

ХАРКІВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ім. І.І.МЕЧНИКОВА

На правах рукопису

КОВАЛЕНКО Наталія Іллівна

ВИКОРИСТАННЯ ЗАСОБІВ СПРЯМОВАНОГО ТРАНСПОРТУВАННЯ
АНТИБІОТИКІВ (ЛІПОСОМ І ВНЕТРІШНЬОТКАНИННОГО
ДІАДИНАМОФЕРЕЗУ) ТА НІТАЗОЛУ ПРИ
ГНІЙНО-СЕПТИЧНІЙ ІНФЕКЦІЇ
(експериментальне дослідження)

03.00.07 - мікробіологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

ХАРКІВ-1996

AB 33.079

Дисертація є рукопис. •

Робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Харківського державного медичного університету

Науковий керівник - академік, заслужений працівник вищої школи України, професор
Анатолій Якович Циганенко

Офіційні опоненти:

1. Доктор медичних наук, професор Надтока Валентина Луківна.
2. Доктор біологічних наук, професор Співак Микола Якович.

Провідна установа - Українська фармацевтична академія МОЗ України.

Захист відбудеться "7" серпня 1996 року о 10 годині на засіданні спеціалізованої ради Д 02.41.01 при Харківському науково-дослідному інституті ім. І.І.Мечникова за адресою: 310057, м. Харків, МСП, вул. Пушкінська, 14.

Автореферат розіслано "6" травня 1996 року.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Харківського науково-дослідного інституту ім. І.І. Мечникова (м. Харків, вул. Пушкінська, 14).

Вчений секретар спеціалізованої ради

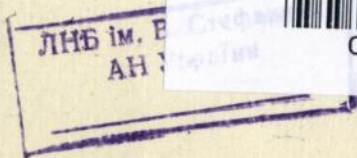
• доктор медичних наук

Т.І.Коляда

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00753586 (Y)



ВСТУП

Актуальність проблеми. Гнійно-септичні інфекції в хірургії є актуальною проблемою сучасної охорони здоров'я (Брусіна Є.Б. та ін., 1987; Толстих П.І. та ін., 1989).

В останні роки збільшилась кількість септичних станів - найтяжчого ускладнення гнійно-запального процесу (Светухін А.М. та ін., 1992). Одним із найчастіших чинників сепсису є поширений гнійний перитоніт (Белокуров Ю.Н. та ін., 1983), летальність при якому залишається високою (35-62,3%) (Бондарев В.І. та ін., 1990; Єрєхін І.А., 1986; Подільчак М.Д. та ін., 1992).

В теперішній час роботами багатьох вчених переконливо доказано, що перитоніт є асоційованою анаеробно-аеробною інфекцією, провідну роль в етіології якої відіграють кишкова паличка та бактероїди (Веселов А.Я., 1987; Колесов А.П. та ін., 1990; Леванов А.В. та ін., 1993; Цацаніді К.Н., 1986).

Антибактеріальна терапія як основа лікувального комплексу перитонітів зустрічає на своєму шляху труднощі, пов'язані із полірезистентністю мікрофлори, яка значно зросла останнім часом, і грубими порушеннями при перитоніті гемодинаміки в мікроциркуляторній ланці кровообігу.

Корисними у зв'язку з цим є, на наш погляд, подальші дослідження вітчизняних хіміотерапевтичних засобів у плані виявлення в них антибактеріальних властивостей. Одним із таких препаратів є нітазол.

Ефективність антибактеріальної терапії багато в чому залежить від можливості створення терапевтичних концентрацій антибактеріальних засобів у вогнищі запалення і підтриманні їх на необхідному рівні до закріплення стійкого лікувального

ефекту, що забезпечується не тільки дозов препаратів, але й методом його введення. У цьому зв'язку є цікавими дослідження внутрішньотканинного діадинамофорезу антибіотиків при перитонітах, який задовольняє ці вимоги (Улащик В.С., 1986).

Іншим напрямком у виборі ефективних лікарських засобів для боротьби із збудниками гнійно-септичних інфекцій є використання ліпосом та ліпосомальних форм препаратів, які забезпечують зниження частоти алергічних і імунологічних реакцій, внутрішньоклітинну спрямованість везикул, малу токсичність і біодоступність, пролонгування дії і покращення фармакокінетики препаратів та стимулювання захисних сил макроорганізму (Владимирський М.А., 1985; Грегоріадіс Г., Алісон А., 1983; Кизман Г.Я. та ін., 1992; Торчилін В.П. та ін., 1987). Їх використання при перитоніті знаходить відображення тільки в окремих роботах останнього часу (Стефанов А.В. та ін., 1993; Синовець О.А., 1994).

Вище викладене свідчить про актуальність і важливість для науки і практичної охорони здоров'я використання відомих препаратів за новим призначенням, розробки нових лікарських форм хіміотерапевтичних препаратів та шляхів їх введення.

