

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ АНТИБИОТИКОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ НЕКОТОРЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Г. К. Исмаилова, Е. Б. Жилченко, Д. В. Ефременко, Т. В. Головченко, О. В. Малецкая, А. В. Одинец, Г. М. Кремнева, Л. В. Романова

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставропольская государственная медицинская академия

Показана возможность конструирования липосомальных форм антибиотиков, используемых для лечения сифилитической и бруцеллезной инфекций со степенью включения лекарственных препаратов в липосомы, составляющей 72–86%. В эксперименте выявлена высокая биологическая активность полученных липосомальных форм антибиотиков по сравнению с интактными.

*Ключевые слова:* липосомы, антибиотики, лечение, бруцеллез, сифилис.

## EFFICIENCY OF LIPOSOMAL ANTIBIOTICS IN TREATMENT OF EXPERIMENTAL INFECTIOUS DISEASES

G. K. Ismailova, E. B. Zhilchenko, D. V. Efremenko, T. V. Golovchenko, O. V. Maletskaya, A. V. Odinets, G. M. Kremneva, L. V. Romanova

*Abstract.* A possibility of constructing liposomal forms of antibiotics for the treatment of syphilitic and brucellar infections with the share of medicines incorporated into liposomes of 72-86% has been shown. Experiments revealed a high biological effectiveness of liposomal forms of antibiotics obtained as compared with intact forms.

*Key words:* liposomes, antibiotics, treatment, brucellosis, syphilis.

Антимикробная терапия часто оказывается малоэффективной, если возбудители инфекционных заболеваний паразитируют внутри клеток хозяина, что защищает их от обычных форм лекарственных веществ и иммунных сил организма. Эти особенности и определяют бруцеллез и сифилис как хронические рецидивирующие заболевания.

Способность липосом обеспечивать доставку лекарственных препаратов внутрь клетки предопределяет их успешное использование при лечении многих заболеваний [4, 5, 6, 8]. Однако получение липосом необходимого качества сопряжено с рядом трудностей, одна из которых заключается в отсутствии сырья, удовлетворяющего требованиям, предъявляемым к веществам, которые используются для создания лекарственных препаратов.

В литературе описан способ получения фосфолипидов – структурных компонентов липосомальной мембраны [7] – и основанный на их экстракции из головного мозга крупного рогатого скота, но из-за массовых случаев заболеваний губкообразной энцефалопатией ("коровье бешенство") в настоящее время не рекомендуется использование головного и спинного мозга крупного рогатого скота [2].

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Поиск новых видов сырьевых источников

природных фосфолипидов животного происхождения, пригодных для создания липосом, разработка технологии получения стабильных липосомальных форм антибиотиков, используемых для лечения экспериментального сифилиса и бруцеллеза и изучения их антибактериального действия.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами предложена модификация способа получения фосфолипидов [7], в котором сырьем являлся свежий и замороженный головной мозг свиней, так как в доступной нам литературе не встречаются данные о случаях заражения свиней губкообразной энцефалопатией [Там же].

Схема выделения фосфолипидов из животного сырья заключалась в многократной хлороформно-этанольной экстракции липидов с последующим их осаждением ацетоном. Выход готового продукта из 1 кг головного мозга свиней составил 16,8 %.

Фракционный состав полученного комплекса фосфолипидов из головного мозга свиней определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках "Silufol" ("Kavalier", Чехословакия) размером 15×15 см в системе растворителей хлороформ : метанол : вода (65:25:4). Использовали тест-наборы стандартов фосфолипидов ("Sigma", США). Обнаружено, что, помимо фос-

фатидилхолина, фосфатидилглицерина, фосфатидинозитола, фосфатидилэтанолamina, фосфатидилсерина и фосфатидных кислот, в выделенном препарате содержались дополнительно кардиолипин, сфингомиелин, цереброзиды, холестерин и нейтральные липиды, что соответствует литературным данным [3, 10].

Определение окисленности жирнокислотных остатков проводили по содержанию продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида – методом пробы с 2-тиобарбитуровой кислотой [9]. В результате проведенного анализа содержание малонового диальдегида в готовом продукте фосфолипидов находилось в интервале 5,89–6,25 нмоль/л, что свидетельствует о довольно низком протекании процессов перекисного окисления липидов.

