

**АКТИВНІСТЬ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ У ЛІПОСОМАЛЬНІЙ ФОРМІ
СТОСОВНО STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Було встановлено, що антимікробна активність ліпосомального лінкоміцину і ліпосомального бензоїлпероксиду, отриманих на основі яєчного лецитину, відносно планктонних клітин *Staphylococcus aureus* вища, ніж антимікробна активність розчину лінкоміцину і бензоїлпероксиду, в 3 і 14 разів відповідно. Негативно заряджені ліпосоми, отримані на основі полярних ліпідів та лінкоміцину, більш ефективні, ніж нейтральні ліпосоми: їх мінімально пригнічувальна концентрація (МПК) у 7 разів менша МПК лінкоміцину відносно планктонних клітин *Staphylococcus aureus*. Бензоїлпероксид у комбінації з лінкоміцином володіє адитивністю антимікробної активності й більш широким спектром дії відносно *Staphylococcus aureus*, ніж кожний із препаратів окремо.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ліпосоми, мінімально пригнічувальна концентрація, стафілокок *Staphylococcus aureus*, лінкоміцин, бензоїлпероксид.

ВСТУП. Шкіра хворих на atopічний дерматит засяяна різними мікроорганізмами, кількість яких значно більша, ніж на шкірі здорових людей. Так, наприклад, золотавий стафілокок (*Staphylococcus aureus*) висівається зі шкіри хворих на atopічний дерматит у 80–100 % випадків. При шкірних захворюваннях мікробної етіології в більшості випадків основу медикаментозного лікування і профілактики складають антибіотики. Широке застосування антибіотиків має негативні наслідки, одним з яких є вироблення у збудників лікарської резистентності до пеніциліну, гентаміцину, тетрацикліну, метициліну, лінкоміцину, сульфаніламідів, а також до антибіотиків нового покоління: фторхінолонів, цефалоспоринів II і III покоління, глікопептидів.

У зв'язку з цим, проблема профілактики і лікування інфекційних захворювань залишається актуальною. Одним зі шляхів її вирішення є впровадження в медичну практику нових хіміотерапевтичних засобів.

Необхідність пошуку нових наночасток і ліпосомальних форм лікарських препаратів зумовлена недостатньою ефективністю і токсичністю існуючих антибіотиків, зростанням резистентності до них мікроорганізмів. Відомо, що наночастки і ліпосомальні форми лікарських засобів дозволяють значно підвищити ефективність препаратів, знизити їх токсичність, терапевтичні дози і якісно змінити ха-

рактер їх дії. Так, у роботі [4] було показано, що, незважаючи на низькі концентрації, ефективність ліпосомального бензилпеніциліну для інгібування росту бактеріальної біоплівки золотавого стафілокока була вищою, ніж інтактного бензилпеніциліну.

У зв'язку з вищевикладеним, метою дослідження було вивчити ефективність дії антимікробних речовин у ліпосомальній формі стосовно *Staphylococcus spp.*

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі було використано: 10 % спиртовий розчин яєчного лецитину (ЗАТ "Біолік", Україна), ДМСО (Росія), суміш полярних ліпідів з негативним зарядом, отриману за оригінальною технологією, розробленою Н. М. Івановою [3]. Штам *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 отримано з Інституту мікробіології й імунології імені І. І. Мечникова АМН України. У роботі також застосовували субстанцію бензоїлпероксиду (Aldrich, США), лінкоміцин (ЗАТ "Дарниця", Україна), агар Мюллера-Хінтона (HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Індія)), м'ясо-пептонний бульйон.

Одержання ліпосом. Ліпосоми одержували методом випарювання ліпідів на вакуумному ротаційному випарювачі ("Vakuum-Rotation", Німеччина) з наступним суспендуванням у забуференому фізіологічному розчині з рН 7,4 і озвучуванням на диспергаторі УЗДН-А (Росія). Озвучування ліпосом проводили при охолодженні до 2–4 °С.

