

УДК 579.861.2:615.33:615.014.23

АНТИСТАФІЛОКОКОВА АКТИВНІСТЬ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ ЛІНКОМІЦИНУ

Деркач С.А., Коцар О.В., Іванова Н.М.,
Воронкіна І.А., Крилова І.А.

Державна Установа «Інститут мікробіології та
імунології ім. І. І. Мечникова» Національної
академії медичних наук України

Проведене порівняльне вивчення антистафілокової активності нової ліпосомальної форми лінкоміцину (ЛФЛ) і звичайного (комерційного) препарату «лінкоміцин». Визначено, що мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) ліпосомальної форми у 8 разів нижче звичайного, комерційного лінкоміцину. Показана достовірно вища чутливість ($\chi^2 < 0,05$) вилучених штамів *S. aureus* із різних біотопів хворих на гнійно-запальні захворювання до лінкоміцину в ліпосомальній формі. При цьому близько 50, 0 % MRSA штамів також володіли чутливістю до ЛФЛ, що вказує на перспективність подальшого вивчення ліпосомальних форм антибіотиків для боротьби зі стафілоковою інфекцією.

Ключові слова: ліпосомальні антибіотики, лінкоміцин, антибіотикочутливість, стафілокок.

В останні роки відмічається зростання гнійно-запальних захворювань різної локалізації, зумовлених умовно-патогенними мікроорганізмами (УПМ) (більше 100 нозологічних форм) [1, 2]. До найбільш поширених УПМ належать представники роду *Staphylococcus*, які здатні викликати широкий діапазон патологічних процесів: гнійно-запальні захворювання шкіри і м'яких тканин, гайморити, тонзиліти, бронхіти, парадонтити, отити, захворювання сечо-статевої системи тощо.

Нерідко, саме стафілококи є етіологічними чинниками хронічних захворювань, здатні вражати практично будь-який орган, створюючи при цьому навіть загрозу для життя хворих [3-7].

Вони володіють поліорганним тропізмом, що пов'язано зі здатністю до адгезії на клітинах різних тканин і органів – епітелію, фібринектину, колагену, фібрину [8, 9].

Стафілококи відіграють найбільшу роль у розвитку інфекцій шкіри та м'яких тканин (близько 70 %) [5]. При порушенні бар'єрної функції епідермісу (подряпини, більш глибокі ушкодження, укуси комах, мацерації, оперативні маніпуляції тощо) стафілокок колонізує вражені ділянки і викликає гнійно-запальний процес.

Основним засобом боротьби зі стафілоковою інфекцією залишаються антибіотики, тому ефективність лікування прямо залежить від рівня антибактеріальної активності лікарських препаратів та здатності їх проникати в осередки інфекції.

Основне клінічне значення при лікуванні стафілокової інфекції мають бета-лактамі

антибіотики, але в останні роки все більшого значення набуває циркуляція штамів, стійких до препаратів цього ряду. Стійкість стафілококів до цих препаратів пов'язана з гіперпродукцією бета-лактамаз та з наявністю додаткового модифікованого білку (ПЗБ2а) (при наявності кодуєчого гену *mec A*).

Маркером наявності резистентності до бета-лактамів є стійкість до метициліну і оксациліну (MRS-штами). Терміни «метицилінорезистентність» і «оксацилінорезистентність» є повними синонімами. Згідно Наказу МОЗ № 167 (2007 рік) штами стафілококів, резистентні до оксациліну, вважають стійкими до всіх бета-лактамічних антибіотиків, а для лікування в таких випадках рекомендуються препарати інших класів [10].

MRS штами вважаються найбільш прогнозовано чутливими лише до глікопептидних антибіотиків – ванкоміцину та тейкоплакіну, хоча внаслідок їх багатовартості та наявності серйозних побічних дій, вони використовуються досить рідко (як правило, при важких внутрішньолікарняних захворюваннях, викликаних MRSA штамми).

Альтернативою бета-лактамічним антибіотикам та глікопептидам можуть бути різні комбінації антибіотиків інших класів або їх оригінальні форми.

Більшість сучасних лікарських препаратів у традиційних формах, досить обмежено проникають через клітинні біомембрани і після надходження до організму піддаються істотній біотрансформації, унаслідок чого втрачають свою фармакологічну активність [5, 7]. Саме тому, при розробці нових лікарських засобів наша увага була зосереджена на вивченні можливості збільшити здатність препаратів легко проникати через бар'єри біомембран клітин-мішеней. До таких препаратів відносять ліпосомальні форми антибіотиків, які дозволяють значно підвищити ефективність препаратів, знизити їх токсичність та терапевтичні дози.