Мета дослідження. Дати експериментальне обґрунтування можливості і доцільності використання комбінацій нітазолу з гентаміцином і ліпосомальних форм рифампіцину та гентаміцину і внутрішньотканинного діадинамофорезу гентаміцину при гнійно-септичних захворюваннях.

Завдання дослідження.

I. Вивчити чутливість факультативних анаеробів - збудників перитонітів до нітазолу та антибіотиків в аеробних та анаеробних умовах культивування.

2. Визначити ефективність нітазолу при експериментальному перитоніті у тварин.

3. Виявити вплив нітазолу на імунний статус здорових тварин.

4. Визначити можливість введення нітазолу та антибіотиків в організм за допомогою діадинамічного струму в режимі, який забезпечує збереження їх антибактеріальної активності та фармакокінетики.

5. Вивчити ефективність амінофосфатидних ліпосом та ліпосомального гентаміцину при експериментальному перитоніті та механізм біологічної дії ліпосом на організм тварин.

6. Визначити антибактеріальні властивості ліпосомального рифампіцину в дослідях *in vitro*.

7. Вивчити ефективність ліпосомального рифампіцину при експериментальному сепсисі і рановій інфекції у тварин та визначити його дію на показники імунітету і окислювально-відновні процеси макроорганізму при інфекційних захворюваннях.

Наукова новизна. Виявлено високу антибактеріальну активність нітазолу по відношенню до факультативних анаеробів-збудників перитонітів та інших гнійно-септичних захворювань в анаеробних умовах культивування.

Вперше встановлено синергізм протимікробної дії нітазолу з антибіотиками із груп аміноглікозидів, пеніцилінів, хінолонів та макролідів. Експериментально обґрунтовано можливість і доцільність використання комбінації нітазолу з гентаміцином при перитоніті.

Вперше доведено, що внутрішньотканинний діадинамофорез гентаміцину сприяє накопиченню і подовжує час його знахо-

дження в органах черевної порожнини в терапевтичній концентрації.

Виявлено протективні властивості амінофосфатидних ліпосом при експериментальному перитоніті та ефективність ліпосомальних форм гентаміцину і рифампіцину при експериментальному перитоніті, сепсисі та рановій інфекції у тварин.

Практична цінність роботи. Експериментально обгрунтована ефективність комбінованого використання протианаеробного препарату нітазолу та гентаміцину в дослідях *in vitro* та *in vivo* дала можливість рекомендувати дану комбінацію для застосування при перитонітах з анаеробно-аеробнов етіологієв.

Доведення значної переваги внутрішньотканинного діадіамафорезу гентаміцину, і особливо ендоінтестинального його варіанту як найефективнішого, порівняно з внутрішньовенним введенням при експериментальному перитоніті дало можливість рекомендувати даний спосіб для включення в комплексне лікування апендикулярних перитонітів.

Результати дослідження знайшли практичне використання в роботі дитячого хірургічного відділення Харківської обласної дитячої клінічної лікарні №1.

Основні висновки дисертації включено до рекомендацій, які використовуються в учбовому процесі на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології ХДМУ.

Основні положення, які виносяться на захист.

1. В дослідях *in vitro* та на експериментальній моделі перитоніту у тварин доведено ефективність комбінованого використання нітазолу з антибіотиками.

2. З метов підвищення концентрації антибактеріальних засобів і пролонгування їх дії у вогнищі запалення при гній-

них перитонітах було експериментально обґрунтовано доцільність методу внутрішньотканинного діадинамофорезу, найефективнішим варіантом якого є ендоінтестинальний спосіб.

3. В дослідях *in vitro* та *in vivo* було доведено значні переваги ліпосомальних форм рифампіцину і гентаміцину перед вільними антибіотиками при гнійно-септичних захворюваннях.

Апробація роботи. Основні положення і результати дисертації було викладено на обласній конференції молодих вчених "Актуальные проблемы медицины и научно-технический прогресс" (Харків, 1988); 29-й Всесоюзній конференції студентських наукових гуртків при кафедрах дитячої хірургії "Актуальные вопросы хирургии, анестезиологии и реаниматологии детского возраста" (Ростов-на-Дону, 1988); Всесоюзному семінарі "Колонизационная резистентность и химиотерапевтические антибактериальные препараты" (Москва, 1988); 2-й обласній міжінститутській конференції молодих вчених "Микробиология, иммунология, биотехнология - практика здравоохранения" (Харків, 1989); УІ з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Чернівці, 1989); Всесоюзній конференції "Наука и производство в решении комплексной проблемы "Антибиотики" (Москва, 1989); УІ з'їзді фармакологів України (Харків, 1990); ХІ науковій конференції "Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях" (Челябінськ, 1992); науково-практичній конференції "Оптимальные средства и методы иммунокорригирующей, противовоспалительной и противомикробной терапии" (Харків, 1993); науковій конференції "Актуальные проблемы современной медицины" (Вітебськ, 1994).

