильтрованного воздуха ($Q_1 = 0,3$ л/мин), который подается через боковой штуцер

кюветы. Поток аэрозоля из кюветы поступает в вертикальный холодильник, охлаждаемый холодной водой ($\approx 10^\circ\text{C}$). Здесь происходит конденсация на стенках паров воды, которые были захвачены потоком воздуха и частичное испарение растворителя из капель аэрозоля. На выходе из холодильника поток аэрозоля Q_1 смешивается с потоком сухого воздуха ($Q_2 = 2,8$ л/мин) и сформировавшийся, новый аэрозольный поток ($Q_1 + Q_2$) движется из блока генерации аэрозоля в осушитель, в котором происходит окончательное испарение растворителя и формирование сухих (твердых) аэрозольных частиц. Размер частиц и концентрацию на выходе из генератора определяли с помощью диффузионного аэрозольного спектрометра ДСА-М и оптического спектрометра аэрозоля ОСА, которые вместе позволяют измерять счетную концентрацию частиц в диапазоне от 10 до $5 \cdot 10^5 \text{ см}^{-3}$ и распределение по размерам в диапазоне от $0,003$ – 10 мкм [2]. Ингаляционную доставку генерируемого аэрозоля лабораторным мышам проводили в ингаляционной камере «nose-only», оснащенной двенадцатью радиально расположенными портами (2 яруса по 6 портов), куда вставляются специальные стеклянные объемы, внутри которых животное располагается таким образом, чтобы только нос находился в области движения потока аэрозоля. Для сравнения с ингаляционной формой доставки, выполняли исследование фармакокинетики после внутривенного и внутрибрюшного введения. Количественное определение лекарственного вещества в сыворотке крови и легких осуществляли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «Милихром А-02».

Проводилось исследование специфической активности аэрозольной формы в сравнении с внутрибрюшинным и внутривенным введением антибактериальных веществ на модели бактериального сепсиса у мышей вызванного путем внутрибрюшинного введения суспензии бактерий в количестве $5 \cdot 10^5$ КОЕ на животное. Использовались два музейных штамма бактерий: *Klebsiella pneumoniae* 82 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25 953. Обе культуры бактерий были получены из коллекции ФГБУН СФНЦА РАН.

Результаты: Методом ультразвукового распыления водного раствора был получен аэрозоль антибиотиков цефалоспоринового ряда. Размер аэрозольных частиц зависел от концентрации и природы вещества в распыляемом растворе и составлял, в случае:

цефазолина от 80 до 1100 нм , при концентрации раствора от $0,25$ до 14% ;
цефуросима от 250 до 550 нм , при концентрации раствора от 1 до 12% ;
цефтриаксона от 300 до 900 нм и цефепима от 450 до 1300 нм , при концентрации раствора от $0,5$ до 14% .

При этом, концентрация аэрозольных частиц составляла $(2 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ см}^{-3}$ и практически не зависела от концентрации вещества в растворе. Это обусловлено тем, что под действием ультразвуковых колебаний (при постоянной частоте) происходила генерация примерно одинакового количества жидких капель, содержащих растворенное вещество.

Фармакокинетическое исследование показало, что содержание цефалоспоринов в легких после их ингаляции на порядок выше по сравнению с инъекционным введением. Биодоступность цефалоспоринов при их аэрозольной доставке составила примерно $80 \pm 5 \%$, что сопоставимо с внутрибрюшинным введением. Аэрозольная форма доставки показала хороший лечебный антибактериальный эффект. Животные, подвергнутые ингаляционному лечению, оставались живы

весь период наблюдения – 9 суток. У всех инфицированных животных увеличилось количество нейтрофилов и уменьшилось количество лимфоцитов по сравнению с интактной группой, что является результатом воспаления. Однако у мышей, получавших ингаляцию, отклонение от интактных животных было в 1,5–2 раза меньше, чем у нелеченых мышей. Аэрозольная форма доставки продемонстрировала хороший лечебный антибактериальный эффект, сопоставимый по эффективности с инъекционным введением. Через 8 ч после инфицирования, у животных, получавших лечение ингаляционно, количество КОЕ в крови оказалась на два порядка меньше, чем у животных, группы отрицательного контроля.