Ліпосоми, що складаються з одного або декількох бішарів фосфоліпідів, уперше було описано в середині 60-х років ХХ століття. [11]. За порівняно короткий термін ліпосоми перетворились із простої моделі, що імітує клітинні мембрани, на об'єкт активних наукових досліджень і набули різноманітного практичного застосування. На сьогодні існує значна кількість лабораторних методик створення ліпосом і порівняно невелика кількість технологій, які застосовуються у виробництві. Проте, більшість цих методів мають обмеження за включенням біологічно активних субстанцій у ліпосоми внаслідок чутливості останніх до механічних та/або хімічних ушкоджень [12].

Розглядаючи способи взаємодії ліпосом із клітиною-мішенню, варто підкреслити, що подібність ліпідних оболонки ліпосом з біомембранами принциповим образом є теоретичною основою їхнього контакту. У теперішній час відомі різні механізми взаємодії ліпосом з клітиною, основними з яких є ендцитоз,

адсорбція, злиття ліпосомної мембрани з клітиною, проникнення ліпосоми через пори клітинної мембрани, контактний лізис та обмін ліпідами [13].

Питома вага ліпідів у структурі біологічних мембран ліпіди складає від 20 до 80 %, а більша їхня частина представлена групою полярних ліпідів. Таким чином, спорідненість до природних клітинних мембран становить принципово важливу особливість ліпосом.

У ліпосоми можна інкапсулювати сполуки, що легко окислюються, чим істотно уповільнити їх деградацію і захистити кінцевий продукт від передчасного розпаду [14].

В країнах СНД відомі ліпосомальні форми таких антибіотиків: амфотеріцину, тербінафіну, ністатину, гідразиду нікотинової кислоти, рифампіцину, гентаміцину, тетрацикліну тощо. Ліпосомальні форми лікарських препаратів широко застосовуються для лікування онкохворих [15].

Для отримання ліпосомальних антимікробних препаратів ми зупинилися на лінкоміцині, який відноситься до групи лінкозамідів. Лінкоміцин володіє бактеріостатичною дією, а при збільшенні дози – бактеріцидною. Механізм дії лінкоміцину пов'язаний з інгібуванням синтезу білків у клітинах бактерій. Препарат активний відносно грампозитивних аеробних та анаеробних мікроорганізмів, у тому числі і *Staphylococcus aureus*. Антибіотикостійкість до препарату розвивається повільно. Лінкоміцин добре проникає в більшість біологічних рідин. Після застосування лінкоміцину високі концентрації його спостерігаються в синовіальній рідині, слині, бронхіальному секреті, печінці, нирках, серцевому м'язі, статевих органах, кістковій тканині. Препарат призначають при інфекційних захворюваннях кісток та суглобів (септичний артрит, остеомієліт), інфекційних захворюваннях дихальних шляхів, ЛОР-органів (отит, синусит, фарингіт, трахеїт, бронхіт, пневмонія, абсцес легенів), а також при інфекціях м'яких тканин та шкіри (гнійні рани, абсцеси, фурункули, мастит, панарицій, бешиха) [16, 17].

Перевагою лінкоміцину є його маловартість, активність у різних лікарських формах (розчинах для ін'єкцій, таблетках, мазях, краплях, суппозиторіях).

Мета даного дослідження — визначення антистафілококової активності дослідних зразків ліпосомальних форм лінкоміцину

Основним завданням було визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) різних препаратів лінкоміцину відносно референс-штаму стафілококу та клінічних штамів метициліночутливих (MSSA) та метицилінорезистентних (MRSA) штамів, вилучених від позалікарняних хворих на гнійно-запальні захворювання.

Об'єкт дослідження — дослідні зразки ліпосомальних форм (№1 та № 2), які відрізнялись розміром ліпосом, зарядом (нейтральні та негативнозаряджені) та технологією отримання (захищені Патентом України 78590 UA, МПК А61К 39/085, опубл. 25.03.2013).

Автор розробки — співвиконавець НДР, канд.хім.наук, провідний науковий співробітник лабораторії молекулярної генетики ДУ “Інститут венерології та дерматології НАМН України” Іванова Н.М.

