

*Kocatepe Vet.J (2014) 7(2): 23-31*  
DOI: 10.5578/kvj.8526  
Submission: 09.10.2014  
Accepted: 03.11.2014

ARAŞTIRMA MAKALESİ

RESEARCH ARTICLE

**Anahtar Kelimeler**

Ampisilin  
Farmakokinetik Profil  
Koyun  
Lipozom

**Key Words**

Ampicillin  
Pharmacokinetic profiles  
Sheep  
Liposome

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Farmakoloji ve Toksikoloji ABD  
Afyonkarahisar /TÜRKİYE

<sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi Farmakoloji ve  
Toksikoloji ABD  
Konya/TÜRKİYE

Bu Araştırma makalesi, Yavuz Osman BİRDANE'nin Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezinden Özetlenmiştir.

**\*Corresponding author**  
Email: ybirdane@aku.edu.tr  
Telefon: 0(272)228 13 12

## Damar İçi Yolla Verilen Serbest ve Lipozomal Ampisilin Kan Farmakokinetik Profillerinin Karşılaştırılması

Yavuz Osman BİRDANE<sup>1\*</sup>, Ahmet Levent BAŞ<sup>2</sup>

### ÖZET

Bu çalışmada koyunlarda serbest (SA) ve lipozomal ampisilin (LA) damar içi (Dİ) uygulama sonrasında elde edilen farmakokinetik parametreleri karşılaştırıldı. Çalışmada 15-18 aylık 6 adet koyun (Akkaraman, 20-24 kg) kullanıldı. Her iki ilaç formülasyonu da hayvanlara bir haftalık aralıklarla tek doz (5 mg/kg) şeklinde Dİ uygulandı. Uygulamayı takibeden 2.5.,5.,10., 15., 20., 25., 30., 45., 60., 90., 120., 180., 240., 360., 480., 600., 720. dakikalarda kan örnekleri toplandı. Serum ilaç seviyeleri HPLC analizi ile belirlendi. Damar içi uygulamada LA'nın SA'ya göre, eğrinin altında kalan alanın (EAA= 12.58 µg.saat/ml) önemli derecede (p<0.001) büyük olduğu belirlendi. LA'nın eliminasyon yarı ömrünün ( $t_{1/2\beta}$ = 2.28 saat) ve ortalama kalış süresinin (MRT =1.90 saat) uzun, toplam klirensinin (Cl = 0.41 l/saat/kg) ise SA'ya göre düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca, LA dağılım hacimlerinin ( $V_{dss}$  = 0.78 l/kg) büyük olduğu (p<0.001) bulundu.

...

### S U M M A R Y

#### Comparisons Of Blood Pharmacokinetic Profiles Of Free And Liposome-Encapsulated Ampicillin After Intravenous Administration

Pharmacokinetic properties of liposome-encapsulated (LA) and free (FA) ampicillin were compared after intravenous (IV) administrations in sheep. Six healthy adult sheep (Akkaraman, female, 15-18 months aged, weighing 20-24 kg) were used as materials. FA and LA ampicillin were administered IM and IV at single recommended dose (5 mg/kg) to same individual sheep with 1 weeks interval. Blood samples were obtained at 2.5.,5.,10., 15., 20., 25., 30., 45., 60., 90., 120., 180., 240., 360., 480., 600., 720. minutes after injection. Concentrations of drug in serum were determined by HPLC. Area under curve (AUC= 12.58 µg.saat/ml), elimination half life ( $t_{1/2\beta}$ = 2.28 h), mean residence time (MRT= 1.90 h), and the volume of distribution at steady state ( $V_{d(ss)}$ = 0.78 l/kg) of IV LA was significantly higher than IV FA. Clearance (Cl= 0.41 l/h/kg) of IV LA was lower than IV FA.

## GİRİŞ

İlaça yönelik araştırmalarda ilerlemeler olmasına rağmen, enfeksiyonlar günümüzde de morbidite ve mortalitenin en yüksek sebeplerinden birisidir (Emmen ve Storm 1987). Bu durumun başlıca nedenleri arasında; ilaçların etkin olarak kullanılmamaları, istenen bölgelerde sürekli ve yeterli etki gösterememeleri, gelmektedir. Bu nedenle araştırmacılar değişik farmakolojik aktivitelere sahip maddelerin araştırılması ve geliştirilmesini amaçlamaktadırlar. Biyofarmasötik, farmakokinetik, kimya, polimer alanlardaki gelişmelere paralel olarak, yeni modifiye ilaç formülasyonları geliştirilmiş ve uygulama alanı bulmuştur. Modifiye ilaç formülasyonlarındaki uygulama yollarından birisi de lipozomlardır. Lipozomlar, bir veya daha fazla sayıda vezikül içeren, çift katlı fosfolipidlerin sıralanmasıyla oluşan, ortasında su bulunduran ve 0.02-10 µm arasında değişen çaplarda küresel yapıdadır (Ranade 1989).

İlaçların lipozomal formda kullanılmaları tıp alanında giderek artan bir ilgi alanı haline gelmiştir. Enfeksiyonların tedavisinde, özellikle hücre içi bakteri enfeksiyonlarında antibakteriyel ajanların lipozomal formlarının kullanılması ile terapötik etkinliğin arttığı ve farmakokinetik parametrelerinde değişiklik meydana geldiği görülmüştür (Allen 1998, Woodle ve Lasic 1992).