Обсяг і структура дисертації. Робота складається зі

вступу, 3 глав огляду літератури, розділу "Матеріали та методи дослідження", 3 глав власних досліджень, завершення, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, який містить 237 джерел, в тому числі 182 вітчизняних і 55 зарубіжних авторів. Дисертацію викладено на 136 сторінках машинописного тексту, ілюстровано 23 таблицями і 23 малюнками.

За темою дисертації опубліковано 12 друкованих робіт.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Антибактеріальну активність нітазолу, метронідазолу та антибіотиків вивчали в дослідях *in vitro* на стандартних штаммах *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27653, *Klebsiella pneumoniae* H10, *Proteus vulgaris* XZ4636, отриманих із ДІСК ім. Л.А.Тарасевича, та клінічних штаммах, виділених від хворих з гнійно-септичною інфекцією.

Для проведення експериментів *in vivo* використано 1070 мишей та 63 кролі.

Анаеробні умови культивування здійснювали за М.Ф.Калініченком із співавт. (1985).

Мінімальну подавляючу концентрацію (МПК) препаратів визначали методом двократних серійних розведень відповідно до рекомендацій (Навашин С.М., Фоміна І.П., 1982).

Фракційний коефіцієнт інгібіції (ФКІ) при сумісному застосуванні нітазолу з антибіотиком визначали способом "шахматної дошки" (Traczewsky M.M. et al., 1983).

Спектри поглинання нітазолу, метронідазолу та антибіотиків було записано на спектрофотометрі "Specord M-40" фірми "Карл Цейс", Йена (Німеччина).

Вплив нітазолу і метронідазолу на ріст і розмноження мікроорганізмів визначали за методикою M.K.R.Chowdhury та ін. (1961), яка основана на вимірюванні спектрів мутності середовища, де розмножуються мікроорганізми.

Вивчення ефективності нітазолу та ліпосомальних форм антибіотиків в дослідях *in vivo* проводили на експериментальній моделі перитоніту у мишей лінії СВА вагою 18-20 г, який викликали шляхом внутрішньочеревного введення 10% завису стерильних фекалій мишей з добовою культурою *E.coli* ATCC 25922 (5×10^8 мікробних тіл на мишу) або *S.aureus* 209 (1×10^9 мікробних тіл на мишу) (Smith I.M., 1965; Smith I.M., Hazard E.C., 1970). Модель експериментального перитоніту підтверджувалася мікробіологічними та гістологічними дослідженнями (Войно-Ясенецький М.В., Жаботинський Д.М., 1970; Меркулов Г.А., 1969).

Для вивчення синергізму протимікробної дії нітазолу з гентаміцином інфікованим мишам протягом 5 діб вводили внутрішньочеревно нітазол в дозі 8 мг/кг, гентаміцин - в дозі 0,15 мг/кг. Амінофосфатидні ліпосоми тварини отримували в терапевтичній дозі (37,5 мг/кг) і в п'ятикратній терапевтичній дозі (187,5 мг/кг) одно-, дво-, і трьохразово; вільний та ліпосомальний гентаміцин - в дозі 0,05 та 0,25 мг/кг протягом 10 діб. Контролем були інфіковані миші, яким вводили 0,9% розчин хлориду натрію.

Вплив нітазолу на імунний статус здорових мишей вивчали за їх реакцією на введення Т-залежного тест-антигену -

еритроцитів барана (ЕБ) (Фримель Г., 1987; Dijk H.V., Bloksma N., 1977). Миші отримували нітазол в дозі 10 мг/кг в різні строки до і після імунізації ЕБ. Визначали в селезінці кількість імунних розеткоутворюючих клітин (РУК) і гемолізінпродукуючу здатність ядромісних клітин (ЯК).

Для визначення стійкості і рухливості нітазолу та антибіотиків в електричному полі постійного струму користувалися трьохсекційною електролітичною камерою (Улащик В.С., 1976). Після дії електричного струму визначали їх спектральні характеристики та антибактеріальну активність.

Ефективність внутрішньотканинного діадинамофорезу гентаміцину вивчали на кролях породи "Шиншила" вагом 2,5 кг в двох серіях дослідів: на здорових кролях і з експериментальним перитонітом, який викликали за 24 год шляхом лапаротомії і перев'язування червоподібного відростка та його брижі. Проведено порівняльне дослідження концентрації антибіотика в тканині стінки тонкої кишки і крові брижі тонкої кишки протягом 16 год з двохгодинним проміжком часу при внутрішньовенному його введенні (1-а група), традиційній методиці внутрішньотканинного діадинамофорезу (2-а група) та ендоевентринальному його варіанті (3-я група).

