
В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ

УДК 616.982.27-039:615.33

НАНОЛИПОСОМАЛЬНЫЙ ГЕНТАМИЦИН И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕЛИОИДОЗА

**К. А. Ротов, С. Н. Тихонов, Е. А. Снатенков, В. В. Алексеев*,
В. А. Антонов*, В. В. Алексеева*, С. С. Савченко, В.Я. Курилов**

*Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоградский государственный
медицинский университет**

В работе представлены данные по получению и изучению липосомальных форм гентамицина сульфата и его влияния при экспериментальном мелиоидозе белых мышей. При сравнительном изучении эффективности данного препарата в свободной и липосомальной формах для лечения экспериментального мелиоидоза установлено, что иммобилизация гентамицина сульфата в фосфолипидные везикулы позволила в 3 раза повысить их эффективность.

Ключевые слова: мелиоидоз, гентамицина сульфат, липосомы.

LIPOSOME-ENTRAPPED GENTAMICIN AND ITS USE IN TREATMENT OF MELIOIDOSIS

**K. A. Rotov, S. N. Tikhonov, E. A. Snatenkov, V. V. Alekseev,
V. A. Antonov, V. V. Alekseeva, S. S. Savchenko, V. Ya. Kurilov**

The data on preparation of liposome-entrapped gentamicin sulfate and their investigation on albino mice with melioidosis are presented. Comparative study of the efficacy of gentamicin sulfate in free and liposome-entrapped forms showed that immobilization of antibiotics in phospholipids vesicles provided a 3-fold increase of their efficacy.

Key words: melioidosis, gentamicin sulfate, liposome.

Мелиоидоз — инфекционное заболевание, распространение которого в природе имеет определенные географические границы (регионы с влажным субтропическим климатом). Длительное время существовало твердое убеждение, что мелиоидоз эндемичен лишь для влажных субтропиков стран Юго-Восточной Азии.

Заболевания мелиоидозом людей и животных и выделение возбудителя *Burkholderia pseudomallei* из внешней среды в Австралии, Чили, Сальвадоре, Франции [10], Италии и других странах показали всю серьезность проблемы диагностики, лечения при почти непредсказуемых последствиях завоза этого патогена в страны с умеренным климатом [9, 11]. Практически во всех странах Западной Европы, включая Скандинавию, за последние годы зарегистрированы случаи мелиоидоза среди лиц, побывавших в качестве туристов или специалистов в эндемичных зонах.

Сложности лечения мелиоидоза, в первую очередь, обусловлены природной резистентностью возбудителя (*Burkholderia pseudomallei*) ко многим антибиотикам. Летальность при несвоевременно начатой

терапии у больных септической и легочной формой мелиоидоза превышает 90 %, а при лечении самыми современными препаратами в клинических условиях — более 40 %.

В последние годы внимание многих исследователей привлекают липосомальные препараты антибиотиков. Включение антимикробных средств в состав липосом позволяет уменьшить токсичность и снизить терапевтические дозы используемых соединений, изменить характер распределения в организме, пролонгировать их действие [1]. Липосомы являются удобным и эффективным носителем лекарственных веществ. Они биосовместимы, не вызывают аллергических, пирогенных, иммунологических реакций, облегчают проникновение лекарственных препаратов внутрь клетки [2, 3].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Создание нанолипосомальной формы гентамицина, оценка физико-химических свойств препарата и эффективности лечения острой мелиоидозной инфекции.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Липосомы готовили методом обращения фаз [15] из хроматографически чистых лецитина и холестерина («Serva», Германия) в весовом соотношении 7:3. Материалом для включения внутрь липосом служил гентамицина сульфат (ОАО «Синтез», Курган, Россия). Экструзию липосомального гентамицина проводили через поликарбонатные мембраны с размером пор 100 нм. Средний размер и однородность по размеру липосом определяли методом электронной микроскопии (инструментальное увеличение — 120000). Количество включенного в липосомы антимикробного препарата определяли микробиологическим методом [4]. Степень окисления липидов липосомальной мембраны (проба Клейна) определяли спектрофотометрически [12].