Для порівняння антистафілококової активності ліпосомальних форм антибіотика використовували комерційний препарат лінкоміцину виробництва ЗАО фармацевтична фірма “Дарниця” (розчин для ін'єкцій з концентрацією 300 мг/мл). В якості тест-культур були використані штами стафілококу: референтний ATCC 25923 та 27 клінічних штамів *S. aureus* (15 MSSA та 12 MRSA), вилучених від хворих на гнійно-запальні захворювання, які були ідентифіковані загально прийнятими мікробіологічними методами при виконанні НДР у 2014 році та відібрані до лабораторної колекції штамів [18]. У попередніх дослідженнях була також визначена їх метицилінорезистентність диско-дифузійним методом та скринінгом на агарі з оксациліном, згідно діючих методичних рекомендацій. Чутливість до оксациліну вивчалась за допомогою стандартних дисків (HiMedia, Індія) на агарі Мюллера-Хінтона [10].

Визначення МІК препаратів лінкоміцину проводили мікрометодом з використанням 96-лункових плоскодонних планшетів шляхом послідовних двократних розведень в поживному середовищі (бульон Мюллера-Хінтона) [19].

Для приготування основного розчину зразків антибіотика з вихідною концентрацією 300 мг/мл готували розведення у 100 разів. У першій лунці концентрація препарату складала 30 мг/мл. Далі титрування здійснювали за схемою, вказаною у таблиці 1.

Таблиця – 1. Схема титрування препарату лінкоміцину

№№ лунок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Концентрація препарату мг/мл	30	15	7,5	3,75	1,87	0,24	0,47	0,23	0,12	0,06	Контрольна лунка без лінкоміцину

Приготування суспензій культури стафілококу проводили за допомогою стандарту каламутності (0,50Д за шкалою McFarland),

розводили у 100 разів фізіологічним розчином до концентрації 10^6 КУО/см³. У кожен лунку вносили по 100 мкл культури стафілококу. Планшети інкубували при температурі 35° С протягом 18-20

години. Облік результатів проводили візуально. З МІК препарату приймали мінімальну його концентрацію, яка забезпечувала повне пригнічення видимого росту досліджуваного штаму.

Отримані результати досліджень оброблено методом варіаційної статистики – за допомогою програми – MS Excel 2000, Biostat з використанням стандартної похибки долі (Sp) та критерію χ^2 [20, 21].

Результати та обговорення

Залежно від технології створення ліпосом отримано дві його форми: лецитинові ліпосоми з

нейтральним зарядом (№1) та негативно заряджені ліпосоми (№2).

При дослідженні ступеня антимікробної активності комерційного лінкоміцину та його ліпосомальних форм були виявлені принципові відмінності. Антимікробна активність комерційної форми лінкоміцину (МІК) у відношенні референтного штаму *S. aureus* (ATCC 25923) склала 1,87 мкг/мл, ліпосомальної форми лінкоміцину № 1 - 0,47 мкг/мл, ліпосомальної форми № 2 - 0,23 мкг/мл.

Отже ліпосомальні форми лінкоміцину володіли достовірно вищою активністю (в 4-8 разів), ніж звичайний лінкоміцин (рис.1).