Визначення концентрації гентаміцину в біологічних субстратах виконували методом дифузії в агар (Холодов Л.С. та ін., 1985).

Внутрішньотканинний діадинамофорез гентаміцину проводили двохлапівперіодним неперервним діадинамічним струмом за допомогою апарату "Тонус-1" (0,5 мА) протягом 30 хв. Гентаміцин вводили внутрішньовенно в дозі 27 мг/кг.

Для проведення методики ендоевентринального діадинамо-

форезу розроблено пристрій, який складається з двох електродів - гнучкого зонду-електроду, який вводиться в кишку, і поясного електроду, який циркулярно накладається на тулуб тварини в області живота.

Ліпосоми та ліпосомальні форми рифампіцину (Рф) та гентаміцину готували стандартним методом обернених фаз (Циганенко А.Я. та ін., 1983; Szoka P., Papahadjopoulos D., 1978). Вони містили хроматографічно чистий лецитин (Харківський завод бактерійних препаратів), холестерин ("Serva", ФРГ), дицетилфосфат ("Serva", ФРГ) в молекулярному співвідношенні 7:2:1 з кінцевою концентрацією 20 мМ ліпідів у 1 мл фосфатного буфера (рН 7,2). Від антибіотиків, які не включилися до складу ліпосом, позбавлялися шляхом центрифугування при 150 тис. g протягом 60 хв на ультрацентрифузі VAC-601 (Німеччина). Включення рифампіцину складало 60%, гентаміцину - до 45,5%.

Амінофосфатидні ліпосоми готували шляхом струшування в 0,9% розчині хлориду натрію плівки ліпідів, виділених із спинного мозку великої рогатої худоби, які містили фосфатидилетаноламін (40-50%), сфінгомелін, фосфатидилхолін та інші компоненти (Іванова Н.М. та ін., 1984).

Для вивчення впливу ліпосомального рифампіцину (ЛРф) на імунний статус здорових мишей Рф, вільний або в ліпосомах, вводили внутрішньочеревно в добовій дозі 10 мг/кг протягом 7 діб (гострий дослід) та 30 діб (хронічний дослід). Про стан імунітету тварин судили за їх реакцією на введення Т-залежного тест-антигену - ЕБ на основі визначення титрів гемоглютининів класів Ig M і Ig G, титрів сумарних імуноглобулінів (Ig), кількості ЯК селезінки, кількості літчих концентра-

цій за методами (Фримель Г., 1987; Dijk H.V., Bloksta N., 1977), в також тимусного (I_T) і селезінкового (I_C) індексів.

Модель стафілококового сепсису відтворювали за методом G.Badenski et al. (1968) шляхом інтраорбітального зараження мишей бульйонною культурою *S.aureus* 209. Миші отримували вільний Рф та ЛРф в дозах 2,5 та 10 мг/кг протягом 15 діб.

Вплив ЛРф на активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) в печінці та селезінці здорових мишей та тварин із стафілококовим сепсисом визначали за методом В.М.Павлик і С.Н.Геник (1972). Миші отримували препарати в дозі 10 мг/кг Рф протягом 5, 10 та 15 діб.

Модель ранової інфекції відтворювали на кролях шляхом внутрішньом'язового введення гіпертонічного розчину $CaCl_2$ і подальшого нанесення на вогнище некрозу 2 мл завису культури стафілокока в дозі 1×10^9 клітин/мл. Тварини отримували аплікації вільного Рф та ЛРф в дозі 10 мг/кг протягом 10 діб. Вміст мікроорганізмів в рановому матеріалі визначали методом агарових шарів.

Для виявлення впливу амінофосфатидних ліпосом на ступінь перекисного окислення визначали малоновий діальдегід (МДА) за Т.Н.Федоровою і співавт. (1983) та дієнові кон'югати (ДК) за В.В.Гаврилюком і співавт. (1983) в сировотці крові здорових мишей.

Для вивчення впливу ліпосом на активність клітин перитонеального ексудату мишей їх виділяли за М.П. Грачовою (1984) і проводили оцінку їх функціональної активності за допомогою НСТ-тесту (Кубась В.Г. та ін., 1987).

При роботі з лабораторними тваринами користувалися: "Європейською конвенцією по захисту хребетних тварин, які

використовуються в експериментальних та інших наукових цілях" (Страсбург, 18.03.86), Наквзсом Мінздраву УРСР № 32 від 22 лютого 1988 р.

Отримані результати піддавали статистичній обробці за допомогою комп'ютера типу IBM PC/AT (Поллард Д., 1982).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті вивчення етіологічної структури перитонітів було доведено, що перитоніт має полімікробний характер і провідну роль у його патогенезі серед факультативно-анаеробних мікроорганізмів відіграє кишкова паличка (55%). Серед інших бактерій найчастіше виділяються золотавий стафілокок (16,2%) та паличка синьо-зеленого гною (15%). У той же час у 25% хворих виділити збудника в аеробних умовах культивування не вдалося, що може свідчити про можливу анаеробну етіологію (Стручков В.І. та ін., 1991).