Экспериментальную мелиоидозную инфекцию моделировали путем внутрибрюшинного введения *B.pseudomallei* 100 экспериментальным животным в дозе 2×10^3 мк/мл в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида. Липосомальный гентамицина сульфат в дозах (1,42 и 2,84 мг) и свободный антибиотик (2 и 4 мг) вводили внутрибрюшинно аутобредным мышам обоего пола массой 18—20 г, начиная со следующих суток после заражения — 3 дня подряд, а затем с интервалом 48 ч в течение 15 сут. Выживших животных вскрывали на 30—60-е сутки после заражения. Эффективную дозу препарата оценивали по ED₅₀.

Для выделения и очистки ДНК при исследовании биологического материала использовали метод нуклеосорбции на силикагеле в присутствии гуанидинтиоционата, описанный Boom R. с соавт. [8]. Все манипуляции при постановке реакции амплификации проводили в соответствии с методическими указаниями 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности» (2003 г.).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) со специфичными праймерами для обнаружения *B.pseudomallei* осуществляли в объеме 25 мкл в микроцентрифужных пробирках. Реакцию амплификации проводили на программируемом термоциклере «Терцик» производства НПФ «ДНК-технология» с применением процедуры «горячего старта» и на приборе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Австралия) в режиме реального времени.

Полученные результаты обрабатывали статистически [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы проведены эксперименты по сравнительной эффективности методов детекции *B.pseudomallei*.

При анализе результатов ПЦР в режиме реального времени выявлено, что чувствительность реакции при исследовании чистой культуры возбудителя мелиоидоза составляла 1×10^2 мк/мл/мл (рис. 1). Полученные нами результаты совпали с данными других авторов о высокой эффективности Real-Time PCR для детекции возбудителей особо опасных инфекций (ООИ) [18].

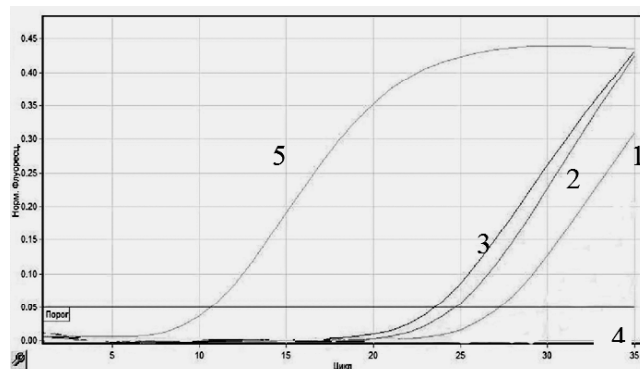


Рис. 1. Пример тестирования чистой культуры *B.pseudomallei* 100 в режиме реального времени (амплификация и детекция результатов на приборе «Rotor-Gene 6000»):

1 — *B.pseudomallei* 100, 1×10^2 мк/мл/мл; 2 — *B.pseudomallei* 100, 1×10^3 мк/мл/мл; 3 — *B.pseudomallei* 100, 1×10^4 мк/мл/мл; 4 — «-» контроль (на рисунке ниже порога детекции); 5 — «+» контроль (*B.pseudomallei* 136, 1×10^8 мк/мл/мл)

Для обнаружения мелиоидозного микроба в секционном материале использовали бактериологический метод и ПЦР.

Таблица 1

Результаты выявления *B.pseudomallei* у животных с острым мелиоидозом на различных стадиях заболевания

Объект исследования	Бактериологический метод			ПЦР		
	сроки наблюдения (сут.)			сроки наблюдения (сут.)		
	1	3	5	1	3	5
лимф. узел	-	100	100	40	100	100
печень	-	100	100	20	100	100
селезёнка	-	100	100	20	100	100
лёгкие	-	100	100	10	100	100
кровь	-	100	100	20	100	100

Примечание. Числами обозначены % положительных результатов, полученных тем или иным методом.

Следующий этап работы касался непосредственно получения и использования липосомального гентамицина для лечения экспериментальной инфекции.

В результате работы показано, что размер полученных липосом, содержащих гентамицин, не превышал 100 нм (рис. 2). Количество липосом в 1 мл составило $0,8 \times 10^5$. Концентрация гентамицина составила 0,08 г/мл липосом. Степень окисления липидов мембраны липосом составила 0,895 ед.

