

非那沙星眼用温敏凝胶的家兔眼刺激性试验及药效学研究

孙思雨,马涛

(蚌埠医学院第二附属医院药剂科,安徽 蚌埠 233000)

摘要:目的 研究非那沙星眼用温度敏感型原位凝胶(FTGE)对兔眼刺激性及药效学。方法 用 Draize 兔眼刺激性实验考察 FTGE 的眼部刺激性;以大肠杆菌及金黄色葡萄球菌感染的兔用 FTGE 进行局部治疗,观察其经过治疗后的细菌清除率。结果 FTGE 无明显刺激性,符合眼用制剂的要求;FTGE 的细菌清除率超过 80%,药效优于氧氟沙星滴眼液。结论 FTGE 在实验中无明显刺激性,且治疗角膜炎临床疗效明显,可供临床使用。

关键词:非那沙星;温度敏感型原位凝胶;家兔;刺激性;药效学

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.06.007

The eye irritation test and pharmacodynamic study in rabbits of finafloxacin thermosensitive gel for eyedrop

SUN Siyu, MA Tao

(Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233000, China)

[4] DONG B, ZHANG C, FENG JB, et al. Overexpression of ACE2 Enhances Plaque Stability in a Rabbit Model of Atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(7):1270-1276.

[5] ZHANG C, ZHAO YX, ZHANG YH, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates atherosclerotic lesions by targeting vascular cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(36):15886-15891.

[6] FERRARIO CM, JESSUP J, CHAPPELL MC, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2[J]. *Circulation*, 2005, 111(20):2605-2610.

[7] WYSOCKI J, YE M, RODRIGUEZ E, et al. Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: prevention of angiotensin II-dependent hypertension[J]. *Hypertension*, 2010, 55(1):90-98.

[8] THOMAS MC, PICKERING RJ, TSOROTES D, et al. Genetic Ace2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout mouse[J]. *Circ Res*, 2010, 107:888-897.

[9] THATCHER SE, ZHANG X, HOWATT DA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 deficiency in whole body or bone marrow-derived cells increases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor^{-/-} mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(4):758-765.

[10] CHISTIYAKOV DA, OREKHOV AN, BOBRYSEV YV. LOX-1-Mediated Effects on Vascular Cells in Atherosclerosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(5):1851-1859.

[11] CHEN X, ZHANG H, HILL MA, et al. Regulation of Coronary Endothelial Function by Interactions between TNF- α , LOX-1 and Adiponectin in Apolipoprotein E Knockout Mice [J]. *J Vasc Res*, 2015, 52(6):372-382.

[12] YOKOTA C, SAWAMURA T, WATANABE M, et al. High Levels of Soluble Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 in Acute Stroke: An Age- and Sex-Matched Cross-Sectional Study [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(10):1222-1226.

[13] 周杰, 潘令新. 急性冠脉综合征患者红细胞分布宽度和超敏 CRP 的变化及临床意义 [J]. *安徽医药*, 2014, 18(5):906-908.

[14] 梁彩霞, 吴雪松, 岳磊. 血清 C 反应蛋白、血浆纤维蛋白原、颈动脉粥样硬化与进展性脑梗死的临床研究 [J]. *安徽医药*, 2014, 18(5):914-916.

[15] TIE G, YAN J, MESSINA JA, et al. Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Enhances the Apoptosis Induced by Oxidized Low-Density Lipoprotein in Endothelial Progenitor Cells [J]. *J Vasc Res*, 2015, 52(6):361-371.

[16] TWIGG MW, FREESTONE K, HOMER-VANNIASINKAM S, et al. The LOX-1 scavenger receptor and its implications in the treatment of vascular disease [J]. *Cardiol Res Pract*, 2012, 2012:632408.

[17] BALIN M, CELIK A, KOBAT MA. Circulating soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels are associated with proximal/middle segment of the LAD lesions in patients with stable coronary artery disease [J]. *Clin Res Cardiol*, 2012, 101(4):247-253.

[18] COLLINS RG, VELJI R, GUEVARA NV, et al. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(1):189-194.

[19] MÜLLER S, LABER U, MÜLLENHEIM J, et al. Preserved endothelial function after long-term eccentric isosorbide mononitrate despite moderate nitrate tolerance [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(11):1994-2000.

[20] SEKIYA M, SATO M, FUNADA J, et al. Effects of the long-term administration of nicorandil on vascular endothelial function and the progression of arteriosclerosis [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 46(1):63-67.

Abstract: Objective To study the eye irritation test and pharmacodynamic study of Finafloxacin Thermosensitive Gel for Eyedrop (FTGE) in rabbits. **Methods** Per-Draize technique for eye irritation test in rabbits was used in the experiment. Infecting the rabbit's eye with staphylococcus aureus and Escherichia coli and make treatment of local medication with FTGE. The bacterial clearance were observed after treated. **Results** The FTGE had no significant irritation and correspond with the requirements for ophthalmic preparations. The bacterial clearance rate exceeded 80 %, and its efficiency was better than ofloxacin eye drops. **Conclusion** The FTGE had no significant irritation and the curative effect was good of keratitis, so it is useful to clinical treatment.

