

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 616.5-022.7:579.861.2]-085.281-085.451.232/.234:547.953

©Н. М. Іванова, С. А. Деркач

ДУ “Інститут дерматології і венерології НАМН України”

АНТИСТАФИЛОКОКОВА АКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСУ БАКТЕРІОФАГІВ ТА ЛІПОСОМ

АНТИСТАФИЛОКОКОВА АКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСУ БАКТЕРІОФАГІВ ТА ЛІПОСОМ – Вивчено можливість підвищення ефективності дії комерційних бактеріофагів у їх комплексах з ліпосомами стосовно *Staphylococcus aureus* in vitro. Установлено, що мінімальна інгібуюча концентрація комплексу ліпосом та бактеріофагів, при якій знищувались планктонні клітини *Staphylococcus aureus* була у 10–100 разів меншою порівняно з мінімально інгібуючою концентрацією комерційних бактеріофагів. Лізуюча активність комплексу ліпосом та бактеріофагів залежала від складу та заряду ліпосом. Отримані дані свідчать про можливість використання комплексів ліпосом та бактеріофагів у лікуванні стафілококових інфекцій.

АНТИСТАФИЛОКОКОВАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ БАКТЕРИОФАГОВ И ЛИПОСОМ – Изучена возможность повышения эффективности действия коммерческих бактериофагов в их комплексах с липосомами относительно *Staphylococcus aureus* in vitro. Установлено, что минимальная подавляющая концентрация комплексов липосом и бактериофагов, при которой уничтожались планктонные клетки *Staphylococcus aureus*, была в 10–100 раз меньше в сравнении с минимально подавляющей концентрацией коммерческих бактериофагов. Лизирующая активность комплексов липосом и бактериофагов находилась в зависимости от состава и заряда липосом. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования комплексов липосом и бактериофагов в лечении стафилококковых инфекций.

ANTISTAPHILOCOCCAL ACTIVITY OF BACTERIOPHAGES AND LIPOSOME COMPLEX – It was studied the possibility of increasing the efficiency of the commercial phages in their complexes with the liposomes relative strains *Staphylococcus aureus*. It was found that the minimum inhibitory concentration of the complex of liposomes and bacteriophages destroyed planktonic cells *Staphylococcus aureus* in 10-100 times less than the commercial phages. The minimum inhibitory concentration of the liposomes and bacteriophages complexes depended on the composition and charge of the liposomes. The findings suggest the possibility of using liposome complexes and bacteriophages in the treatment of Staphylococcal infections.

Ключові слова: бактеріофаги, ліпосоми, *Staphylococcus aureus*, мінімальна інгібуюча концентрація.

Ключевые слова: бактериофаги, липосомы, *Staphylococcus aureus*, минимальная подавляющая концентрация.

Key words: bacteriophages, liposomes, *Staphylococcus aureus*, minimum inhibitory concentration.

ВСТУП Розповсюдження стафілокової мікрофлори з високою резистентністю до антибіотиків, розвиток дисбіозів і алергічного стану внаслідок антибіотикотерапії зумовлює пошук нових підходів до лікування хворих. Одним із перспективних напрямків є “реанімація” та вдосконалення таких антимікробних заходів як використання бактеріофагів [1]. Терапевтичний ефект від лікування фагами в середньому складає 50 %. Але культури стафілокок бувають резистентні до бактеріофагів [2]. Фагорезистентність

може бути пов’язана з тим, що культури швидко адаптуються до бактеріофагів.

Відомо, що наночастки і ліпосомальні форми лікарських засобів дозволяють значно підвищити ефективність препаратів, знизити їх терапевтичні дози. Наприклад, було запропоновано біотехнологічний підхід до конструювання ліпосом з бактеріофагами, навантаженими лікарськими препаратами для лікування і профілактики гнійно-запальних захворювань пародонта [3].

Дослідження ліпідного складу ліпосом і вмісту білка фага, ефективність адресності модифікованих ліпосом, спрямованих до пухлини раку молочної залози та раку простати, проводилося у роботах [4, 5].

Оскільки ліпосоми допомагають довше зберігати високий рівень концентрації лікарських препаратів у крові й клітинах, а також проникати в ті ділянки, куди без ліпосом вони потрапити не можуть, зазначена властивість може бути використана в лікуванні такої інфекції, як *S. aureus*, відомий своїм тяжким лікуванням та ускладненням.

У зв’язку з вищевикладеним, метою дослідження було одержання ліпосом та вивчення ефективності дії комплексу бактеріофагів та ліпосом стосовно *S. aureus* in vitro.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ У роботі було використано: 10 % спиртовий розчин яєчного лецитину (ПАТ “Біолік”, Україна), суміш ліпідів з негативним зарядом [6]. Штам *S. aureus* ATCC 25923 було отримано з ДУ “Інститут мікробіології й імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України”. У роботі також використовували бактеріофаги: піофаг та секстафаг (“Микроген” Росія), агар Мюллера-Хінтона (МХ) (HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Індія)), м’ясо-пептонний бульйон (МПБ).

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 при охолодженні (2–4 °С) на диспергаторі УЗДН-А (Росія).

Визначення розміру ліпосом: розмір ліпосом визначали методом турбодиметрії за виміром оптичної щільності досліджуваної ліпідної суспензії в діапазоні хвиль 450–700 нм [7]. Розмір ліпосом складав 160–180 нм.