В предыдущих исследованиях [6] нами была изучена острая токсичность гентамицина сульфата в

свободной и липосомальной форме, при этом LD₅₀ составляла соответственно (8,8 ± 0,76) мг/животное и (14,6 ± 2,6) мг/животное.

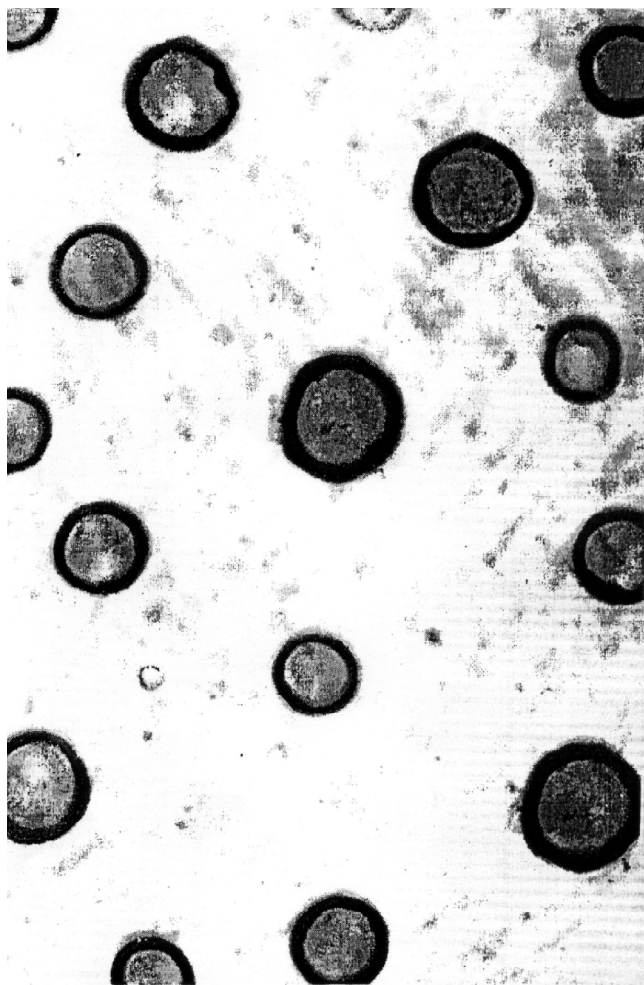


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение липосом, содержащих гентамицина сульфат (увеличение x120000)

Применение свободной и липосомальной форм гентамицина при мелиоидозной инфекции показало, что свободная форма антибиотика в дозах 2 и 4 мг защищала от гибели всего 33 % экспериментальных животных, ED₅₀ антибиотика составила 4,2 мг. Использование антибиотика в липосомальной форме в дозах 1,42 и 2,84 мг увеличивало показатель защиты от 1,5 до 2,5 раз соответственно по сравнению со свободной формой антибиотика. При этом ED₅₀ препарата в липосомах уменьшилась в 3 раза (табл. 2).

Иммобилизация гентамицина в липосомы позволила снизить дозу и увеличить эффективность антибиотика при экспериментальной мелиоидозной инфекции (табл. 3).

По данным ряда авторов, возбудитель мелиоидоза обладает природной устойчивостью к гентамицину [12, 13, 15]. По крайней мере, при анализе штам-

мов лишь два из них были чувствительны к свободной форме гентамицина [16].

Таблица 2

Сравнительное изучение лечебного действия гентамицина сульфата в свободной и липосомальной формах при мелиоидозной инфекции

Наименование препарата	Доза, мг	Соотношение выжившие/ кол-во в группе	Процент защиты	Средняя продолжительность жизни, сут	ED ₅₀ препарата, мг	ТИ*
Гентамицина сульфат	2	2/6	33,3	7,3	4,46 ± 0,76	1,97
Гентамицина сульфат	4	2/6	33,3	11,3		
Гентамицина сульфат липосомальный	1,42	3/6	50	11,8	1,42 ± 0,38	10,28
Гентамицина сульфат липосомальный	2,84	5/6	83,3	15,5		
Контроль 10 ³	-	0/6	-	9,3	-	-
Контроль здоровья	-	6/6	-	-	-	-

Примечание. ТИ* — терапевтический индекс (LD₅₀ препарата / ED₅₀ препарата).