Сумарна чутливість перитонеальної мікрофлори за три роки знизилася до пеніцилінів на 27%, карбеніциліну - 20,8%, гентаміцину - 25,7%, кефзолу - 17,2%, клафорану - 7,7%.

Реалізуючи поставлені задачі в пошуках препаратів, які проявляють антибактеріальну активність по відношенню до облигатно-анаеробних мікроорганізмів, ми зупинили свій вибір на протитрихомонадному препараті нітазолі, протианаеробні властивості якого були встановлені М.О.Ляпуновим із співавт. (1989).

Результати дослідження показали, що протіанаеробний препарат нітазол проявляє бактеріостатичну дію на факультативні анаероби - кишкову паличку і золотавий стафілокок, які найчастіше висіваються при гнійних перитонітах (див. табл.).

По відношенню до факультативних анаеробів антибактеріальна активність нітазолу проявляється більшою мірою в анаеробних умовах, ніж в аеробних, і підвищується в результаті його комбінацій з антибіотиками із груп аміноглікозидів, пеніцилінів, хінолонів та макролідів, найефективнішою із яких є поєднання нітазолу і гентаміцину, що підвищує їх активність в 4 рази. Метронідазол на факультативні анаероби протимікробної дії не справляє.

Антибактеріальні властивості нітазолу

Вид мікроорганізму	Кіль- кість штамів	Аеробіоз	Анаеробіоз
		МПК ніта- золу, мкг/мл	МПК ніта- золу, мкг/мл
<i>E.coli</i>	30	86,6±24,9	1,4±0,5
<i>S.aureus</i>	33	82,2±10,4	1,1±0,2
<i>Klebsiella sp.</i>	8	113,3±21,7	1,2±0,4
<i>P.aeruginosa</i>	6	рiст	-
<i>Proteus sp.</i>	3	рiст	-
<i>B.subtilis</i>	1	10	-

При експериментальному перитоніті нітазол в дозі 10 мг/кг забезпечує виживання 50% мишей з ешерихіозним

перитонітом (при 100% летальності у контролі) і 66,7% мишей із стафілококовим перитонітом (при 15,4% - у контролі).

Комбіноване використання нітазолу з гентаміцином при ешерихіозному перитоніті у мишей підтвердило синергізм їх дії, який було доведено в дослідях *in vitro*. Навіть зменшення дози нітазолу в 4 рази по відношенню до мінімальної бактерицидної концентрації, а гентаміцину - у 16 разів по відношенню до терапевтичної дози захищає 50% тварин (при 100% летальності у контролі і при використанні препаратів *per se*) і вдвічі подовжує середню тривалість їх життя.

Оскільки в патогенезі перитоніту імунна система відіграє основну роль, було вивчено вплив нітазолу на імунний статус тварин. Введення нітазолу в дозі 10 мг/кг протягом 1-5 діб здоровим мишам стимулює первинну імунну відповідь, збільшуючи як відносну, так і абсолютну кількість імунних розеткоутворюючих клітин. При п'ятиразовому введенні нітазолу впливає на активність імунокомпетентних клітин селезінки, викликаючи зменшення кількості ядровмісних клітин.

Одним із чинників підвищення ефективності антибактеріальної терапії гнійних процесів є концентрація протимікробних засобів у вогнищі запалення, досягненню високих показників якої у черевній порожнині при перитоніті заважають грубі порушення в мікроциркуляторній ланці кровообігу. У зв'язку з цим, з метою підвищення концентрації антибіотиків у органах і тканинах черевної порожнини було вивчено можливість їх введення за допомогою внутрішньотканинного діадинамофорезу.

Було доведено, що рифампіцин, гентаміцин та нітазол в електричному полі постійного струму зберігають структуру молекули та антибактеріальну активність.