Одержання ліпосомальної форми антимікробних препаратів. Субстанцію бензоїлпероксиду (БП) розчиняли в хлороформі у зв'язку з його поганою розчинністю у водних розчинах і додавали до спиртових або хлороформних розчинів ліпідів у співвідношенні бензоїлпероксид:ліпіди 1:10, 1:20. Далі суміш випарювали й одержували ліпосоми, як зазначено вище.

Визначення розміру ліпосом. Розмір ліпосом визначали методом турбодиметрії за виміром оптичної щільності досліджуваної ліпідної суспензії в діапазоні хвиль 450–700 нм [2], розмір ліпосом складав 160–180 нм.

Очищення антибіотиків, які були інтеркольовані, від тих, що не були інтеркольовані, здійснювали шляхом ультрацентрифугування (центрифуга MSE-Superspeed 65, Англія) протягом години при 100 000 г. Вихід ліпосом визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм.

Визначення МПК антимікробних препаратів і їх ліпосомальних форм проводили мікротитраційним способом. Антибіотик і бензоїлпероксид розводили методом серійних розведень середовищем МПБ у плоскодонних планшетах, додавали до культури *Staphylococcus aureus*, інкубували при 34 °С протягом 24 год. Контролем слугувала культура *Staphylococcus aureus* без антимікробних речовин. Після цього висівали на щільне середовище Мюллера-Хінтона для визначення мінімально пригнічувальної концентрації (МПК).

Ефективність спільної антимікробної дії лінкоміцину та бензоїлпероксиду стосовно планктонних клітин *Staphylococcus aureus* визначали за допомогою методу checkerboard.

Мінімально пригнічувальною вважали найменшу концентрацію, що затримувала ріст *Staphylococcus aureus* протягом періоду інкубації.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Серед антибіотиків ми зупинилися на лінкоміцині, що належить до групи лінкозамідів. Він має бактеріостатичну дію щодо широкого спектра мікроорганізмів, при підвищенні дози проявляє бактерицидну дію. Протимікробний механізм дії лінкоміцину полягає в інгібуванні синтезу білків у клітинах мікроорганізмів. Препарат активний відносно грампозитивних аеробних і анаеробних мікроорганізмів, у тому числі *Staphylococcus spp.*

Бензоїлпероксид сам проявляє широкий спектр антимікробної дії. Він активний відносно бактерій, у тому числі й резистентних до анти-

біотиків. При визначенні МПК лінкоміцину і бензоїлпероксиду спочатку було використано ліпосоми (Лс) на основі яєчного лецитину (ФХ), тому що він є м'яким ліпідом і традиційно застосовується в ліпосомології. Співвідношення антибіотика і лецитину складало 1:20. У результаті визначення МПК лінкоміцину та його ліпосомальної форми встановлено, що ліпосоми, отримані на основі ФХ і лінкоміцину, більш ефективні, ніж розчин лінкоміцину при дії на планктонні клітини *Staphylococcus aureus* (рис. 1, № 2). МПК ліпосом цього складу була в 3 рази меншою, ніж МПК лінкоміцину.

У наступному експерименті для одержання ліпосомальної форми лінкоміцину ми використовували суміш полярних ліпідів з великим негативним зарядом, тому що в наших попередніх роботах було показано, що негативний заряд ліпосом істотно збільшує відсоток включення антибіотиків у ліпосоми [1].

Негативно заряджені ліпосоми, отримані на основі полярних ліпідів і лінкоміцину, були найбільш ефективними, їх МПК була в 7 разів меншою МПК лінкоміцину відносно планктонних клітин *Staphylococcus aureus* (рис. 1, № 3).

При визначенні МПК ліпосомальної форми бензоїлпероксиду на основі яєчного лецитину встановлено, що його МПК складала 31 мкг/мл, що було в 14 разів менше МПК бензоїлпероксиду, розчиненого у ДМСО.

Наступним етапом роботи було вивчення спільної дії лінкоміцину і БП на планктонні клітини *Staphylococcus aureus*. Дію лінкоміцину і БП у комбінації вивчали методом checkerboard.