Существуют разнообразные методы получения липосом, в результате которых образуются везикулы различного размера, состава, структуры и внутреннего объема. Выбор того или иного метода конструирования липосом определяется целью работы, природой включаемого вещества, его расположением в бислойных везикулах – во внутреннем объеме или в бислойной мембране [1].

В задачи исследований входила оценка пригодности различных способов получения стабильных липосом с максимальным включением антибиотиков и сохранением их активности. Основными критериями оценки метода служили удельный внутренний объем полученных везикул, простота и доступность метода.

Для приготовления липосом использовали методы ручного встряхивания, этанольной инъекции, озвучивания мультиламеллярных везикул, замораживания-оттаивания, выпаривания и обращения фаз "в присутствии детергента". Расчет удельного внутреннего объема липосом проводили, используя в качестве включаемого материала глюкозу как низкомолекулярное, гидрофильное, электронейтральное вещество, не способное к адсорбции и проникновению через липидную мембрану [3]. После удаления невключившейся в липосомы глюкозы методом диализа и разрушения липосом 1 %-м раствором тритона X-100 определяли количество "захваченной" глюкозы и рассчитывали удельный внутренний объем, то есть отношение внутреннего объема к количеству липидов, образующих липосомы.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все серии липосомальных препаратов проводили электронномикроскопический контроль с определением их размера. Результаты изучения структуры, размеров и внутреннего объема липосом, полученных различными методами, представлены в таблице.

Таким образом, для получения липосом с максимальным внутренним объемом нами рекомендовано сочетанное использование методов вы-

паривания в обращенной фазе и замораживания-оттаивания.

#### Физические параметры липосом, полученных различными методами

Метод получения липосом	Характер ультраструктуры везикул	Размер липосом, нм	Удельный внутренний объем липидов, л/моль
Выпаривание в обращенной фазе	Большие моноламеллярные (80 %)	160–900	9
	Мультиламеллярные (20 %)	100–800	
Замораживание-оттаивание	Большие моноламеллярные	150–1500	10
Озвучивание мультиламеллярных везикул	Малые моноламеллярные	5–20	1
Этанольная инъекция	Большие моноламеллярные	100–850	1,7
Ручное встряхивание	Мультиламеллярные	200–1900	5
В присутствии детергента	Большие моноламеллярные	200–950	6

Для лечения экспериментального бруцеллеза в липосомы включали доксициклин (доксициклина гидрохлорид, ЗАО "Брынцалов А", г. Москва, Россия) и азитромицин ("Сумамед", "Плива", Респ. Хорватия), для терапии сифилиса – бензилпенициллин (бензилпенициллина натриевая соль кристаллическая во флаконах для внутримышечного введения по 500 тыс. ЕД, "Синтез", г. Курган, Россия) и экстенциллин (бензатинбензилпенициллин во флаконах для внутримышечного введения по 2,4 млн ЕД, регистрационный № 003833 от 07.04.1994).

Антибиотики включали в предварительно полученные методом выпаривания в обращенной фазе липидные везикулы путем шестикратно повторяющихся циклов замораживания-оттаивания. Использование этой методики позволило инкапсулировать в липосомы от 72 до 86 % включаемых антибиотиков. Невключившийся материал удаляли диализом, а для стабилизации липосом проводили лиофилизацию полученных препаратов в присутствии криопротектора – 5 %-й сахарозы.

Сифилитическую инфекцию моделировали на кроликах путем введения взвеси патогенных бледных трепонем Никольса в мошонку и во внутреннюю сторону бедра подкожно в дозе 5000 м. к. Лечение первичного сифилиса начинали через 30 дней от момента заражения, хронического – спустя 3 месяца от заражения.

(21)

При лечении экспериментального первичного сифилиса путем внутримышечных инъекций в бедро натриевой соли бензилпенициллина по 50 тыс. ЕД/кг 4 раза в день в течение 10 суток или 2 инъекций экстенциллина в той же дозе с промежутком в 7 суток; клинические проявления заболевания на 15-е сутки от момента начала лечения начинали нивелироваться с рубцеванием шанкров, на месте которых через 30 дней оставалась лишь пигментация. Введение по тем же схемам и в то же место липосомальных антибиотиков в половинных дозах через 15 дней приводило к полной ликвидации всех клинических проявлений экспериментального первичного сифилиса.