Выводы: Для проведения исследований, связанных с ингаляционной доставкой антибиотиков, разработан и собран экспериментальный стенд, позволяющий выполнять контролируемую генерацию аэрозоля и его ингаляционную доставку. Был получен аэрозоль антибиотиков цефалоспоринового ряда с размером частиц от 80 до 1100 нм и средней счетной концентрацией $(2 \pm 0.5) \cdot 10^5 \text{ см}^{-3}$.

Фармакокинетическое исследование показало, что содержание цефалоспоринов в легких после их ингаляции на порядок выше по сравнению с инъекционным введением, а их биодоступность при аэрозольной доставке составляет $80 \pm 5 \%$ и сопоставима с внутрибрюшинным введением.

Исследование специфического действия антибиотиков цефалоспоринового ряда при их ингаляционном введении на модели бактериального сепсиса продемонстрировало хороший лечебный эффект сопоставимый по эффективности с инъекционным введением.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 19-73-10143, <https://rscf.ru/project/19-73-10143/>).

Inhalation delivery of nano- and submicron particles of antibacterial agents

Valiulin S.^{1*}, An'kov S.^{1, 2}, Tolstikova T.^{1, 2}, Baklanov A.¹, Dultseva G.¹, Onischuk A.¹

¹ V.V. Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* valiulin@kinetics.nsc.ru

Key words: nano- and submicron particles; aerosol; antibacterial substances; inhalation

Motivation and Aim: A significant challenge for modern public health system is emergence of bacterial resistance against most of the known antibacterial agents. According to the data of the World Health Organization [1], bacterial infections and related diseases are among the top 10 causes of death in the world. Mortality caused by resistant strains accounts for about 700 thousand cases per year and continues to rise, which can lead to tens of millions deaths over the world by 2050. To overcome this problem, search for new types of antibacterial agents and development of the methods to enhance the efficiency of already existing pharmaceuticals are involved. For instance, targeted delivery ensuring the high local concentration of active agents may potentially overcome drug resistance and at the same time reduce the total drug burden on the organism. In the case if respiratory system is affected, a proper method of targeted delivery is inhalation: a pharmaceutical agent in the form of fine particles travels along

the airways of respiratory system, gets locally deposited there and thus causes therapeutic action. However, this method requires adequate technical equipment to generate the particles within the necessary size range to provide their deposition in specific affected sites of the respiratory system and to enable precise control of the delivered drug dose.

The goal of the present work was to develop a method for generating the aerosol particles of cephalosporin antibiotics in the nano- and submicron size range, and to study pharmacokinetics and specific activity after the inhalation delivery of these particles.

Methods and Algorithms: The studies were carried out with antibacterial preparations: cefazolin, cefuroxime, ceftriaxone, and cefepime. The aerosol was generated through ultrasonic spraying of the aqueous solutions of pharmaceutical substances. The operation principle of the aerosol generating unit is as follows: a piezoelectric element is built in the bottom of a cylindrical glass cell 200 cm³ in volume, and the solution of the substance under investigation (≈ 20 cm³) is poured into the cell through a side fitting. The formation of aerosol as the droplets of solution proceeds due to the oscillations of piezoelectric element. This aerosol is carried with the flow of filtered air ($Q_1 = 0.3$ L/min), supplied through the side fitting of the cell. The aerosol flow from the cell enters a vertical condenser cooled with water (≈ 10 °C). Here, water vapor captured in the air flow is condensed on the walls, and the solvent is partially evaporated from aerosol droplets. At the outlet of the condenser, the aerosol flow Q_1 is mixed with the dry air flow ($Q_2 = 2.8$ L/min), and thus generated new aerosol flow ($Q_1 + Q_2$) passes from the aerosol-generating unit into the dryer, where complete evaporation of the solvent takes place, and dry (solid) aerosol particles are formed. Particle size and concentration at the outlet of the generator were determined with the help of diffusion aerosol spectrometer DSA-M and optical spectrometer of aerosol OSA, which together allow measurement of the number concentration of particles within the range from 10 to $5 \cdot 10^5$ cm⁻³ and size distribution within the range 0.003 – 10 μ m [2].

