

© Коллектив авторов, 2007
УДК 615.281:616-08-031.81:(.001.6):616.972

КОНСТРУИРОВАНИЕ НАНОСТРУКТУР (ЛИПОСОМ), СОДЕРЖАЩИХ АНТИБИОТИКИ, И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СИФИЛИСА

А.В. Одинец¹, В.И. Ефременко^{1, 2}, В.В. Чеботарев¹, И.А. Базиков¹

¹Ставропольская государственная медицинская академия

²Ставропольский научно-исследовательский
противочумный институт

Проблема заболеваний, передающихся половым путём, в том числе сифилиса, является актуальной во всём мире и, особенно, в России [1,5]. При этом отмечается увеличение доли латентного сифилиса, ре- и суперинфекции, серорезистентности, поздних форм инфекции. Во многом это связано с приспособляемостью бледных трепонем к антибиотикотерапии и, как следствие, с их изменчивостью. Накопившийся за последние годы опыт лечения больных сифилисом свидетельствует о его недостаточно высокой эффективности. В таких условиях большое значение приобретает разработка способов, направленных на создание новых лекарственных препаратов, способных преодолевать анатомические и клеточные барьеры организма. С этой задачей могут справиться липосомальные формы лекарственных веществ.

В настоящее время экспериментально доказана высокая эффективность липосомальных препаратов при лечении различных инфекционных заболеваний. Являющиеся продуктом нанотехнологии, липосомы представляют собой сферические образования, снаружи и внутри которых располагается водная фаза, их мембрана толщиной около 4 нм сформирована в основном бислойно расположенными фосфолипидами. Липосомы являются химически инертными, биосовместимыми, биodeградируемыми структурами, способными направленно, зачастую внутриклеточно, доставлять заключенные в них лекарственные препараты, преодолевая анатомические и клеточные барьеры организма. Для них характерно отсутствие токсичных и антигенных свойств, они способны предохранять заключенные в них лекарственные препараты от действия неблагоприятных факторов [2].

Материал и методы. 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 [3].

Липосомы получали из фосфолипидов головного мозга свиньи. Выделение комплекса фосфолипидов включало гомогенизацию, обезвоживание исходного сырья ацетоном, экстракцию осадка смесью хлороформа с этанолом, отделение липидной фазы от осадка и осаждение из нее фосфолипидов добавлением ацетона в соотношении с экстрактом 1,5 – 2,0:1

Состав полученного комплекса фосфолипидов определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинке с силуфолом, что обеспечивало хорошее разделение основных компонентов. Результаты тонкослойной хроматографии экстрактов липидов головного мозга свиньи показали наличие фосфатидилхолина (8,2%), фосфатидилэтаноламина (16,5%), фосфатидилсерина (6,2%), фосфатидилинозида (6,3%), сфингомиелина (8,5%), цереброзида (16,5%) и холестерина (16,5%). Данные фосфолипиды и липиды оказались способными формировать бислойную структуру мембран липосом, наличие холестерина обеспечивало прочность и стабильность этой мембраны.

Для приготовления липосом использовали методы ручного встряхивания, этанольной инъекции, озвучивания мультимембранных 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.

Все серии липосомальных препаратов проходили

Физические параметры липосом, полученных различными методами

Метод получения липосом	Удельный внутренний объем, л/моль липида	Характер ультраструктуры везикул	Размер липосом, нм
Озвучивание мультимеллярных везикул	1	малые мономеллярные везикулы	5-20
Озвучивание мультимеллярных везикул	1,7	большие мономеллярные везикулы	100-850
Ручное встряхивание	5	мультимеллярные везикулы	200-1900
Выпаривание и обращение фаз	9	большие мономеллярные везикулы (80 %)	160 - 900
		мультимеллярные везикулы (20 %)	100-800
Замораживание-оттаивание	10	большие мономеллярные везикулы	150-1500

электронно-микроскопический 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 было выбрано сочетанное использование методов выпаривания в обращенной фазе и замораживания-оттаивания.

Для лечения экспериментального сифилиса использовали натриевую соль бензилпенициллина и зарубежный дюранный антибиотик бензатин-бензилпенициллин (экстенциллин).

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.

Для стабилизации в процессе хранения липосомальные антибиотики подвергали лиофилизации. В качестве криопротектора применяли раствор с окончательной концентрацией сахарозы 10% и желатина – 2%, который добавляли к взвеси липосомального антибиотика в 30% объеме.

Сифилитическую инфекцию моделировали у кроликов породы «шинилла» весом 3-3,5 кг, путём введения взвеси патогенных бледных трепонем в мошонку и во внутреннюю сторону бедра подкожно в дозе 5000 м.к. Всего в экспериментах использовали 80 животных.