Лечение антибиотиками экспериментально вторичного сифилиса, начатое спустя 3 месяца от момента заражения кроликов на фоне выраженных клинических проявлений по аналогичным схемам лечения первичного сифилиса, но с удлинением срока лечения для натриевой соли бензилпенициллина до 20 суток и экстенциллина до 21 суток (3 инъекции), обеспечивало к 30-м суткам негативацию клинических проявлений, сопровождающихся регрессом папулезных высыпаний на половых органах, корнях ушей и лапах, паренхиматозного кератита, полиаденита, которые полностью исчезали через 60 дней после начала лечения. Липосомальные антибиотики, вводимые экспериментальным животным по тем же схемам, но в половинных дозах, обеспечивали полное исчезновение клинических проявлений к 30-м суткам.

Бруцеллезную инфекцию моделировали на беспородных белых мышах путем введения под кожу бедра по  $0,5 \cdot 10^5$  м.к. высоковирулентного штамма *Brucella melitensis* 565 в 0,5 мл физиологического раствора. Об эффективности лечения судили по данным бактериологического исследования, осуществляемого путем посева на агар Альбими с рН = 7,2 гомогенизированных паховых, аксиллярных, подчелюстных, парааортальных лимфоузлов и селезенки, взятых от умерщвленных декапитацией животных.

Эффективность липосомальных антибиотиков в лечении генерализованной бруцеллезной инфекции оценивали в сравнении с действием их свободных форм. Доксциклин как традиционно используемый антибиотик при лечении бруцеллеза эффективен лишь при парентеральном введении в высоких дозах, что повышает его токсическое действие. В лечении длительно протекающих хронических инфекций зачастую более предпочтительно пероральное применение антибиотиков. Включение доксициклина в липосомы способствовало повышению эффективности проводимой пероральной этиотропной терапии бруцеллеза беспородных белых мышей относительно лечения их свободными формами антибиотика. При приеме внутрь для достижения

одинакового терапевтического эффекта потребовалась вдвое меньшая доза липосомального доксициклина, чем свободного, вводимого внутримышечно. При применяемой суточной дозе свободного антибиотика 1,25 мг/мышь и липосомального – 0,6 мг/мышь двумя десятидневными курсами у 40 % зверьков бруцеллы не были обнаружены. Использование липосомального доксициклина позволяло заменить внутримышечное введение антибиотика пероральным. При оральном введении липосомального доксициклина в дозе 1,25 мг/мышь/сут. по той же схеме лечения свободными от возбудителя инфекции после окончания лечения оказались 95 % животных.

При проведении этиотропной терапии экспериментальной бруцеллезной инфекции также выявлено преимущество липосомального азитромицина перед его свободной формой при пероральном пути введения в организм экспериментальных животных. Для достижения одинакового терапевтического эффекта при генерализованной бруцеллезной инфекции доза интактного азитромицина вдвое превышала дозу липосомальной формы. При применении азитромицина в свободной форме по 1,2; а в липосомальной – по 0,6 мг/мышь/сут. бруцеллы не были обнаружены у 90 % грызунов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно сделать вывод, что фосфолипиды необходимого качества для использования в технологии липосомальных препаратов можно получить из головного мозга свиней.

Предложена биотехнология инкапсулирования антибиотиков, используемых для лечения сифилитической и бруцеллезной инфекций, позволяющая обеспечивать высокий уровень включения лекарственных препаратов в липосомы с сохранением их биологической активности.

В эксперименте показана высокая биологическая эффективность полученных липосомальных форм антибиотиков (бензилпенициллина и экстенциллина) по сравнению с интактными при лечении первичного и вторичного экспериментального сифилиса.

При лечении экспериментального бруцеллеза включение доксициклина в липосомы делает возможной замену инъекционных форм пероральными. Липосомальная форма азитромицина позволяет уменьшить дозы антибиотиков в два раза без потери их терапевтической активности.