Yapılan çalışmalarda lipozomal antibiyotiklerin uygulanması sonucunda ilaç farmakokinetiğinin değiştiği, ilacın hücreler tarafından alınımının arttığı, yavaş salınım ile eliminasyon süresinin uzadığı (Webb ve ark.1988) ve ilaç etkinliğinin arttığı (Kreuter 1991) gözlenmiştir.

Ratlarda *Klebsiella pneumoniae* ile oluşturulan pnömoni de lipozomal gentamisin kullanılmasıyla enfekte akciğer dokusunda sağlıklılara göre 10 kat daha yüksek gentamisin konsantrasyonu tespit edilmiştir (Bakker-Woudenberg ve ark. 1993). Antibiyotiklerin lipozomal formülasyonları ile yüksek dozda antibiyotik kullanılmasına gerek kalmadan tedavi etkinliği artırılabilir (Bermudez 1994, Lutwyche ve ark. 1998).

Hücre içine yerleşen bakterilerin (*M.avium*, *S.aureus*, *B.abortus* v.b) özellikle immun sistemi baskılanmış hastalarda (AİDS vb.) enfeksiyon oluşturabilme potansiyelleri artar (Düzgüneş ve ark. 1996). Bu gibi bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonların sağaltımında kullanılacak ilaçların hücre içine akümüle olabilmesi ve etkilerini bu tür ortamlarda sergileyebilmesi gerekmektedir. *Mycobacterium* enfeksiyonlarında makrofajlar ve monositler de yüksek ilaç konsantrasyonları sağlanmalıdır. Bu enfeksiyonlarda amikasin (Xiong

ve ark. 1999, Bermudez ve ark. 1990) ve gentamisin (Fierer ve ark. 1990, Lutwyche ve ark. 1998) 'in lipozomal formları serbest formlarına göre daha etkili bulunmuştur. Lipozomal streptomisin, deneysel olarak enfekte edilmiş makrofajlardaki enfeksiyon etkenlerine karşı daha etkilidir (Majumdar ve ark. 1992).

Bakker-Woudenberg ve ark (1985), *L. monocytogenes* ile enfekte edilen farelerde, 72 saat ara ile Dİ yolla ve 0.27 mg/kg dozda uygulanan LA uygulamasının organ düzeyinde kantitatif bakteri sayımı; aynı dozda ve doz aralıklarında SA'ya göre 80 kat azalttığını, lipozom formunda uygulanan ampisilin dozunun % 56'sının karaciğer, % 23'ünün ise dalak dokusuna geçtiğini ifade etmişlerdir.

Ratlara Dİ (75 mg/kg) uygulanan lipozomal ampisilin serbest formuna göre yarılanma ömrünün uzadığı (SA=9.9 ± 0.5 dk, LA= 443.9 ±114.8 dk), klirensinin azaldığı (SA=12.2±1.2 ml/dk, LA=1.6±0.3 ml/dk) dağılım hacminin genişlediği (SA=169 ±21 L / kg, LA=720 ±20 L / kg ) ve ortalama kanda kalma süresinin uzadığı (SA=13.8±0.7 dk, LA=456.3±142.5 dk) ifade edilmiştir (Pardue ve White 1997).

B-laktam antibiyotiklerden olan penisilinlerin, aminopenisilin sınıfından ve ilk semisentetik penisilin (Traver ve Riviera 1981) türevlerinden biri olan ampisilin, ülkemizde veteriner sahada en sık kullanılan kemoterapötiklerdendir (Kaya 1997). Gram (+) ve (-) bakterilere karşı kloramfenikol ve tetrasiklinler ile karşılaştırılacak ölçüde antibakteriyel etkinliği olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Hardman ve ark. 1996). Ampisilin hayvanlara ağızdan 4-10mg/kg ve tüm parenteral yollarla 2-7 mg/kg dozlarda verilir. Kanatlılara yeme 250 mg/kg dozunda (5-10 gün süre ile) ve suya 1.65 g/L miktarda karıştırılarak kullanılabilir (Huber 1988).

Ampisilin sodyum; gram(+) ve (-) bakterilerin çoğunu in vivo ve in vitro koşullarda etkileyen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus fusiformis*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Listeria*, *Salmonella*, *Proteus*, *Brucella* ve *Pasteurella* türlerine karşı etkilidir (Brander ve ark. 1991).

Ampisilin at, sığır, koyun-keçi ve kedi-köpek'te açık yaralar dahil operasyon sonrası yaralar, tonsillitis, enteritis, pnömoni, mastitis, metritis, sistitis ve septisemide kullanılırken, kanatlılarda *E. coli* ve *Clostridium spp* den ileri gelen barsak hastalıklarında kullanılır. Ampisilin tüm türlerde *Leptospirosis*'de kullanılabilir (Huber 1988).

Hücre içine çoğu zaman yok denecek kadar az akümüle olan ampisilin hücre içi ortamlarda canlılıklarını sürdürebilen mikroorganizmalardan

kaynaklanan enfeksiyonlarda etkin olarak kullanılmamaktadır. Uygulama sonrasında biyolojik yarı ömrünün kısa olması ve dolaşımdan kısa sürede uzaklaşması nedenleriyle mikroorganizmalara karşı sürekli ve etkili yoğunluk sağlanamamaktadır. Bu araştırmada ampisilin serbest (SA) ve lipozomal (LA) formlarının serum farmakokinetik profilleri arasındaki farklılıkları karşılaştırmalı bir şekilde incelenmesi amaçlanmıştır.