Key words: Finafloxacin; Thermosensitive gel; Rabbit; Irritation; Pharmacodynamic

近些年,眼科抗感染药物新剂型发展迅速^[1],尤其是一些原位凝胶^[2]的出现解决了病人因一天多次用药而出现的不便。笔者选用了2014年12月上市的新型氟喹诺酮类药物非那沙星,以及国际上应用广泛的泊洛沙姆188、泊洛沙姆407^[3]研制成眼用温度敏感型原位凝胶(FTGE)滴眼液,并用大肠杆菌、金黄色葡萄球菌感染家兔眼部,制造角膜炎、结膜炎的动物模型,与氧氟沙星滴眼液做对照,考察非那沙星眼用FTGE的刺激性及药效学,现报道如下。

1 仪器与材料

Eppendorf微量移液枪(德国艾本德公司);非那沙星眼用FTGE(自制,批号:160203);细菌培养基(自制);DHG-303-0A数显恒温培养箱(绍兴市精源仪化贸易中心);1 mL注射器(江西宏达医疗器械有限公司);无菌生理盐水(安徽丰原药业股份有限公司,批号:150306);氧氟沙星滴眼液(江西闪亮制药有限公司,批号:141004);家兔(雌雄各半,体质量1.8~2.8 kg,蚌埠医学院实验动物中心,批号:141228);大肠杆菌(临床采集分离);金黄色葡萄球菌(临床采集分离)。

2 方法与结果

2.1 非那沙星眼用FTGE的制备^[4-6] 将处方量的非那沙星和无菌生理盐水溶解于适量磷酸缓冲盐溶液(PBS)中,加入适量泊洛沙姆188和泊洛沙姆407^[7-8],放入4℃冰箱冷冻48 h,等泊洛沙姆完全溶解后加入适量的透明质酸钠和苯扎溴铵,在4℃下用磁力搅拌器搅拌30 min,待辅料全部溶解后用硼酸调节pH为7.1~7.2;121℃高压灭菌30 min,制成非那沙星眼用FTGE 50 mL,含量为3 g·L⁻¹,置于4℃冰箱储存备用。

2.2 实验动物的筛选 选取饲养10 d后家兔的结膜、角膜、虹膜无红肿、无分泌物的家兔50只作为实验动物。

2.3 Draize兔眼刺激性实验^[9-10]

2.3.1 动物分组给药及评分标准 将家兔按照简单随机化法随机分为5组,每组6只,记为A₁、A₂、

B₁、B₂、C组。A组为单次给药组,B组为多次给药组。A₁组家兔结膜囊内滴入自制的FTGE,每天1次,每次100 μL;A₂组家兔结膜囊内滴入氧氟沙星滴眼液,每天1次,每次100 μL;观察用药后0、1、2、3、5、7 d眼部刺激情况并记录。B₁组家兔结膜囊内滴入自制的FTGE,每天5次,每次100 μL;B₂组家兔结膜囊内滴入氧氟沙星滴眼液,每天5次,每次100 μL,连续用药7 d;C组为生理盐水对照组,观察用药时及用药后0、1、2、3、5、7 d眼部刺激情况并根据结膜充血程度,水肿程度,分泌物的多少,虹膜充血程度,角膜混浊程度,虹膜充血程度进行评分,记录各组分值,取平均值。

2.3.2 Draize眼部刺激性实验结果 见表1,2,说明制备的药品无刺激性,实验成功。

表1 Draize眼部刺激性实验评分标准

评价分数/分	评价结果
0~<4	无刺激性
4~<9	轻微刺激
9~<13	中度刺激
13~<16	严重刺激

表2 Draize眼部刺激性实验结果

组别	评分/分	评价结果
A ₁	0.00	无刺激性
B ₁	0.00	无刺激性
A ₂	0.88	无刺激性
B ₂	0.56	无刺激性
C	0.00	无刺激性

2.4 兔眼细菌感染的药效学研究^[11] 将家兔固定后,用注射器针头刺伤眼球的结膜和角膜后,用移液枪取20 μL金黄色葡萄球菌(1.9×10⁹ CFU·mL⁻¹)、大肠杆菌(1.9×10⁹ CFU·mL⁻¹)滴入家兔结膜囊内,被动眨眼闭合10次,给药5 d后取其眼部分泌物做细菌培养,观察记录,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌培养为阳性者说明家兔眼睛感染了角膜炎和结膜炎。

2.5 实验动物给药治疗和分组 将50只家兔按简单随机化法随机分为A、B、C、D、E 5组,每组10只,

表3 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细菌清除率

组别	眼数/只	大肠杆菌			金黄色葡萄球菌		
		检出数/只	清除数/只	清除率/%	检出数/只	清除数/只	清除率/%
A	20	20	0	0	20	0	0
B	20	20	14	70	20	15	75
C	20	20	15	75	20	16	80
D	20	20	17	85	20	16	80
E	20	20	19	95	20	20	100