Проведенные исследования являются предпосылкой для дальнейших разработок по возможности использования липосомальных антибиотиков, вводимых per os, и позволяют прогнозировать перспективность использованных научно-методических подходов для конструирования лекарственных препаратов нового поколения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ефременко В. И. Липосомы (получение, свойства, аспекты применения в биологии и медицине). – Ставрополь, 1999. – 236 с.
2. Костенко Ю. Г. // Ветеринария. – 1995. – № 5. – С. 7–9.
3. Кузякова Л. М. Методологические подходы и разработка технологии липосомальных лекарственных и лечебно-профилактических препаратов: автореф. дис. ... д-ра фарм. наук. – Пятигорск, 2000. – 40 с.
4. Кучма И. Ю., Волянский А. Ю., Москаленко В. Ф. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2000. – № 5. – С. 58–61.
5. Малецкая О. В. Научно-экспериментальное обоснование путей повышения эффективности этиотропной терапии бруцеллеза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Ставрополь, 2003. – 40 с.
6. Мисетова Е. Н. Метаболические изменения в

крови при различных способах введения липосом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ставрополь, 2003. – 21 с.

7. Пат. РФ № 2192265. Способ получения комплекса фосфолипидов / В. И. Ефременко, В. В. Оверченко, Е. Н. Мисетова и др. // Бюлл. – 2002. – № 31. – С. 114.

8. Ротов К. А., Тихонов Н. Г., Петров В. И. // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: матер. конф. – Киров, 1998. – С. 419–420.

9. Суслина С. Н. Разработка составов и технологии мазей и геля с маслом Виотон для лечения воспалительных и аллергических заболеваний кожи: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – М., 2000. – 20 с.

10. Шаршунова М., Щварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической медицине. – В 2 ч. – М.: Мир, 1980. – Ч. 2. – 379 с.

УДК 615.272.4:547.785.5:547.56

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НОВОГО СОЕДИНЕНИЯ РУ-1249, СОДЕРЖАЩЕГО В СТРУКТУРЕ ЭКРАНИРОВАННУЮ ФЕНОЛЬНУЮ ГРУППИРОВКУ

А. А. Орлова, В. А. Косолапов  
Кафедра фармакологии ВолГМУ

В работе изучены антиоксидантные свойства нового соединения под шифром РУ-1249, содержащего в структуре пространственно-затрудненную фенольную группировку, и препаратов сравнения дибунула и тролокса на трех моделях *in vitro* в концентрации 10 мкМ. Установлено, что на модели аскорбат-индуцированного перекисного окисления липидов соединение РУ-1249 проявило высокую антиоксидантную активность (89,2 % ингибирования), превосходя дибунол (75,9 %) и тролокс (61,9 %). При изучении механизмов действия было показано, что вещество РУ-1249 ингибировало липопероксильный радикал на модели хемилюминисценции желточных липопротеинов (79,3 %), немного уступая дибунолу (84,1 %) и тролоксу (84,2 %), и является эффективным перехватчиком активных форм кислорода, как показано на модели  $Fe^{2+}$ -люминол-зависимой хемилюминисценции (74,5 %), превосходя по данному виду активности дибунол (57,1 %) и тролокс (61,5 %).

*Ключевые слова:* антиоксидантные свойства, свободные радикалы, активные формы кислорода, фенольные антиоксиданты.

## ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NEW SUBSTANCE RU-1249, CONTAINING STERICLY HINDERED PHENOLIC GROUP IN ITS STRUCTURE

A. A. Orlova, V. A. Kosolapov

*Abstract.* Antioxidant properties of a new compound, coded as RU-1249 containing sterically hindered phenolic group in its structure, as well as reference drugs dibunol and trolox were studied *in vitro* in concentration of 10  $\mu$ M. It was established that RU-1249 compound showed a very high antioxidant activity (89,2 % inhibition) on the ascorbate-induced lipid peroxidation model, surpassing dibunol (75,9 %) and trolox (61,9 %). While studying the mechanisms of its action, it was shown that RU-1249 compound inhibited lipoperoxyl radical on vitelline lipoprotein chemiluminescent models (79,3 %), second to dibunol (84,1 %) and trolox (84,2 %); it was also shown that RU-1249 compound is an effective interceptor of reactive oxygen forms (74,5 %), which was shown on  $Fe^{2+}$ -luminol dependant chemiluminescence, exceeding dibunol (57,1 %) and trolox (61,5 %) in this kind of activity.

*Key words:* antioxidant properties, free radicals, reactive oxygen species, phenolic antioxidants.

Исследование антиоксидантных и антирадикальных свойств конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола представляется актуальным, так как ранее проведен-

ные исследования подтверждают наличие широкого спектра биологической активности, включая способность ингибировать процессы липопероксидации [4, 6, 8]. Особый интерес представляет