### METERYAL ve METOT

Araştırmada 15-18 aylık, 6 adet (20-24 kg) sağlıklı Akkaraman ırkı koyun kullanıldı. Koyunlar çalışmaya başlamadan 10 gün önce özel bölmelere alındı ve çalışma süresince standart rasyonla beslendi. Farklı farmasötik form ve yollar ile ilaç uygulamaları esnasında aktif maddenin organizmadan atılım süresi gözönünde tutularak hayvanlar birer hafta dinlendirildi.

#### Solüsyonlar

Ampisilin sodyum (% 95.1, Biochemie, 422447, Gesellschaft m.b.H, Austria) saf aktif maddeden 10 mg tartılarak, 100 ml distile suda çözdürüldü. HPLC tampon çözeltisi (potasyum fosfat buffer): 1.36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1000 ml bidistile suda çözdürülerek (0.01M) hazırlandı. Fosfat buffer solüsyonu (PBSS): Bir adet fosfat buffer tableti (Sigma P 4417) 200 ml suda çözdürüldü (pH= 7.4).

#### Lipozomal Ampisilin Hazırlanması

Ampisilin lipozomlanması işlemi, Schumacher ve Margalit (1997) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi. Fosfatidilkolin (Merck, P 5394), kolesterol (Sigma, 3672) (3:1, w/w, 75/25 mg) ve 200 mg ampisilin, metanol:kloroform (1:2, v/v, 7.5/15 ml) karışımı ile uçurma balonu içerisinde çözdürüldü. Çözücüler rotary evaporatörde (50 °C'de 120 rpm) uçuruldu ve ince bir film tabakası oluşturuldu. Film üzerine 10 ml PBSS (pH=7.4) ilave edilerek, 10 dakika vortekste ve 5 dakika ultrasonik su banyosuna tutuldu. Oluşan lipozomal süspansiyon, 37°C'de çalkalamalı su banyosunda 2 saat süre inkübe edildi. Lipozomlar içerisine alınamayan ampisilin 4°C'de, 27000 g'de ve her defasında PBSS ile sulandırılarak 45 dakika süre ile 3 kez santrifüje edilerek üsteki sıvı kısım ortamdan uzaklaştırıldı. Tüpün alt kısmında oluşan lipozomal kitle, PBSS ile sulandırılarak, uygun dilüsyonlarda kullanılmak üzere 4 °C'de muhafaza edildi.

#### Lipozomlanma Düzeyinin ve Partikül Çapının Belirlenmesi

Stok lipozomal ampisilin süspansiyonu homojenize edildikten sonra, alınan 0.1 ml örnek üzerine 0.9 ml metanol eklenerek lipozomal

membran bütünlüğünün bozulması sağlandı. Oluşan solüsyondaki ampisilin düzeyi, Escudero ve ark (1996)'nın önerdikleri yöntemle göre ekstrakte edilerek, HPLC'de belirlendi. Lipozomal ampisilin hazırlanması sırasında ortama katılan total ilaç düzeyi dikkate alınarak ampisilin lipozomlanma düzeyi %15 ±3 olarak belirlendi.

Lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımı, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde bulunan partikül sayıcı yardımı ile ölçüldü (Sympatec HELOS (HO728) Particle Size Analyser, Sympatec GmbH).

#### İlaç Uygulaması

Altışarlı gruplar halinde hayvanlara dönüşümlü olarak (birer hafta aralıklarla) aşağıda belirtilen şekilde ilaç uygulamaları yapıldı.

1. grup: Damar içi serbest ampisilin sodyum (SA) (5mg/kg)

2. grup: Damar içi lipozomal ampisilin sodyum (LA) (5mg/kg)

Serbest ve lipozomal ampisilin sodyum (5 mg/kg) 20 ml serum fizyolojik içerisinde dilüe edildi. Dİ uygulamalar ise 20 ml olarak *V. jugularis*'e uygulandı.

#### Kan Örneklerinin Toplanması

Hayvanlardan ilaç uygulamasını takiben 2.5., 5., 10., 15., 20., 25., 30., 45., 60., 90., 120., 180., 240., 360., 480., 600., 720. dakikalarda *V. jugularis*'ten steril enjektörlerle alınan kan örnekleri (5 ml), 1500 g de 15 dk santrifüje edilerek serumları çıkartıldı. Serum örnekleri analiz edilene kadar -80 °C' de saklandı.

#### Serum ampisilin ekstraksiyonu

Serum örneklerinde ampisilin ekstraksiyonu için Escudero ve ark.(1996) tarafından önerilen yöntemden faydalandı. Buna göre, 350 µl serum örneği üzerine 2 ml asetonitril eklenerek vortekste 15-20 saniye karıştırıldı. Karışım 1500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte oluşan sıvı faz alınıp, üzerine 3 ml diklormetan eklendi ve yeniden 1500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte oluşan fazın (230 - 280 µL) 100 µL'si HPLC' ye uygulandı.

#### Ampisilin HPLC parametreleri

Serum örneklerdeki ilaç konsantrasyonlarının belirlenmesinde, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma laboratuvarın da bulunan likit kromatografi ( UV-VİS spektrofotometrik dedektör, LC-6A model, Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya) kullanıldı.

HPLC analizi, Escudero ve ark (1996), tarafından belirtilen yöntemle yapıldı. HPLC de Dedektör; UV-VİS spektrofotometrik. Kolon; C 18 Shimpack CLC-ODS, 250 x 4.6 mm. Dalga boyu; 219 nm. Mobil faz; Asetonitril, 0.01 M potasyum fosfat buffer (pH:7.4) (5/95, v/v). Akış hızı; 1.6 ml/dakika olarak ayarlandı.