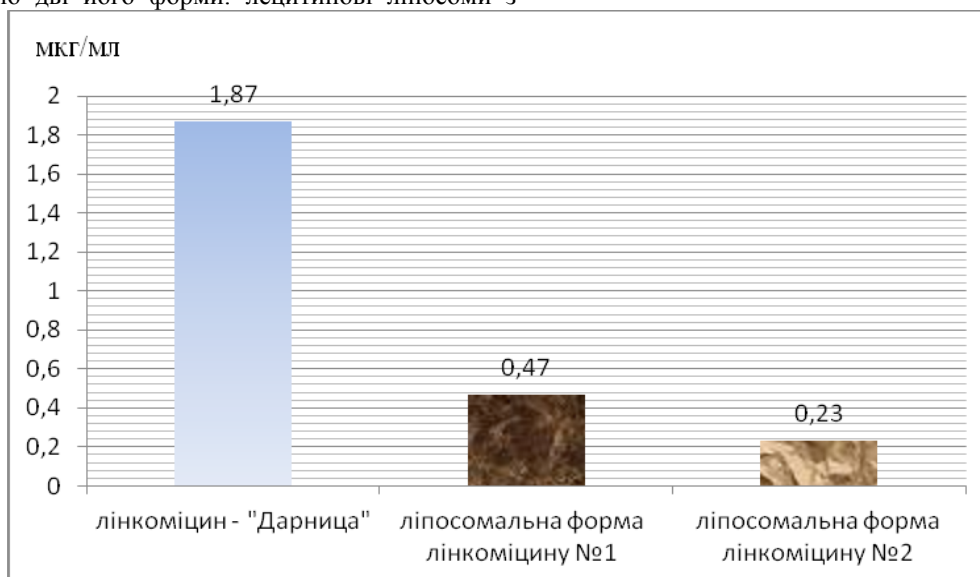


Рис. 1. Результати визначення МІК різних форм лінкоміцину відносно штаму *S. aureus* (ATCC 25923)

У подальших дослідженнях ми застосовували ліпосомальну форму №2 розробленого препарату, який виявився найбільш активним.

Окремою задачею було визначення антибактеріальної активності ліпосомального лінкоміцину відносно метициліночутливих (MSSA) та метицилінорезистентних штамів (MRSA) стафілококу. З цією метою була визначена МІК комерційного лінкоміцину та його ліпосомальної форми відносно 15 клінічних штамів MSSA та 12

штамів MRSA. Отримані результати приведені в таблиці 2.

Для оцінки рівня антистафілокової активності ліпосомальної форми лінкоміцину у порівнянні зі звичайним препаратом даного антибіотику, ми розподілили за значенням отриманих МІК всі дослідні штами на три групи: чутливі (МІК < 2,0), стійкі (МІК > 8,0) та помірно чутливі (з проміжними значеннями МІК: від > 2,0 до < 8,0), відповідно до інтерпретації аналогічних значень МІК лінкоміцину, регламентованих Наказом № 167 МОЗ України [10]

Таблиця 2 - Результати визначення протимікробної активності (МІК) комерційного лінкоміцину та його ліпосомальної форми відносно клінічних MSSA та MRSA штамів

Параметри значень МІК (мкг/мл)	Розподіл штамів відповідно МІК комерційного лінкоміцину «Дарниця» (% ± Sp)		Розподіл штамів відповідно МІК ліпосомального лінкоміцину (форма № 2) (% ± Sp)	
	MSSA (n=15)			
	Абс.ч	M±m	Абс.ч	M±m
0,06-2,0	5	33,3±12,6	10	66,7±12,6*
> 2,0- < 8,0	7	46,7±13,3	3	20,0±10,2*

8<	3	20,0±10,2	2	13,3±9,1*
MRSA (n=12)				
0,06-2,0	3	25,0±13,0	6	50,0±15,1*
> 2,0- < 8,0	2	16,7±11,2	4	33,3±14,2*
8<	7	58,3±14,9	2	16,7±11,2*

Примітка: * - відмінності статистично значимі (за показниками непараметричного критерію χ^2) щодо групи препарату порівняння.

Рівень антибактеріальної активності розробленої ліпосомальної форми лінкоміцину до клінічних штамів стафілококу був достовірно вищий у порівнянні зі звичайною формою комерційного лінкоміцину ($\chi^2 < 0,05$).

Порівнюючи показники чутливості штамів до досліджених форм лінкоміцину можна констатувати, що відсоток чутливих штамів (як MSSA так і MRSA) до розробленої форми антибіотика зріс у два рази (рис. 2).