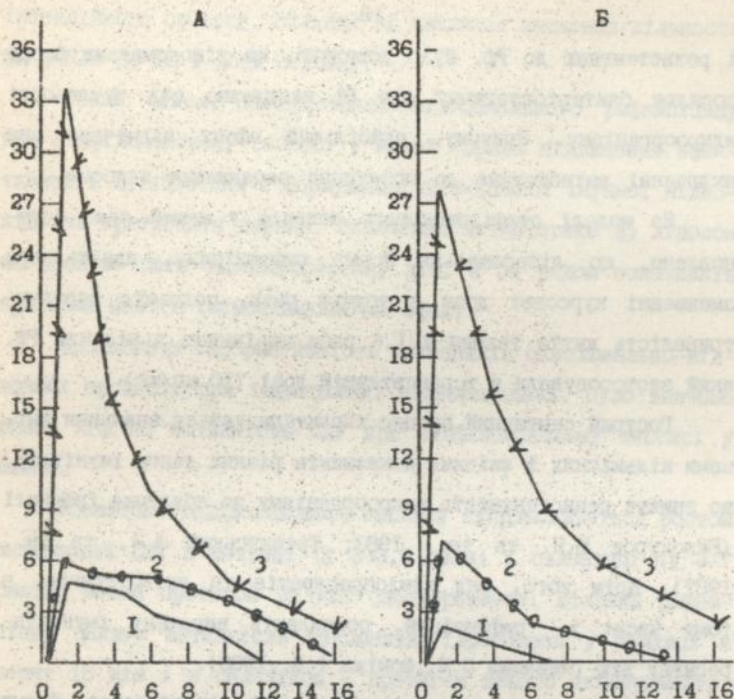
Встановлено, що в середньому концентрація гентаміцину в стінці тонкої кишки здорових кролів при ендоінтестинальному варіанті діадинамофорезу перевищувала його вміст у контрольній групі (при внутрішньовенному введенні) у 9,2 рази (в той час, як при використанні традиційної методики ця різниця складала лише 3,9 рази) і у 2,8 рази - у тварин 2-ї групи (при традиційному внутрішньотканинному діадинамофорезі). Аналогічні за динамікою результати отримано при порівняльному аналізі концентрацій гентаміцину в крові брижі ($p < 0,001$).

При використанні традиційного внутрішньотканинного діадинамофорезу при експериментальному перитоніті порівняно із внутрішньовенним введенням концентрацію гентаміцину в стінці кишки можна підвищити в середньому в 5,1 рази, а за допомогою розробленого нами способу - у 30,5 рази ($p < 0,001$).

Поряд з цим, ендоінтестинальний спосіб сприяє збереженню терапевтичної концентрації гентаміцину в крові брижі та стінці тонкої кишки до 16 год, тоді як при традиційній методиці він визначається протягом 10-14 год, а при внутрішньовенному введенні - 6-12 год (див. мал.).

Підсумки виконаного дослідження підтверджують правильність вибору ендоінтестинального варіанту внутрішньотканинного діадинамофорезу антибіотиків при перитоніті як найефективнішого.

З метою підвищення ефективності антибіотикотерапії гнійно-септичної інфекції та зниження імуносупресивної дії антибіотиків було отримано ліпосомальні форми гентаміцину та рифампіцину і вивчено їх ефективність при експериментальному перитоніті та сепсисі і вплив на імунну систему тварин.



Мал. Динаміка зміни концентрації гентаміцину в стінці тонкої кишки здорових кролів (А) і з експериментальним перитонітом (Б): І - внутрішньовентральне введення гентаміцину (контроль), 2 - традиційний діадинамофорез, 3 - ендоевентральний діадинамофорез; по осі абсцис - час спостереження, год; по осі ординат - концентрація гентаміцину, мкг/г.

Було визначено вплив ліпосомальної форми на бактеріостатичну дію рифампіцину - антибіотика, який рекомендують застосовувати для лікування гнійно-септичних захворювань, викликаних антибіотикорезистентними штамми стафілокока (Навашин С.М., Фоміна І.П., 1983; Поляк М.С., 1993; Черномордик А.Б., 1990).

На штаммах стафілокока 209 та Cowan I, як чутливих, так

і резистентних до Рф, було доведено, що ліпосомальна форма посилює бактеріостатичну дію Рф незалежно від чутливості мікроорганізму. Причому, найбільший ефект відмічено при включенні антибіотика до позитивно заряджених ліпосом.

На моделі стафілококового сепсису у мишей було встановлено, що ліпосомальна форма рифампіцину, навіть при зменшенні курсової дози в чотири рази, подовжує середню тривалість життя тварин у 1,6 рази порівняно з вільним Рф, який застосовували в терашвітчиній дозі (10 мг/кг).

Гострий септичний процес характеризується значними змінами кількісних і якісних показників різних ланок імунітету, що знижує резистентність макроорганізму до збудника інфекції (Белокуров Ю.Н. та ін., 1983; Трещинський А.І. та ін., 1987). Крім того, ряд хіміопрепаратів та антибіотиків, в тому числі і рифампіцин, проявляють виражену імуносупресивну дію (Навашин С.М., Фоміна І.П., 1983).

У зв'язку з цим було вивчено вплив ліпосомальної форми Рф на деякі показники імунного статусу тварин при експериментальному сепсисі. Було встановлено, що ЛРф чинить імуномодулюючу дію. В той час як вільний Рф при тривалому його використанні призводить до зникнення Ig G в сироватці крові здорових мишей і затримує їх накопичення аж до 15 доби при експериментальному сепсисі, його ліпосомальна форма не викликає повної блокади антитілогенезу в нормі і сприяє підвищенню титрів Ig G вже на 10 добу захворювання.