### Farmakokinetik Hesaplamalar

Ampisilin Sodyum'un serbest ve lipozomal formlarının Dİ uygulanmasından sonra zamana göre serum ilaç eğrisinin "iki kompartımanlı dışa açık model" e uygunluk gösterdiği belirlendi. Farmakokinetik değişkenlerin belirlenmesinde Wagner (1975) tarafından bildirilen eşitliklere göre (GW-Basic 2.02) ve Shumaker (1986)' e göre (PKCALC 1987) hesaplama yapan iki farklı bilgisayar programı kullanıldı. Ampisilin serbest ve lipozomal formlarının Dİ yolla verilmesini takiben her bir hayvanın serum yoğunluk -zaman eğrileri çizildikten sonra aşağıdaki temel eşitlikler üzerinden farmakokinetik değişkenler hesaplandı.  $Y = A_1 e^{-\alpha t} + A_2 e^{-\beta t}$

Bu formüllerde Y yoğunluğu,  $A_1$  ve  $A_2$  matematik katsayıları,  $\alpha$  dağılım dönemindeki eğrinin eğimi (dağılım hız sabitesi),  $\beta$  atılma dönemindeki eğrinin eğimi (atılım hız sabitesi) ifade etmektedir.

Uygulamadan sonra elde edilen eğrinin altındaki alan (EAA) değerleri,  $T_0$ 'dan  $T_\infty$ 'a kadar değişen zamanda trapez metoduna göre hesaplandı. Farmakokinetik değişkenlerden dağılım dönemi yarı ömrü ( $t_{1/2\alpha}$ ), eliminasyon yarı ömrü ( $t_{1/2\beta}$ ), ortalama kalış süresi (MRT), kararlı durumdaki dağılım hacmi ( $V_{d(ss)}$ ), alana göre hesaplanan görünür dağılım hacmi ( $V_{dalan}$ ), merkezi bölme dağılım hacmini ( $V_1$ ), toplam serum klirensi (Cl) değerleri, Dİ yolla uygulanan serbest ve lipozomal formdaki ampisilin vücuttaki davranışlarını karşılaştırmak için değerlendirilmedi.

### İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel hesaplamalarda SPSS (SPSS 8.0 for Windows, Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Illinois, USA) programı kullanıldı. Farmakokinetik değişkenler arasındaki fark, her iki ilaç formunun kendi içinde "Student t test" karşılaştırılması ile belirlendi. Veriler aritmetik ortalama ve  $\pm$  standart hata (SEM) şeklinde ifade edildi. İstatistik önem derecesinin kontrolü  $p < 0.05$ ' e göre yapıldı.

## BULGULAR

Uygulanan metodun serumdan ilacı geriye kazanım oranı %  $87 \pm 5$ , ölçülen en düşük miktar ise 0.016  $\mu\text{g/ml}$  olarak bulundu.

Ampisilin lipozomlanma oranının %  $15 \pm 3$  olduğu belirlendi ve uygulanacak lipozomal ampisilin dozu da bu orana göre hesaplandı.

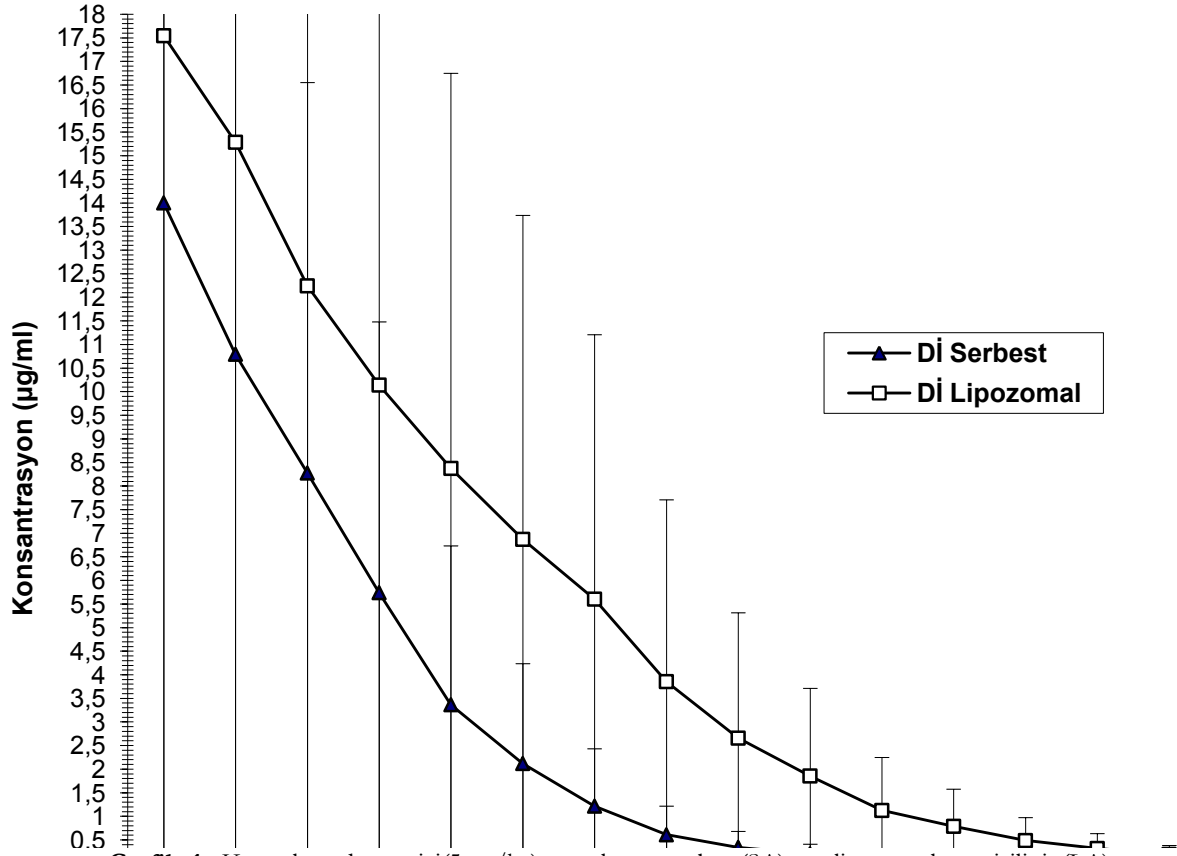
Elde edilen lipozomun ortalama partikül çapı  $4.47 \pm 1,3 \mu\text{m}$  olarak belirlendi.