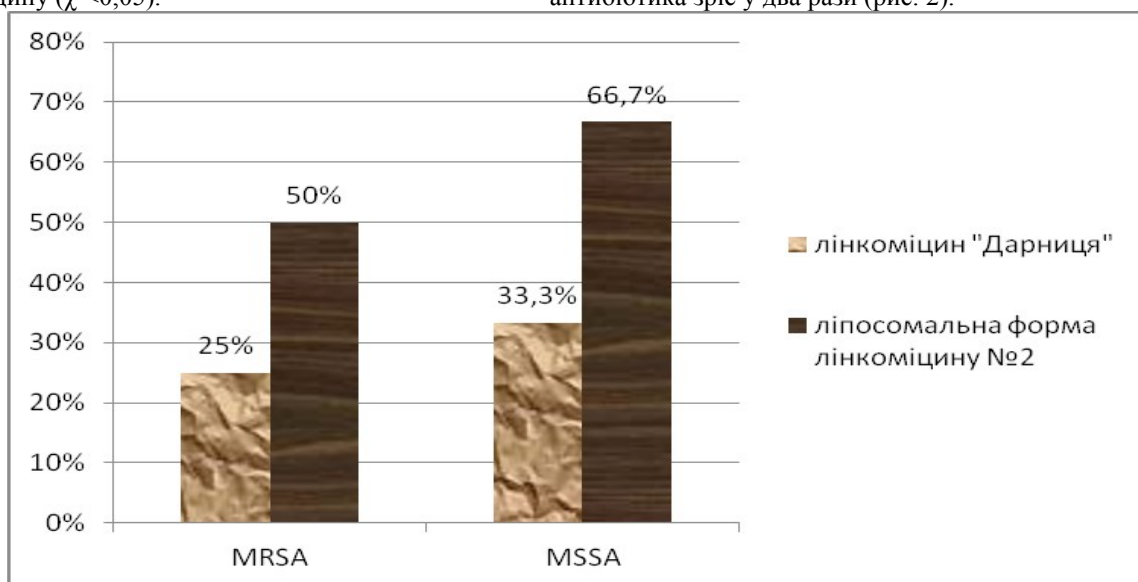


Рис. 2 Питова вага чутливих MSSA та MRSA штамів до комерційного лінкоміцину та його ліпосомальної форми 2

Особливо слід відзначити, що до ліпосомальної форми лінкоміцину були чутливими 50,0 % MRSA штамів, що вказує на доцільність використання такого антибіотика при лікуванні захворювань, зумовлених метицилінорезистентними штамми стафілококу.

Загальним висновком можна вважати те, що створення ліпосомальних препаратів з вираженою антибактеріальною активністю є досить перспективним напрямком у боротьбі зі стафілоковою інфекцією.

References:

1. Indicators of immunity in intraabdominal infection of mice [Text] / V. V. Mokrozub, L. P. Babenko, O. S. Voronkova, L. M. Lazarenko, M. J. Spivak, A. V. Chejpush // Scientific Herald of Uzhgorod National University. – 2010. – V. 27. – P. 34–36.
2. Local monitoring of antibiotic susceptibility [Text] / O. I. Mangurenko, E. A. Phedchun, P. V. Levchuk, V. F. Gricaj // Actual questions of pharmaceutical and medical science and practice. – 2011. – V. XXIV, №1. – P. 126–128.

3. Oleshko, G. M. Biological compound and immunobiological activity of factors of pathogenicity of staphylococci [Text] / G. M. Oleshko, G. A. Lubchenko // Ukrainian Biochemical Journal. – 2006. – V. 78. – №1. – P. 20–28.
4. Haziev, A. F. Interaction of α -toxin of *S. aureus* with eukaryotic cells and their targets / A. F. Haziev, N. A. Mihajlova, L. P. Blinkova [Text] // Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology. – 2006. – №2. – P. 110–114.
5. Guchev, I. A. Rational antimicrobial chemotherapy of infections of skin and soft tissues [Text] / I. A. Guchev, C. V. Cidorenko, V. N. Francuzov // Antibiotics and Chemotherapy. – 2003. – V. 48, №10. – P. 25–31.
6. Birukova, C. V. The interaction of the normal microbiota with the host [Text] / C. V. Birukova // Clinical Antibiotic Therapy. – 2000. – №2. – P. 8–11.
7. Scripnik, I. N. The role of disorders of intestine microbiocenosis in the pathogenesis of diseases of internal organs [Text] / I. N. Scripnik, A. C. Maclova // Infectious Diseases. – 2009. – № 6 (132). – P. 65–71.
8. Belov, B. C. A-streptococcal tonsillitis: modern aspects of antibiotic therapy [Text] / B. C. Belov // Pediatrics pharmacology. – 2007. – № 4 (3). – P. 59–66.