ЛРф підвищує імунологічну реактивність мишей із стафілококовим сепсисом за рахунок доокретного зростання кількості і проліферативної активності ЯК селезінки та 2-5-кратного підвищення їх функціональних властивостей з перших діб

інфекційного процесу. Вільний Рф викликає зниження кількості ЯК і КЛК до 10-ї доби сепсису.

Таким чином, використання ліпосомального рифампіцину при стафілококовому сепсисі у мишей сприяє підвищенню ефективності антибіотика і формуванню повноцінної імунної відповіді на еритроцити барана. Включення антибіотика до ліпосом не посилює його імуносупресивну дію, а за рядом показників проявляє навіть імуностимулюючий ефект.

Враховуючи інформативність показників окислювально-відновних процесів при інфекційних захворюваннях, було вивчено вплив ЛРф на активність СДГ при стафілококовому сепсисі у мишей.

Розвиток стафілококового сепсису супроводжується ростом активності СДГ в печінці (у 3-3,5 рази) і селезінці (у 3-7 разів) мишей протягом 15 днів спостереження. Вільний рифампіцин знижує активність сукцинатдегідрогенази у печінці в перші 10 днів і в селезінці - протягом всього експерименту. ЛРф стимулює активність СДГ як у печінці, так і в селезінці тільки на 5-у добу розвитку інфекційного процесу. У наступні строки рівень ферментативної активності в цій групі тварин виявлявся нижчим, ніж у групі мишей з нелікованим стафілококовим сепсисом, а також у групі, яка отримувала Рф.

Ліпосоми без антибіотика вірогідно підвищували вміст СДГ у досліджених органах заражених мишей у всі строки спостереження.

Виявлений ефект ліпосом і ЛРф зумовлений, можливо, переважним накопиченням їх у купферовських клітинах печінки і макрофагах селезінки, що викликає в тканинах РЕС реалізацію механізмів протилежної спрямованості: стимулюючу

дію на активність СДГ ліпіда та інгібувачу - антибіотика.

Виходячи з того, що найчастішим джерелом сепсису є травматичні пошкодження (рани, опіки та ін.) (Стручков В.І. та ін., 1991), було вивчено ефективність ЛРФ при експериментальній рановій інфекції у кролів, викликаній стафілококом. Досліди показали, що його використання дозволило скоротити термін лікування ранової інфекції на 4-6 діб або на 31-40% порівняно з вільним антибіотиком.

Тяжкість перебігу і висока летальність при сепсисі після внутрішньочеревних захворювань визначили дослідження амінофосфатидних ліпосом та ліпосомального гентаміцину при ешерихіозному перитоніті у мишей, оскільки перитоніти, при яких провідна роль належить кишковій паличці, зустрічаються найчастіше (Стручков В.І. та ін., 1991).

Показано, що включення гентаміцину до ліпосом сприяє підвищенню ефективності даного антибіотика, яка проявляється у вірогідному збільшенні в 2,3 рази середньої тривалості життя і підвищенні до 70% виживання тварин (при 100% летальності у нелікованих мишей) навіть при десятикратному зменшенні терапевтичної дози.

Використання інтактних амінофосфатидних ліпосом при ешерихіозному перитоніті у мишей виявило їх протективні властивості, які спостерігалися при двох- і трьохкратному введенні ліпосом до зараження і забезпечували 70-93% виживання тварин при 100% летальності у контролі.

Отримані результати нашої роботи на думку дослідити окремі ланки механізму біологічної дії ліпосом на організм тварин.

Фагоцитоз є головним механізмом природної резистентнос-

ті, а також обов'язковою ланкою індукції і формування специфічної імунної відповіді. Нами було встановлено, що трьохкратне введення ліпосом у терапевтичній дозі (37,5 мг/кг) здоровим мишам викликає посилення бактерицидної активності макрофагів перитонеального ексудату в 2,8 рази ($p < 0,001$).

Встановлено, що використання ліпосом вірогідно стимулює накопичення МДА в сироватці крові здорових мишей. Вміст ДК залишається без змін, крім групи з однократним введенням ліпосом за 6 год до визначення, де він вірогідно знижується.

Таким чином, отримані результати дозволяють вказати деякі припущення. Амінофосфатидні ліпосоми чинять не стільки терапевтичний, скільки протективний ефект при експериментальній інфекції. Можливим механізмом дії ліпосом є їх вибіркоче накопичення у клітинах PEC, де вони викликають виражену активацію окислювально-відновних процесів, яка проявляється у підвищенні рівня СДГ у печінці та селезінці, накопиченні малонового діальдегіду в сироватці крові. Очевидно, аналогічні процеси у фагоцитуючих клітинах призводять до стимуляції функціональної активності і бактерицидних властивостей макрофагів, внаслідок цього у тварин, стимульованих ліпосомами, формується стан резистентності до інфекції.