Визначення мінімальної інгібуючої концентрації комерційних бактеріофагів та їх комплексів з ліпосомами стосовно планктонної форми клітин *S. aureus*. За мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) бактеріофага вважали мінімальну концентрацію комерційних та ліпосомальних препаратів, що пригнічувала ріст досліджуваного мікроорганізму на щільному середовищі (агар МХ). Обліковували результати за ростом

або відсутністю *S. aureus*. При виявленні росту мікроорганізмів при наявності препарату у всіх розведеннях формулювали висновок, що досліджуваний штам є резистентним до взятих концентрацій бактеріофага.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Серед бактеріофагів ми зупинилися на піофагу та секстафагу. При одержанні комплексів бактеріофагів та ліпосом було використано яєчний лецитин, тому що ліпосоми з лецитину формуються просто. Крім того, підвищує пластичність мембран клітин, слугує джерелом фосфору та жирних кислот. Лецитинові ліпосоми мають нейтральний заряд, тому для порівняння також було використано ліпосоми з негативним зарядом. Співвідношення бактеріофагів та ліпосом було 1 : 5 – 1 : 10, концентрація ліпідів у ліпосомах складала 2 %.

У результаті визначення МІК комплексу секстафага та ліпосом було знайдено, що ці комплекси більш ефективні, ніж розчин секстафага при дії на планктонні клітини *S. aureus* (рис. 1).

Лізуюча активність комплексу лецитинових ліпосом та секстафага, яка діяла на планктонну форму культури *S. aureus*, знаходилася в межах 10^3 – 10^8 ПУО. Лізуюча активність комплексу негативно заряджених



Рис. 1. Визначення лізуючої активності комплексів секстафага та ліпосом у відношенні планктонних клітин культури *Staphylococcus aureus*.

Примітки: 1) комплекс секстафага та лецитинових ліпосом;
2) комплекс секстафага та негативно заряджених ліпосом;
3) розчин секстафага.

Одержані дані вказують на те, що комплекси бактеріофагів та ліпосом є ефективними стосовно *S. aureus*.

ВИСНОВОК Було встановлено, що мінімальна інгібуєча концентрація комплексу ліпосом та бактеріофагів, при якій знищувались планктонні клітини *Staphylococcus aureus*, була у 10 разів менше такого комерційного секстафага при використанні нейтральних лецитинових ліпосом. Використання негативно заряджених ліпосом знижало мінімальну інгібуєчу концентрацію бактеріофагів у 100 разів.

Отримані дані свідчать про можливість використання комплексів ліпосом та бактеріофагів у лікуванні стафілококових інфекцій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sulakvelidze A.Z. Bakteriohage therapy (minireview)/ A. Z. Sulakvelidze Alavidze, J. G. Horris // Antimicrob Agents Chemother. – 2001. – № 45(3). – P. 649–659.

ліпосом та секстафага, яка діяла на планктонну форму культури *S. aureus*, знаходилася в межах 10^2 – 10^8 ПУО. Лізуюча активність комерційного секстафага дорівнювала 10^4 – 10^8 ПУО.

МІК комплексу лецитинових ліпосом та секстафага, при якій знищувались планктонні клітини *S. aureus*, була у 10 разів менше МІК комерційного секстафага. Використання негативно заряджених ліпосом знижувало МІК секстафагу у 100 разів.

Далі було визначено лізуючу активність комплексу піофага та ліпосом (рис. 2).

Лізуюча активність комплексу лецитинових ліпосом та секстафага, що діяла на планктонну форму культури *S. aureus*, знаходилася в межах 10 – 10^8 ПУО. Лізуюча активність комплексу негативно заряджених ліпосом та піофага, яка діяла на планктонну форму культури, знаходилася в межах 10^{-1} – 10^8 ПУО. Лізуюча активність піофага дорівнювала 10^2 – 10^8 ПУО.

Ефективність дії комплексів ліпосом та піофага була вище дії комерційного піофага. МІК комплексу лецитинових ліпосом та піофага, при якій знищувались планктонні клітини *S. aureus*, була у 10 разів менше МІК комерційного піофага. Використання негативно заряджених ліпосом знизило МІК у 100 разів.

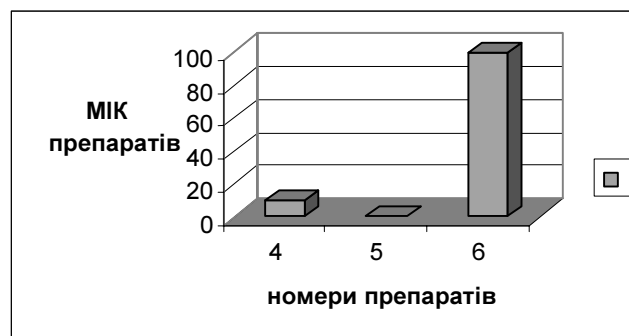


Рис. 2. Визначення лізуючої активності комплексу піофага та ліпосом у відношенні планктонних клітин культури *Staphylococcus aureus*.

Примітки: 1) комплекс піофага та лецитинових ліпосом;
2) комплекс піофага та негативно заряджених ліпосом;
3) розчин піофага.

2. Kutter E. Phage therapy: bakteriohages as antibiotic / www.t4.phage2.elwha.evegrem.edu. 1–22

3. Чубатова С. А. Бактеріофаги та ліпосоми в пародонтології / Чубатова С. А., Желудева І. В., Михайлова Е. Г. // Москва : изд-во Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского, 2001. – 73 с.

4. Kalarical Janardhanan Architectonics of phage-liposome nanowebes as optimized photosensitizer vehicles for photodynamic cancer therapy/ . Kalarical Janardhanan Sreeram, Shoba Narayan, Abbineni Gopal [et al.] // Mol Cancer Ther. – 2010. – № 9(9). – P. 2524–2535.

5. Jayanna P. K. Liposomes targeted by fusion phage proteins/ Jayanna P. K. // Nanomedicine. – 2009. – № 5(1). – P. 83.

6. Ivanova N.N. 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.

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

Отримано 16.10.13