9. Chumakova, U. G. Comparative evaluation of the sensitivity of the bacteria of periodontal pocket to different antibiotics [Text] / U. G. Chumakova, Vishnevckaja A. A. // Modern dentistry. – 2012. – № 2 (61). – P. 55–70.
10. The order of MOH of Ukraine № 167 Determination of the sensitivity of microorganisms to antibiotics: [Text] / [In force from 2007-04-05]. – Access mode: <http://mozdocs.kiev.ua>
11. Liposomes: structure, properties, methods of introduction into the body for therapeutic purposes [Text] / M. O. Kiciakova, G. P. Gavriluk, O. C. Voronkova, O. A. Sirokvasha, A. I. Vinnikov // Herald of the Dnepropetrovsk University. Biology. Ecology. – 2010. – V. 18, T. 1. – P. 52–57.
12. Shulga, C. M. Liposomes and nanosomes: structure, properties, production [Text] / C. M. Shulga // Biotechnologia Acta. – 2013. – № 6 (5). – P. 19–40.
13. Demetros, C. [Text] // J. of Liposome Res. – 2008. – Vol. 18. – P. 159-173.
14. Rejman J., Wagenaar A., Engberts J.B., Hoerstra D. [Text] // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – Vol. 1660. – P. 41-52.
15. Velyka, M.M., Shevelova, N.Y. Liposomalni tehnologii in antimikrobniy himioterapii: Look around literaturi [Text] // Klinichna farmakologiya that farmakoterapiya.- 2008. - T. 12. - № 4. - p. 29-33.
16. Dehnich, A. V. Epidemiology of antibiotic resistance in nosocomial strains of *Staphylococcus aureus* in Russia: results of a multicenter study [Text] / A. V. Dehnich, I. A. Eydelshteyn, A. D. Narezkina // CMAC. – 2002. – № 4. – P.25–36.
17. Paliy, V. G. Study of antimicrobial properties of compositions on the basis of decamethoxinum [Text] / V. G. Paliy [et al.] // Scientific Herald of Uzhgorod National University series «Medicine». – 2012. – V. 1 (43) – P. 48-52.
18. Guidelines for the use of standardized microbiological (bacteriological) methods in clinical diagnostic laboratories [Text] / Application number 1 to the order of the USSR Ministry of Health number 535 of 22 April 1985 - 45 c.
19. Netrusova, A.I. Practical work on mikrobiologii [Text] // A.I. Netrusova. - M. : Akademiya, 2005. - 608 p.
20. Lapach, SM Statistical methods in biomedical studies using Excel [Text] / SM Lapach, AV Tschubenko, P. Babich. -K.: "MORION", 2001 - 408 p.
21. Glantz, S. Biomedical Statistics [Text] / Per. From English. - M.: Practice, 1998. - 459 p.

UDC 579.861.2:615.33:615.014.23

ANTISTAPHYLOCOCCAL ACTIVITY OF LIPOSOMAL FORMS OF LINCOMYCIN

Derkach S.A., Kotsar O.V., Ivanova N. N., Voronkina I.A., Krylova I.A.

Nowadays the vital problem of modern medicine is a tendency to emerging of both nosocomial and community-acquired strains before antibiotic resistance forming.

The complexity of antibiotic therapy of diseases caused by methicillin resistant staphylococci having high poly resistance almost to every classes of antibacterial agents

is of prime importance. One of the ways to improve antibacterial preparations still remains the development of their liposomal forms. This work studies anti-staphylococcal activity (according to MIC) of the liposomal form of lincomycin developed in the Institute of Dermatology and Venereology of Ukraine by Ivanova N. N., the Candidate of Chemical Sciences. The purpose of this research work was to study liposomal inhibiting concentration of the liposomalny form of lincomycin and a commercial preparation lincomycin (produced by CJSC "Pharmaceutical firm "Darnitsa"). Determination of the minimum inhibiting concentration was carried out by a tablet micromethod by consecutive cultivations of the samples under study. It is shown that MIC of liposomal lincomycin is eight times as low as usual lincomycin (0,23mkg/ml to 1,87 mkg/ml). Antibacterial activity of the liposomal form of lincomycin is studied concerning the patients selected from the different biotopes with pyo inflammatory diseases of staphylococcus strains (15 strains – methicillin sensitive, 12 strains - methicillin resistant). It is shown authentically the higher sensitivity of *S. aureus* strains to the liposomal form of lincomycin in comparison with usual lincomycin. Also 50.0% of MRSA strains were sensitive to the liposomalny form of lincomycin that shows the perspective for the development of the liposomal forms of antibiotics to cure staphylococcal infections.

Key words: liposomal forms of antibiotics, lincomycin, antibiotics sensitivity, staphylococcus