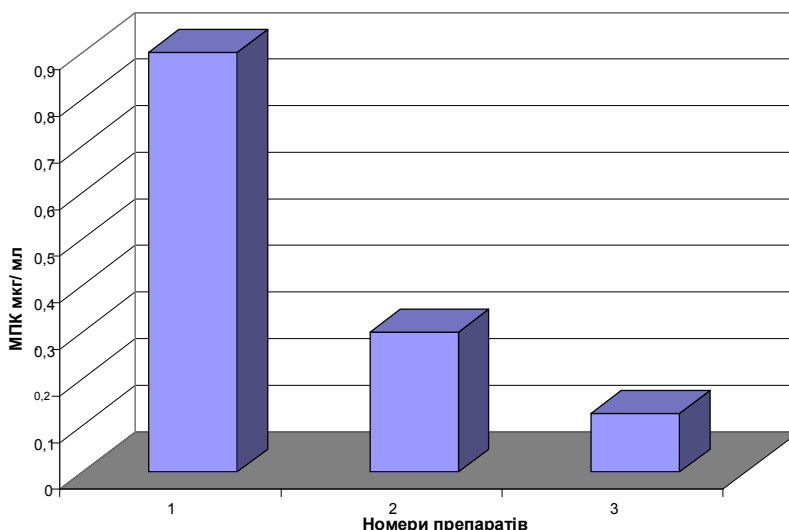
Особливістю методу checkerboard є те, що при вивченні комбінованого ефекту лінкоміцину вноситься від більшої концентрації (лунка № 1) послідовно до меншої концентрації (до лунки № 11, лунка № 12 – контроль – культура *Staphylococcus aureus* без антибіотика), більша концентрація БП вноситься в лунку № 11, а зменшені концентрації – аж до лунки № 1. Розраховують МПК для лінкоміцину і БП окремо та в комбінації. Визначають фракційний індекс інгібуючої концентрації ФІК за формулою:

$$\text{ФІК} = \frac{\text{МПК лінкоміцину в комбінації/МПК лінкоміцину одного} + \text{МПК БП у комбінації/МПК БП одного}}{\text{МПК лінкоміцину одного} + \text{МПК БП одного}}$$

При цьому якщо ФІК < 0,5, то відзначається синергізм дії антимікробних речовин, якщо ФІК 0,5–<1,0 – адитивність, якщо ФІК 1,0–<4,0 – індіферентність і якщо ФІК > 4,0 – антагонізм.

Отримані результати відображено в таблиці 1.

Дані таблиці вказують на те, що БП є ефективним стосовно *Staphylococcus aureus* і в



№ 1 – розчин лінкоміцину, № 2 – ліпосомальний лінкоміцин на основі ФХ, № 3 – ліпосомальний лінкоміцин на основі полярних ліпідів з негативним зарядом.

Рис. 1. Мінімально пригнічувальна концентрація лінкоміцину і його ліпосомальних форм.

Таблиця 1 – Ефективність антимікробної дії лінкоміцину і БП стосовно планктонних клітин *Staphylococcus aureus*

МПК, мкг/мл			ФІК	Ефект комбінованого застосування лінкоміцину+БП
лінкоміцин	БП	лінкоміцин+БП		
0,9	440	0,2+175	0,62	адитивність

комбінації з лінкоміцином володіє адитивністю антимікробної активності й більш широким спектром дії відносно *Staphylococcus aureus*, ніж кожний із препаратів окремо.

Отримані дані свідчать про можливість спільного застосування антибіотиків та бензоїлпероксиду при лікуванні *Staphylococcus aureus*.

ВИСНОВКИ. 1. Установлено, що мінімально пригнічувальна концентрація ліпосомальної форми антибіотика лінкоміцину з нейтральним зарядом (лецитинові ліпосоми) стосовно *Staphylococcus aureus* зменшувалась, порівняно з мінімально пригнічувальною концентрацією розчину лінкоміцину, в 3 рази.

2. Негативно заряджені ліпосоми, що містять лінкоміцин, зменшували його мінімально пригнічувальну концентрацію стосовно *Staphylococcus aureus* у 7 разів.