Serbest ve lipozomal ampisilin Dİ uygulanmasını takiben elde edilen serum ilaç konsantrasyonları Grafik. 1 de, farmakokinetik değişkenler ise Tablo.1 'de gösterilmiştir.

Serbest ampisilin uygulamasından sonra serum örneklerinde ölçülebilir en düşük konsantrasyon 4.saatte (0.020  $\mu\text{g/ml}$ ), LA da ise 10.saatte (0.090  $\mu\text{g/ml}$ ) belirlendi.

Serbest ve lipozomal ampisilin dağılım dönemi yarı ömürlerinin ( $t_{1/2\alpha}$  serbest=0.13 saat,  $t_{1/2\alpha}$  lipozom= 0.23 saat) önemli derecede ( $p < 0.05$ ) farklı oldukları gözlemlendi (Tablo 1). LA'nın Dİ uygulaması sonucunda eliminasyon dönemi yarılanma ömrünün daha uzun olduğu ( $t_{1/2\beta} = 2,28$  saat), klirensinin ise daha yavaş gerçekleştiği ( $Cl = 0.41$  l/saat/kg) izlendi. LA daha geniş ( $p < 0.05$ ) bir dağılım hacmi ( $V_{d(ss)} = 0,78$  l/kg) sergilerken, EAA ve MRT parametreleri de SA'dan daha büyük ( $p < 0.05$ ) bulundu.

Lipozomal ve serbest formun  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $V_1$ ,  $k_{12}$  değerleri arasında istatistiksel fark izlenmezken ( $p > 0.05$ ),  $\alpha$  ve  $\beta$  değerlerinin LA formda önemli oranda küçük ( $p < 0.05$ ) olduğu görüldü (Tablo.1).



**Grafik 1:** Koyunlara damar içi(5mg/kg) uygulanan serbest(SA) ve lipozomal ampisilin(LA) serum ampisilin düzeyleri.

**Graph 1:** Serum Ampicillin concentrations of free and liposome-encapsulated ampicillin after intravenous(5mg/kg) administration in Sheep.

**Tablo 1:** Koyunlara damar içi(5mg/kg) uygulanan serbest(SA) ve lipozomal ampisilin(LA) farmakokinetik parametreleri (Ortalama  $\pm$  SEM) (n: 6).

**Table1:** Pharmacokinetic parameters of free and liposome-encapsulated ampicillin after intravenous(5mg/kg) administration in Sheep (Mean  $\pm$  SEM) (n:6)

Parametre	Serbest Ampisilin	Lipozomal Ampisilin	p
A <sub>1</sub> (µg/ml)	15.72 $\pm$ 0.59	17.38 $\pm$ 0.78	---
A <sub>2</sub> (µg/ml)	1.89 $\pm$ 0.20	1.99 $\pm$ 0.23	---
$\alpha$ (saat <sup>-1</sup> )	5.46 $\pm$ 0.19	2.98 $\pm$ 0.15	***
$\beta$ (saat <sup>-1</sup> )	1.17 $\pm$ 0.06	0.30 $\pm$ 0.01	***
EAA <sub>0-∞</sub> (µg.saat/ml)	4.56 $\pm$ 0.31	12.58 $\pm$ 0.74	***
V <sub>1</sub> (l/kg)	0.29 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.02	---
k <sub>12</sub> (saat <sup>-1</sup> )	1.10 $\pm$ 0.09	1.16 $\pm$ 0.12	---
k <sub>10</sub> (saat <sup>-1</sup> )	3.91 $\pm$ 0.18	1.54 $\pm$ 0.03	***
V <sub>dalan</sub> (l/kg)	0.93 $\pm$ 0.06	1.37 $\pm$ 0.11	**
V <sub>d(ss)</sub> (l/kg)	0.47 $\pm$ 0.02	0.78 $\pm$ 0.05	***
t <sub>1/2β</sub> (saat)	0.54 $\pm$ 0.02	2.28 $\pm$ 0.06	***
t <sub>1/2α</sub> (saat)	0.13 $\pm$ 0.00	0.23 $\pm$ 0.01	***
MRT (saat)	0.43 $\pm$ 0.04	1.90 $\pm$ 0.06	***
Cl (l/saat/kg)	1.12 $\pm$ 0.16	0.41 $\pm$ 0.02	***

---: p>0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, matematiksel kat sayılar,  $\alpha$ ; dağılım dönemindeki eğrinin eğimi veya hız sabitesi,  $\beta$ ; atılma dönemindeki eğrinin eğimi veya hız sabitesi, EAA<sub>0-∞</sub>; eğrinin altında kalan alan, V<sub>1</sub>; merkezi bölme dağılım hacmini, k<sub>12</sub>; merkezi bölmeden çevresel bölmeye birinci derece geçiş hız sabitesi, k<sub>10</sub>; merkezi bölmeden atılma hız sabitesi, V<sub>dalan</sub>; alana göre hesaplanan görünür dağılım hacmi, V<sub>d(ss)</sub>; kararlı durumdaki dağılım hacmi, t<sub>1/2β</sub>; eliminyasyon yarı ömrü, t<sub>1/2α</sub>; dağılım dönemi yarı ömrü, MRT; ortalama kalış süresi, Cl; toplam klirens.