Таблица 3

Элиминация *B. pseudomallei* 100 из организма животных при лечении разными дозами липосомальной формы гентамицина сульфата

Препарат	Доза, мг	Время наблюдения (сут)					
		1	2	3	4	5	6
Контроль	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Гентамицина сульфат в липосомах	1,42	++	+	+	-	-	-
	2,84	++	+	-	-	-	-

Примечание: 1. +++ — сплошной рост возбудителя на чашке с агаром; 2. ++ — до 40 колоний на чашке с агаром; 3. + — единичные колонии; 4. — отсутствие возбудителя.

Однако в представленной нами работе на примере гентамицина показана роль липосомальных форм антибиотиков для терапии экспериментальной особо опасной инфекции. Можно предположить, что антибиотик, включенный в липосомы, при введении лабораторным животным, захватывается клетками мононуклеарной фагоцитарной системы и, благодаря этому, в органах, содержащих большое количество макрофагов (лимфатические узлы, печень, селезенка, легкие), создается повышенная концентрация препарата, причем на более длительный промежуток времени, чем при использовании свободного антибиотика. Наблюдаемый эффект липосом может явиться следствием их направленного транспорта к патологически измененным тканям с последующим взаимодействием с клеточными мембранами в очаге повреждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно сделать заключение о высокой эффективности ис-

пользуемых наноструктур. При этом явно контурируется их преимущество перед стандартной формой антибиотика, однако истинная причина таких различий на сегодняшний день не ясна, что, несомненно, требует дополнительных исследований. Кроме того, для вывода данной технологии на промышленную основу необходима стабилизация всех процессов производства липосомальных антибиотиков, начиная от формирования микросфер, способов стерилизации готовых препаратов и заканчивая контролем включенного в липосомы антимикробного препарата и стабильности полученных липосом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П., Воробьев Л. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л., 1962. — 180 с.
2. Бабицкая С. В., Жукова М. В., Кисель М. А. и др. // Химико-фарм. журнал, 2006, № 3. — С. 36—38.
3. Березовская Л. Н., Грязнова Н. С., Баурамашвили Д. И., Яроцкий С. В. // Антибиотики и химиотерапия. — 1990. — Т. 35, № 10. — С. 31—35.
4. Дмитриева В. С. Микробиологический контроль активности антибиотических препаратов. — М.: Медицина, 1965. — 112 с.
5. Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Трофимов Д. ПЦР «в реальном времени». — М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. — 223 с.
6. Ротов К. А., Снатенков Е. А., Храпова Н. П. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2005. — Вып. 89. — С. 68—69.
7. Allen T. M., Martin F. J. // Semin Oncol. — 2004. — № 31. — P. 5—15.
8. Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M., et al. // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol. 28, № 3. — P. 495—503.
9. Cheng A. C., Currie B. J. // Clin. Microbiol. Rev. — 2005. — Vol. 18. — P. 383—416.
10. Fournier J., Bussy G. // Ann. Inst. Pasteur (Paris) — 1967. — Vol. 112. — P. 93—104.
11. Kanai K., Dejsirilert S. // Jpn. J. Med. Sci. Biol. — 1988. — Vol. 41. — P. 123—157.
12. Klein R. A. // Biochim. et biophys. acta. — 1970. — № 210. — P. 486—489.
13. Moore R. A., Deshazer D., Reckseidler Sh., et al. // Antimicrobial agents and chemotherapy. — 1999. — Vol. 43. — P. 465—470.
14. Schweizer H. P., Peacock S. J. // Emerg. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 14. — P. 1689—1692.
15. Szoka F., Papahadjopoulos D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75, № 9. — P. 4194—4198.
16. Tan A. L., Tan M. L. // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. — 2008. — Vol. 102, Suppl. 1. — P. S101—S102.
17. Thibault F. M., Hernandez E., Vidal D. R., et al. // J. Antimicrob. Chemother. — 2004. — Vol. 54. — P. 1134—1138.
18. Tomaso H., Pitt T. L., Landt O., et al. // Mol. Cell Probes. — 2005. — Vol. 19. — P. 9—20.

Контактная информация

Алексеев Владимир Валерьевич — д. м. н., профессор, директор ФГУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, зав. кафедрой молекулярной биологии и генетики ВолГМУ, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.