3. Мінімально пригнічувальна концентрація ліпосомальної форми антимікробного препарату бензоїлпероксиду з нейтральним зарядом (лецитинові ліпосоми) стосовно *Staphylococcus aureus* зменшувалась, порівняно з мінімально пригнічувальною концентрацією бензоїлпероксиду, в 14 разів.

4. Бензоїлпероксид є ефективним стосовно *Staphylococcus aureus* і в комбінації з лінкоміцином володіє адитивністю антимікробної активності.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вітчизняний антибіотик ципрофлоксацин для інфузій: протимікробні властивості та створення на його основі ліпосомальної форми / А. Я. Циганенко, Л. Г. Алмакаєва, Н. І. Коваленко [та ін.] // Вісник Вінницького Державного Медичного Університету. – 2002. – 6. – С. 367–368.

2. Фосфолипиды. Методы их выделения, обнаружения и изучения физико-химических свойств липидных дисперсий в воде : учебно-методическое пособие по биоорганической химии / под ред. Г. М. Сорокоумова, А. А. Селищева, А. П. Каплун. – М., 2000. – 105 с.

3. Hard charged liposomes inhibit complement – induced haemolysis / N. N. Ivanova, A. P. Kaplun, V. I. Shvets [et al.] // 24th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Proceeding. Abstracts. – Стокгольм, 1997. – P. 757–758.

4. Kim H. J. The delivery of benzyl penicillin to *Staphylococcus aureus* biofilms by use of liposomes / H. J. Kim, Jones M. N. // J. Liposome Res. – 2004. – № 14. – P. 123–139.

Н. Н. Иванова, Г. И. Мавров, С. А. Деркач, Е. В. Коцар
ИНСТИТУТ ДЕРМАТОЛОГИИ И ВЕНЕРОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, ХАРЬКОВ

АКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЕ ПО ОТНОШЕНИЮ К STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Резюме

Было установлено, что антимикробная активность в отношении планктонных клеток *Staphylococcus aureus* липосомального линкомицина и липосомального бензоилпероксида, полученных на основе яичного лецитина, выше, чем антимикробная активность раствора линкомицина и бензоилпероксида, в 3 и 14 раз соответственно. Отрицательно заряженные липосомы, полученные на основе полярных липидов и линкомицина, более эффективны, чем нейтральные липосомы: их МПК в 7 раз меньше МПК линкомицина в отношении планктонных клеток *Staphylococcus aureus*. Бензоилпероксид в комбинации с линкомицином владеет адитивностью антимикробной активности и более широким спектром действия по отношению к *Staphylococcus aureus*, чем каждый из препаратов отдельно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липосомы, минимально подавляющая концентрация, стафилококк *Staphylococcus aureus*, линкомицин, бензоилпероксид.

N. M. Ivanova, H. I. Mavrov, S. A. Derkach, E. V. Kotsar
INSITUTE OF DERMATOLOGY AND VENEROLOGY OF AMS OF UKRAINE, KHARKIV

ACTIVITY OF LIPOSOMAL ANTIMICROBIC PREPARATIONS CONCERNING STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Summary

It was found out the antimicrobial activity of liposomal lincomycin and liposomal benzoyl peroxide above, than antimicrobial activity of the lincomycin solution and benzoyl peroxide in 3 and 14 times accordingly concerning planktonic cells *Staphylococcus aureus*. Negatively charged liposomes received on the basis of polar lipids and lincomycin were more effective, than neutral liposomes. Minimum inhibitory concentration of them less of minimum inhibitory concentration of lincomycin in 7 times concerning planktonic cells of *Staphylococcus aureus*. The combination of benzoyl peroxide with lincomycin led to additive activities against *Staphylococcus aureus* and has given its wider antimicrobial activity than each of preparations.

KEY WORDS: the liposomes, minimum inhibitory concentration, *Staphylococcus aureus*, lincomycin, Benzoyl peroxide.

Отримано 12.09.11

Адреса для листування: Н. М. Иванова, вул. Шарикова, 53, кв. 181, Харків, 61189, Україна.