Лечение первичного сифилиса начинали через 30 дней от момента заражения, вторичного – спустя 3 месяца от заражения. Наличие антител к бледным трепонемам исследовали в течение всего процесса развития сифилитической инфекции у животных. Для этого в серологической лаборатории Ставропольского краевого клинического кожно-венерологического диспансера ставили микрореакцию преципитации (МР) и реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) общепринятыми способами. Изучали патоморфологические изменения в органах и тканях экспериментальных животных при введении антибиотиков в свободной и липосомальной формах в сравнительном аспекте. Гистоморфологическому исследованию подвергались печень, селезенка,

почки.

Статистическую обработку полученных результатов серологического анализа осуществляли по И.А. Ойвину [4] с определением достоверности различий по критерию t Стьюдента при уровне статистической значимости различий 95 % ($p < 0,05$).

Результаты исследования. 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 начала лечения постепенно нивелировались 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 экспериментального 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.

Динамика серологических показателей при лечении первичного сифилиса экспериментальных животных свободной и липосомальной формой экстенциллина выглядела следующим образом. При использовании в лечении кроликов свободной экстенциллина на 60 сут. животных с полной негативацией реакции микропреципитации было 60% от общего количества, взятых в опыт. На 60 сут. введения липосомального экстенциллина количество животных с полной негативацией

реакции микропреципитации составило 90%. Следует отметить, что курсовая доза антибиотика, включенного в липосомы, была в два раза ниже, чем при использовании свободного экстенциллина. Результаты были статистически достоверными ($p < 0,05$).

При лечении кроликов с экспериментальным вторичным сифилисом свободным экстенциллином через 180 дней 40% животных были серонегативными, а через 360 сут. с полной негативацией серологических реакций оказалось 70% взятых в опыт кроликов. Титры МР у оставшихся серопозитивными животных снизились достоверно только через 360 сут. сероконтроля.

Лечение животных липосомальной формой экстенциллина, взятого в половинной курсовой дозе относительно используемой дозы интактного антибиотика, уже на 180 сут. способствовало полной негативации реакции микропреципитации у 60% кроликов соответствующей экспериментальной группы и достоверному снижению титра МР у остальных кроликов ($p > 0,05$). Через 360 сут. серонегативными были 90% экспериментальных животных.

При лечении кроликов свободной натриевой солью бензилпенициллина животных с полной негативацией МР оказалось 70% от общего числа взятых в опыт на 60 день после начала лечения.

Количество серонегативных кроликов, получавших липосомальный бензилпенициллин, уже на 30 сут. лечения составило 80%, а через 60 дней после лечения у 100% животных отмечена полная негативация реакции микропреципитации. При этом курсовая доза антибиотика была в два раза ниже, чем при использовании свободного бензилпенициллина.

Лечение вторичного экспериментального сифилиса липосомальной формой бензилпенициллина привело к полной негативации МР через 360 дней после начала лечения у всех испытуемых животных, в то время как при использовании интактного антибиотика в дозе, вдвое превышающей дозу липосомального препарата, серонегативными через 360 сут. были 80% кроликов.

Таким образом, в эксперименте доказана высокая биологическая эффективность липосомальных форм экстенциллина и натриевой соли бензилпенициллина по сравнению с их свободными формами. В результате проведенных исследований разработаны рациональные схемы этиотропного лечения сифилитической инфекции, позволяющие снизить курсовые дозы препаратов и повысить эффективность терапии.

Течение сифилитической инфекции на фоне введения терапевтической дозы свободных форм антибиотиков подопытным животным сопровождалось резким венозным полнокровием сосудов и альтерацией преимущественно в печени, наблюдавшиеся в других исследуемых органах реактивные процессы можно расценивать как признаки адаптационно-приспособительных механизмов, граничащих с декомпенсацией. При использовании липосомального пенициллина патоморфологические изменения были аналогичными, но носили менее выраженный характер. При этом у животных, получавших лечение бензатин-бензилпенициллином, изменения были более деструктивные, чем у животных, получавших бензилпенициллина натриевую соль.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что предложенный способ инкапсулирования антибиотиков, используемых для лечения сифилитической

инфекции, позволяет обеспечивать высокий уровень включения лекарственных препаратов в липосомы с сохранением их биологической активности. При лечении экспериментального первичного сифилиса спустя 30 дней от момента заражения животных клинические проявления заболевания 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 экспериментального вторичного сифилиса 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 суткам негативацию клинических проявлений, 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 суткам.