## TARTIŞMA

Yapılan çalışmada koyunlara damar içi SA ve LA uygulamasından sonra elde edilen farmakokinetik özellikler, iki kompartmanlı açık modele uygunluk gösterdi (Carcales ve ark 1996, Escudero ve ark 1999, Khanikor ve ark 1986, Yuan ve ark 1997).

Çoğu araştırmacı Dİ verilen lipozomal fomidaki ilaçların RES dokuları tarafından alıkonduğunu bildirmektedir(Oku ve Namba 1994, Emmen ve Storm 1987, Bakker-woundenber 1985). RES dokuları (dalakta serum değerinin 15, karaciğerde ise 5 katı konsantrasyonda) tarafından tutulan LA'nın bu bölgelerden salınarak dolaşıma geçtiği belirlenmiştir(Fattal ve ark 1991, Pardue ve White 1997). Çalışmamızda serbest ampisilin 4.saatten (0.020 µg/ml) sonra serum örneklerinde ölçülemezken (0.016 µg/ml), lipozomal ampisilin 10.saatte 0.090 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Ratlara (75 mg/kg, Dİ) verilen SA'nın plazma konsantrasyonları 1 saat sonra ölçülemezken, LA uygulamasından sonraki 12. saatte de ampisilin ölçülebilmıştır(Pardue ve White 1997). Ratlarda yapılan farklı bir çalışmada (20 mg/kg, Dİ) serbest gentamisin 8. saat plazma konsantrasyonunun 0.1 µg/ml iken, lipozomal gentamisin konsantrasyonu 24. saatte uygulama dozunun %15-20 si olarak ölçülmüştür (Schiffelers ve ark 2001).

Çalışmamızda, LA'nın EAA değeri SA' ya göre yüksek ( $p < 0.001$ ) bulunmuştur. Ratlarda yapılan bir çalışmada (Dİ) uygulanan lipozomal ampisilin EAA değeri SA'ya göre 70 kat yüksek olduğu bildirilmiştir(Schiffelers ve ark 2001).

Ampisilin serbest formunun ortalama kanda kalma zamanı (MRT=0.43 saat) Qukessou ve Toutain (1992) koyunlarda (10 mg/ kg Dİ) elde ettikleri değerden (MRT=0.55 saat) daha kısa bulunmuştur. Escudero ve ark. (1999) da ampisilin koyunlardaki (133.33 mg/kg Dİ) yarılanma ömrünü 0.37 saat olduğunu bildirmişlerdir. Bu farklılıklar hayvan ırkı, yaş, kilo ve doz gibi faktörlerden kaynaklanabilir. Ayrıca ampisilin renal klirensindeki farklılıkların da farmakokinetik parametreleri etkileyebileceği de ifade edilmektedir (Elsheikh ve ark 1997).

Lipozomal ilaçların serbest formlarına göre dolaşımdan daha geç uzaklaştırıldığı, RES dokularından dolaşıma devamlı ilaç geçtiği ve klirensinin düşük olduğu bildirilmiştir (Pardue ve White 1997). Yaptığımız çalışmada, LA klirensi SA'ya göre daha düşük ( $p < 0,001$ ), MRT değeri ise SA'ya göre daha büyük ( $p < 0,001$ ) bulundu. Pardue ve White (1997), yaptıkları çalışmada ratlarda Dİ yol ile verdikleri LA'nın klirensini SA'ya göre daha

düşük, MRT değerinin daha büyük olduğunu tespit etmişlerdir. LA'nın dağılım ( $t_{1/2\alpha} = 0.23$  saat) ve eliminasyon yarı ömrü ( $t_{1/2\beta} = 2.28$  saat), SA ( $t_{1/2\alpha} = 0.13$  saat ve  $t_{1/2\beta} = 0.60$  saat) uygulamasına göre istatistiksel olarak yüksek ( $p < 0.001$ ) bulunmuştur. LA uygulaması sonrasında tespit edilen  $k_{10}$  değerinin de (1.54 saat) SA'ya göre (3.91 saat) göre düşük bulunması lipozomal ampisilin merkezi bölmeden atılımının yavaş olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar lipozomal ampisilin serbest ampisiline göre vücuttan atılımının daha yavaş, dolaşımda kalma süresinin ise daha uzun olduğu anlamına gelmektedir.

Lipozomal ampisilin dağılım hacimleri SA'ya göre yüksek bulundu ( $p < 0.05$ ). Pardue ve White (1997), ratlarda yaptıkları bir çalışmada damar içi LA'nın dağılım hacmini SA dağılım hacminden büyük olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu durumun lipozomal ilaçların daha geniş doku aralıklarına (özellikle karaciğer, dalak ve akciğer) dağıldığı ve hücre içine konsantre olabileme özelliklerinin de daha iyi olmasıyla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. *L.monocytogenes* ile enfekte edilen farelere LA uygulanarak SA'ya göre, teröpötik etkisinin 90 kat arttığı, uygulanan dozun %56 sının karaciğere, %23 nün ise dalağa geçerek makrofajlardaki bakterileri etkilediği belirlenmiştir(Kreuter 1991, Bakker-Woundenber ve ark.1985).