Inhalation delivery of the generated aerosol to laboratory mice was performed in a Nose-Only inhalation chamber equipped with twelve radially located ports (2 storeys with 6 ports in each) to which special glass vessels are mounted. The animals are accommodated in these vessels so that only the nose is within the area of aerosol flow passing through.

To compare with the inhalation delivery, the pharmacokinetic studies were also carried out after intravenous and intraperitoneal introduction.

The quantitative determination of pharmaceutical substances in blood serum and in the lungs was carried out by means of HPLC using Milikhrom A-02 liquid chromatograph. Specific activity of the aerosol form was studied in comparison with intraperitoneal and intravenous introduction of the antibacterial agents using the model of bacterial sepsis in mice, caused by the intraperitoneal introduction of bacterial suspensions in the amount of $5 \cdot 10^5$ CFU per animal. Two archival bacterial strains were used: *Klebsiella pneumoniae* 82 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25 953. Both bacterial cultures were obtained from the collection of the Siberian Federal Research Center of Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences.

Results: The aerosol of cephalosporin antibiotics was prepared by ultrasonic spraying of the aqueous solutions. The size of aerosol particles depended on the concentration and nature of the substance in the solution to be sprayed and was determined to be in the case of:

cefazolin, from 80 to 1100 nm, for solution concentration from 0.25 to 14 %; cefuroxime, from 250 to 550 nm, for solution concentration from 1 to 12 %; ceftriaxone, from 300 to 900 nm, and cefepime, from 450 to 1300 nm, for solution concentration from 0.5 to 14 %.

In all these cases, the concentration of aerosol particles was $(2 \pm 0.5) \cdot 10^5 \text{ cm}^{-3}$ and remained practically independent on the concentration of the substance in solution. This is explained by the fact that the action of ultrasonic oscillations (at the constant frequency) generated approximately the same number of liquid droplets containing the dissolved substances.

Pharmacokinetic studies showed that the content of cephalosporins in lungs after inhalation was an order of magnitude higher than after injection. Bioavailability of cephalosporins after aerosol delivery was approximately equal to $80 \pm 5 \%$, which was comparable with the result obtained after intraperitoneal introduction.

The aerosol delivery exhibited good antibacterial effect. The animals subjected to inhalation treatment were alive during the entire time of observation for 9 days. The number of neutrophils increased in all infected animals, while the number of lymphocytes decreased in comparison with the animals of intact group, which was the result of inflammation. However, the difference between the inhalation-treated mice and intact animals was 1.5–2 times smaller than that for non-treated infected mice. The aerosol form demonstrated good curative antibacterial effect, comparable in efficiency with that of injection. After the introduction of infection, 8 hours later, the number of CFU in the blood of inhalation-treated animals was determined to be two orders of magnitude smaller than in the animals of the negative reference group.

Conclusion: To carry out the studies related to the inhalation delivery of antibiotics, we developed and built the experimental test bench allowing controllable aerosol generation and its delivery by inhalation.

The aerosols of cephalosporin antibiotics with particle size 80 to 1100 nm and mean number concentration $(2 \pm 0.5) \cdot 10^5 \text{ cm}^{-3}$ was obtained.

Pharmacokinetic studies showed that the content of cephalosporins in lungs after their inhalation was an order of magnitude higher than after introduction through injection, and bioavailability of the drugs after inhalation delivery was $80 \pm 5\%$, which was quite comparable with that after intraperitoneal introduction.

Investigation of the specific action of cephalosporin antibiotics after their inhalation delivery in the model of bacterial sepsis demonstrated a good therapeutic effect, comparable with that after injection.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation (No. 19-73-10143, <https://rscf.ru/project/19-73-10143/>).

Список литературы/References

1. The top 10 causes of death. Web site: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Valiulin S.V., Onischuk A.A., Baklanov A.M. et al. An integrated aerosol setup for therapeutics and toxicological testing: Generation techniques and measurement instrumentation. *Measurement*. 2021;181:109659