A组为生理盐水对照组,给药频次为每天5次,剂量为20 μL ;B组为氧氟沙星滴眼液用药组,浓度为3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,给药频次为每天2次,剂量为20 μL ;C组为FTGE用药组,浓度为3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,给药频次为每天2次,剂量为20 μL ;D组为氧氟沙星滴眼液给药组,浓度为3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,给药频次为每天5次,剂量为20 μL ;E组为FTGE给药组,浓度为3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,给药频次为每天5次,剂量为20 μL 。

2.6 病原体指标观察 家兔给药前和给药7 d后取眼部分泌物做细菌涂片培养鉴定^[12],连续2次细菌涂片培养鉴定结果均转阴说明病原体已清除,病原体清除率=用药后病原体已清除的兔眼数/用药前病原体阳性的兔眼数 $\times 100\%$ 。

2.7 细菌清除率结果 每组家兔均建模成功;FTGE和氧氟沙星在不同给药次数情况下,每天用药2次的清除率就可以达到氧氟沙星每天用药5次的效果;FTGE和氧氟沙星在相同给药次数情况下,前者的病原体清除率高于氧氟沙星;相同的药物给药5次的病原体清除率明显高于给药2次组,具体见表3。

3 讨论

眼刺激性是由于眼睛直接暴露于某些化学物质下,引起的眼及周围黏膜可逆性炎性改变,它是考察眼用制剂安全性的重要指标,最常用的方法为Draize刺激性实验。在Draize刺激性实验中笔者选用用药体积为100 μL ,此剂量是研究酸碱损伤的极值体积,它可以更好的推测刺激性,也能证明低刺激性药物并非由于体积多产生的刺激,表2结果显示,FTGE与左氧氟沙星滴眼液均无刺激性,可用于动物眼部。

非那沙星是美国食品和药物管理局(FDA)在2014年12月批准的新型第四代氟喹诺酮类抗菌药,其对于治疗金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌均有良好的效果,美国在售的非那沙星仅有滴耳剂一种,国内目前暂时未见非那沙星其他剂型的报道,本研究以非那沙星为主药,用泊洛沙姆407与泊洛沙姆188两种温度敏感型高分子为辅料制

成了FTGE,其在体外为液体,当进入结膜囊内因温度改变,变成半固体凝胶,在眼内滞留时间变长,生物利用度比普通剂型更有优势。表3的结果显示,空白对照组对2种混合菌感染的兔眼清除率为0;FTGE只要每天2次滴兔眼即与氧氟沙星每天5次的临床疗效相当;FTGE每天5次滴兔眼的细菌清除率可达100%,效果极为理想。

综上所述,FTGE对家兔眼部无刺激性,且对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌感染的角膜炎、结膜炎模型有明显药效,可为临床研究及药物研发提供可靠的实验依据。

参考文献

- [1] 沈晶晶,刘宏,熊康萍. 温度敏感型凝胶基质的研究进展[J]. 中国新药杂志,2015,24(7):800-803,817.
- [2] BALOGLU E, KARAVANA SY, SENYIGIT ZA, et al. In-situ gel formulations of econazole nitrate: preparation and in-vitro and in-vivo evaluation[J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(10):1274-1282.
- [3] GRATIERI T, GELFUSO GM, DE FREITAS O, et al. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2011, 79(2):320-327.
- [4] 张娜,高萍,王文彤,等. 盐酸左氧氟沙星壳聚糖和胶原缓释滴眼液的制备及药理学[J]. 中国新药杂志,2010,19(23):2188-2191.
- [5] 赵亮,魏岚. 芦荟温度敏感型眼用原位凝胶的研制[J]. 中成药,2012,34(4):739-741.
- [6] 李洪斌,王艳萍,刘福强,等. 银杏叶提取物温度敏感型鼻用原位凝胶的研究[J]. 解放军药学学报,2013,29(6):515-518,566.
- [7] 胡拥军,宋玲,田鹏程. 阿昔洛韦壳聚糖眼用温敏原位凝胶的研制及其体外释药研究[J]. 安徽医药,2014,18(1):30-32.
- [8] 张冕,万芳. 盐酸川芎嗪眼用原位温敏凝胶的制备及体外释药特性研究[J]. 安徽医药,2015,19(7):1237-1240.
- [9] 张瑾楠,王小青,吴东风,等. 茶敏维滴眼液 Draize 眼刺激性研究[J]. 实用中西医结合临床,2014,14(10):89.
- [10] 何文,周晶晶,郭威希. TMC60包衣的INS阳离子纳米脂质体-原位凝胶眼球滞留性及刺激性研究[J]. 安徽医药,2013,17(11):1852-1855.
- [11] 陈光龙,刘莹珍,廖朝峰. 加替沙星热敏凝胶滴眼液家兔药理学研究[J]. 中国药业,2007,16(13):6-7.
- [12] 张元元,杨姣,唐海,等. 阿奇霉素滴眼液对大鼠和兔眼铜绿假单胞菌角膜炎的治疗作用[J]. 沈阳药科大学学报,2015,32(9):703-708.

(收稿日期:2016-08-24,修回日期:2016-09-02)