Çalışmamızda, çoğu bakteri için bildirilen EKEY (0.01-0.5 µg/ml) değeri dikkate alındığında SA'nın 45 dk- 4 saat (0.61 - 0.02 µg/ml), LA'nın ise 3-12 saat (0.61 -0.090 µg/ml) EKEY değerinin üzerinde serum konsantrasyonları sağlayabildiği belirlenmiştir. Bu sonuç, ampisilin lipozomal formunda kullanımı ile antibakteriyel spektrum kapsamındaki mikroorganizmalara karşı etkisini daha uzun bir zaman diliminde sergileyeceği anlamına gelmektedir. Özellikle ampisilin hücre içine ölçülemeyecek kadar az akümüle olduğu(Youssef ve ark.1988) dikkate alındığında LA'nın hücre içi bakterilere karşı daha etkili olacağı söylenebilir. Farelerde, peritoneal makrofajların *L. monocytogenes* ile enfekte edildiği bir çalışmada, 100 µg LA ve 50 µg SA birlikte uygulandığında 12 saatte bakterilerin %99'unun öldürüldüğü, buna karşın 150 µg SA'nın bakterilerin yalnızca üremesini durdurduğu bildirilmiştir (Bakker-Woundenber ve ark.1986). SA'nın makrofajlara düşük oranda geçtiği buna karşın LA'nın fagositoz yoluyla hücre içine alınarak bakterilere etki ettiği bildirilmiştir (Bakker-Woundenber ve ark.1986). *E.coli* ve *B. fragilis* ile enfekte edilen ratlara lipozomal cefoxitin (Dİ,15 mg/kg) verildiğinde periton sıvısı ve karaciğer doku

konsantrasyonu, serbest formuna göre yüksek olduğu belirlenmiştir (Kresta ve ark 1993).

### SONUÇ

Ampisilin lipozomal formda kullanımı ile etkili kan konsantrasyonunun (EKEY) uzun süre korunabilmesi neticesinde, sık aralıklarla ilaç alınımının engellenebileceği, doza bağlı yan etkilerinin görülme sıklığının azalabileceği, aynı miktarda etken madde kullanılarak antibakteriyel etkinin *in vivo* ortamda daha uzun süre etkisini sağlayabileceği görüşündeyiz. Ancak lipozomal şekillerin; üretiminin ekonomik olmaması, üretim hatalarından kaynaklanabilecek doz ayarlamasının güçlüğü ve stabilite sorunları ve de farklı uygulama yollarına göre kullanılması gereken dozun tespit edilememesi gibi faktörler kullanımını sınırlamaktadır. Belirtilen muhtemel sonuçların daha gerçekçi olarak izlenebilmesi için özellikle ampisilin gibi hücre içine giriş yetenekleri sınırlı olan antibakteriyel maddelerin lipozomal formlarının sağlıklı ve deneysel enfeksiyon oluşturulmuş canlılardaki etkilerinin belirlenmesinin faydalı olabileceği inancındayız.

### LİTERATÜR LİSTESİ

- Allen TM.** Liposomal drug formulations. *Drugs*. 1998; 56: 747-756.
- Bakker-Woudenbeg IAJM, Lokerse AF, Roerdink FH, Regts D, Michel MF.** Free versus liposome- entrapped ampicillin in treatment of infection due *Listeria monocytogenes* in normal and athymic (nude) mice. *The Journal of Infectious Diseases*. 1985; 151(5): 917- 924.
- Bakker-Woudenbeg IAJM, Lokerse AF, Vink-Vandenberg JC, Roerdink FH, Michel MF.** Effect of liposome- entrapped ampicillin on survival of *Listeria monocytogenes* in murine peritoneal macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1986; 30(2): 295-300.
- Bakker-Woudenbeg IAJM, Lokerse AF, Ten Kate MT, Mouton JV, Woodle MC, Storm G.** Liposomes with prolonged blood circulation and selective localization in *Klebsiella pneumoniae* infected lung tissue. *Journal infected disease*. 1993; 168: 164-171.
- Bermudez LE, Yau-Young AO, Lin J, Cogger J, Young LS.** Treatment of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection of beige mice with liposome-Encapsulated aminoglycosides. *The Journal of Infectious Disease*. 1990; 161: 1262-1268.
- Bermudez LE.** Use of liposome preparation to treat *Mycobacterial* infections. *Immunobiol*. 1994; 4(5): 578-583.
- Brander GC, Pugh DM, Bywater RJ, Jenkins WL.** Penicillins and cephalosporins, In: *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*, 5<sup>th</sup> Edition, Bailliere Tindall Co, London. 1991; p: 440-444.
- Carcales CM, Espundy A, Vicente MS, Diaz MS, Escudero E.** Single-dose pharmacokinetics of ampicillin/sulbactam (2:1) combination after intravenous administration to sheep and goats. *Research Veterinary Science*. 1996; 61(2): 143-146.
- Düzgüneş N, Flasher DL, Reddy MV, Luna-Herrera J, Gangadharam PRJ.** Treatment of *mycobacterium avium* complex infection by free and liposome-encapsulated sparfloxacin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1996; (40): 2618-2621.
- Elskeikh HA, Osman IA, Ali BH.** Comparative pharmacokinetics of ampicillin trihydrate, gentamicin sulphate and oxytetracycline hydrochloride in nubian goats and desert sheep. *J Vet Pharmacol Therap*. 1997; 20: 262-266
- Emmen F, Storm G.** Liposomes in treatment of infectious diseases, *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, 1987; 9: 162-171.
- Escudero E, Espundy A, Vicente MS, Carceles CM.** Comparative pharmacokinetics of an ampicillin/sulbactam combination administered intramuscularly in lactating sheep and goats. *Veterinary Research*. 1996; 27(3): 201-208.
- Escudero E, Espundy A, Vicente MS, Carceles CM.** Pharmacokinetics of ampicillin-sulbactam combination after intravenous and intramuscular administration to sheep. *Canadian Journal Veterinary Research*. 1999; 63(1):25-30.
- Fattal E, Rojas J, Youssef M, Couvreur P, Andrement A.** Liposomes-entrapped ampicillin in the treatment of experimental murine listeriosis and salmonellosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991; 35(4)770-772.
- Fierer J, Hatlen L, Lin J, Estrella D, Mihalko P, Young Y.** Succesful treatment using gentamicin liposomes of *Salmonella* Dublin infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990; 34(2): 343-348.

- Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE.** Chemotherapy of microbial Disease, In: Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ed: Wonsiewicz MJ, McCurdy P, 9<sup>th</sup> Ed, Section IX, The McGraw Hill Comp, USA. 1996; p: 1084-1085.
- Huber WG.** Penicillins, In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Ed:Booth NH, McDonald LE, Chapter: 49, Iowa State University Pres Ames. 1988; p:803.
- Kaya S.** Penisilinler In: Veteriner Uygulamalı Farmakoloji, Ed; Kaya S, Piriñçi İ ve Bilgili A, Cilt 2, İkinci baskı, MEDİSAN Yayın Evi, Ankara. 1997; p: 303-320.
- Khanikor HN, Srivastava AK, Paul BS, Malik JK.** Pharmacokinetic and tissue distribution studies of ampicillin in Bubalus bubalis. Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics. 1986; 9(2):223-226.
- Kresta A, Shek PN, Odumeru J, Bohnen.** Distribution of free and liposome-encapsulated cefoxitin in experimental intra abdominal sepsis in rats. J Pharm Pharmacol. 1993; 45:779-783.
- Kreuter J.** Liposomes and nanoparticles as vehicles for antibiotics. Infection. 1991;19(4): 224-228.
- Lutwyche P, Cordeiro C, Wiseman DJ, ST-Louis M, Uh M, Hope MJ, Webb MS, Finlay BB.** Intracellular delivery and antibacterial activity of gentamicin encapsulated in pH-sensitive liposomes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1998; 42(10): 2511-2520.
- Majumdar S, Flasher D, Friend DS, Nassos P.** Efficacies of liposome encapsulated streptomycin and ciprofloxacin against M, avium-M, intracellular complex infections in human peripheral blood monocytes/macrophages. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1992; 36(12): 2808-2815.
- Oku N, Namba Y.** Long-circulating liposomes. Critical Reviews Therapeutic Drug Carrier Systems. 1994; 11(4): 231- 270.
- Pardue RL, White CA.** Pharmacokinetic evaluation of liposomal encapsulated ampicillin in male and female rats. Biopharmaceutics Drugs Disposition. 1997; 18(4): 279-292.
- Ranade W.** Drug Delivery Systems 1 Site-Specific drug delivery using liposomes as carriers. J Clin Pharmacol. 1989; 29: 685-694.
- Schiffelers RM, Storm G, Kate MTT, StearneCullen LET, Hollander JGD, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IAJM.** In vivo Synergistic interaction of liposome- Coencapsulated Gentamicin and Ceftazidime. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2001; 298(1): 369-375.
- Schumacher I, Margalit R.** Liposomes-encapsulated ampicillin : Physicochemical and antimicrobial properties, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1997; 86(5): 635-641.
- Shumaker RC.** PKCALC: A Basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. Drug Metabol Rev. 1986; 17:331-48.
- Qukessou M, Toutain.** Effect of water deprivation on absorption(oral, intramuscular ) and disposition of ampicillin in sheep. Journal of Pharmacology Therapeutics. 1992; 15(4): 421-432.
- Traver DS, Riviere JE.** Ampicillin in mares: A comparison of intramuscular sodium ampicillin or sodium ampicillin - ampicillin trihydrate injection. American Journal Veterinary Research. 1981; 43(3): 402-404.
- Yuan ZH, Miao XO, Yin YH.** Pharmacokinetics of ampicillin and sulfadimidine in pigs infected experimentally with Streptococcus suum. Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics. 1997; 20: 318-322.
- Youssef M, Fattal E, Alonso MJ, Roblot-Treupel L, Sauzieres J, Tancrede C, Omnes A, Couvreur P, Andremont A.** Effectiveness of Nanoparticle-bound ampicillin in the treatment of listeria monocytogenes infection in athymic nude mice. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1988; 32: 8, 1204-1207.
- Wagner JG.** Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics, Drug Intelligence Pub Inc, Illinois, 1975; USA.
- Webb M, Boman NL, Wiseman DJ, Saxon D, Sutton K, Wong KF, Logan P, Hope MJ.** Antibacterial efficacy against an in vivo Salmonella Typhimurium infection model and pharmacokinetics of a liposomal



Ciprofloksasin formulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1988; 42(1): 45-52.

**Woodle MC, Lasic DD.** Sterically stabilized liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992; 1113: 171-199.

**Xiong Y, Kupperwasser LI, Zack PM, Bayer AS.** Comparative efficacies of liposomal Amikacin (MiKosome) plus oxacillin versus conventional amikacin plus oxacillin in experimental endocarditis induced by *Staphylococcus aureus*: Microbiological and echocardiographic analyses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999; 43(7): 1737-1742.