Наиболее эффективными для лечения первичного и вторичного экспериментального сифилиса оказались липосомальные антибиотики, обеспечивающие не только скорейшую регрессию всех клинических проявлений, но и полную негативацию специфических серологических реакций на сифилис, регистрируемых в реакциях микропреципитации и непрямой реакции гемагглютинации. Интактные антибиотики достигали такого эффекта лишь в 60-70% случаев.

Липосомальные антибиотики, особенно липосомальная форма натриевой соли бензилпенициллина, вводимые животным по схемам, применяемым для лечения экспериментального сифилиса, в меньшей степени вызывали патоморфологические изменения в печени, селезенке и почках, чем интактные лекарственные препараты.

Литература

1. Аковбян, В.А. Бензатин-бензилпенициллин (экстенциллин) в лечении больных сифилисом: опыт 5-летних наблюдений / В.А. Аковбян, А.А. Кубанова, Л.М. Топоровский // Вестн. дерматологии. – 1998. – №4. – С. 61-64.
2. Ефременко, В.И. Липосомы (получение, свойства, аспекты применения в биологии и медицине) / В.И. Ефременко. – Ставрополь, 1999. – 236 с.
3. Кузякова, Л.М. Методические подходы и разработка технологии липосомальных лекарственных и лечебно-профилактических препаратов: автореф. дис. ... д-ра фарм. наук / Л.М. Кузякова - Пятигорск, 2000. – 40 с.
4. Ойвин, И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований / И.А. Ойвин // Патол. физиология и экспериментальная терапия. – 1960. – № 4. – С. 76-85.
5. Чеботарёв, В.В. Современные аспекты сифилитической инфекции / В.В. Чеботарёв, Н.В. Беляева, М.А. Земцов // Тез. докл. науч.-практ. конф. – М., 1999. – С. 64-65.

**КОНСТРУИРОВАНИЕ НАНОСТРУКТУР
(ЛИПОСОМ), СОДЕРЖАЩИХ АНТИБИОТИКИ,
И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СИФИЛИСА****А.В. ОДИНЕЦ, В.И. ЕФРЕМЕНКО,
В.В. ЧЕБОТАРЕВ, И.А. БАЗИКОВ**

Разработана биотехнология получения стабильно лиофильно высушенных наноструктур (липосом), содержащих во внутренней полости натриевую соль бензилпенициллина или бензатин-бензилпенициллин с включением антибиотика от 72 до 86% соответственно, оказавшихся высокоэффективными лекарственными средствами при лечении экспериментального первичного и вторичного сифилиса. Лечение проводилось интактными и липосомальными антибиотиками. Использование липосомальных антибиотиков позволило ускорить регресс клинических проявлений сифилиса в два раза, по сравнению с интактными формами тех же препаратов. При этом липосомальные антибиотики вводились экспериментальным животным по тем же схемам, но в половинных дозах. Серологические реакции подтвердили полную негативацию реакции микропреципитации на сифилис у животных при их лечении липосомальными формами антибиотиков. Свободные антибиотики достигли такого эффекта лишь в 60-70% случаев.

Липосомальные антибиотики, особенно липосомальная форма натриевой соли бензилпенициллина, по сравнению с интактными лекарственными препаратами, в меньшей степени вызывали патоморфологические изменения в печени, селезенке и почках.

Наиболее эффективным при лечении экспериментального первичного и вторичного сифилиса был липосомальный бензилпенициллин.

Ключевые слова: экспериментальный сифилис, липосомы, натриевая соль бензилпенициллина, бензатин-бензилпенициллин

**DESIGNING NANOSTRUCTURE (LIPOSOMES)
CONTAINING ANTIBIOTICS, AND TREATMENT
OF THE EXPERIMENTAL SYPHILIS****ODINETS A.V., EFREMENKO V.I.,
TCHEBOTARYOV V.V., BAZIKOV I.A.**

The biotechnology of stably coolly dehumidificated nanostructures (liposomes) containing benzylpenicillin natrium salt (72 %) or benzathyn-benzylpenicillin (86 %) in the internal cavity. Use of half-dose liposomal antibiotics has allowed to accelerate recourse of clinical signs of the experimental primary and secondary syphilis twice in comparison with the intact forms of the same preparations. Treatment by liposomal antibiotics resulted in absolutely negative reaction microprecipitation and lesser degree of pathmorphological changes in liver, spleen and kidneys. Liposomal benzylpenicillin showed the best effect in the experimental primary and secondary syphilis.

Key words: an experimental syphilis, liposomes, benzylpenicillin natrium salt, benzathyn-benzylpenicillin