ВИСНОВКИ

1. Протинаеробний препарат нітазол справляє бактериостатичну дію на факультативні анаеробні мікроорганізми - кишкову паличку та золотавий стафілокок, які входять до складу мікрофлори гнійних перитонітів.

2. Антибактеріальні властивості нітазолу по відношенню до факультативних анаеробних мікроорганізмів проявляються більшою мірою в анаеробних умовах, ніж в аеробних, що має суттєве значення при лікуванні гнійних процесів у закритій черевній порожнині, і підсилюються в разі його сумісного використання з антибіотиками.

3. В електричному полі діадинамічних струмів не міняється спектр і антибактеріальна активність нітазолу, гентаміцину та рифампіцину. При цьому рифампіцин і нітазол ведуть себе як амфотерні сполуки, переміщуючись і до катоду і до аноду, а гентаміцин є катіоном, рухаючись від аноду до катоду.

4. За допомогою внутрішньотканинного діадинамофорезу гентаміцину з використанням наскірних електродів можна підвищити його концентрацію в органах черевної порожнини при перитонітах в середньому в 5,1 рази і подовжити депонування на 4 години порівняно із внутрішньовенним введенням.

5. За допомогою ендоінтестинального діадинамофорезу гентаміцину, при якому один з електродів розміщується в просвіті кишечника, а інший накладається циркулярно навколо живота, можна підвищити концентрацію антибіотика в органах черевної порожнини в 30,5 рази і подовжити депонування на 7

годин порівняно з внутрішньовенним введенням.

6. Інтактні ліпосоми проявляють при гнійно-септичній інфекції у мивей виражений протективний ефект, який обумовлюється зокрема активацією окислювально-відновних процесів у печінці і селезінці і стимуляцією бактерицидної активності макрофагів перитонеального ексудату. Включення рифампіцину і гентаміцину до ліпосом підвищує ефективність антибіотиків і послаблює імносупресивну дію рифампіцину.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Препарат нітазол, який наділений виразною антибактеріальною активністю по відношенню до низки облігатних і факультативних анаеробних мікроорганізмів і проявляє синергізм дії при комбінованому використанні з рядом антибіотиків, рекомендується для застосування при гнійно-септичній інфекції змішаної аеробно-анаеробної етіології.

2. Для підвищення ефективності антибактеріальної терапії перитоніту рекомендується застосовувати внутрішньотканинний діадинамофорез антибіотиків, що дозволить створити постійні терапевтичні концентрації антибактеріальних засобів в осередку запалення і пролонгувати їх дію.

СПИСОК РОБІТ, НАДРУКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Экспериментально-клиническое изучение нитазола как антибактериального препарата в комплексном лечении перитонитов // Антибиотики и химиотерапия. - 1990. - Т. 35, № 8. - С. 39-41 (в соавт. с Цыганенко А.Я., Топузовым В.С., Калиниченко Н.Ф.).
2. Антибактериальная активность нитазола и применение его в комплексном лечении аппендикулярного перитонита у детей // Клин. хирургия. - 1990. - № 6. - С. 35-36 (в соавт. с Топузовым В.С., Цыганенко А.Я., Калиниченко Н.Ф. и др.).
3. Влияние нитазола на факультативные анаэробы, вызывающие перитонит у детей // Микробиология, эпидемиология и клиника инфекционных болезней: Сб. науч. тр. / Харьк. мед. ин-т. - Харьков, 1988. - С. 52-54 (в соавт. с Цыганенко А.Я., Топузовым В.С., Васильченко В.Н.).
4. Эффективность интактных липосом при экспериментальном эшерихиозном перитоните у мышей // Микробиология, эпидемиология и клиника инфекционных болезней: Сб. науч. тр. / Харьк. мед. ин-т. - Харьков, 1991. - С. 46-48 (в соавт. с Цыганенко А.Я., Степаненко С.И., Ивановой Н.Н., Васильченко В.Н.).
5. Комбинированное действие нитазола в сочетании с антибиотиками на клинические штаммы факультативных анаэробов, выделенных от хирургических больных // Там же. - С. 8-9 (в соавт. с Цыганенко А.Я., Габышевой Л.С., Васильченко В.Н.).
6. Влияние нитазола на некоторые показатели иммунитета здоровых мышей // Вестник проблем современной медицины. - Харків, 1994. - Вып. 7. - С. 36-39.
7. Эффективность липосомального рифампицина при экспериментальной стафилококковой инфекции // Препринт Физико-технического ин-та низких температур АН СССР. - Харьков, 1988.-

№ 51. - 40 с. (в соавт. с Цыганенко А.Я., Благим Ю.П., Васильченко В.Н. и др.).

8. Влияние нитазола на нормальную микрофлору человека // Колонизационная резистентность и химиотерапевтические антибактериальные препараты: Всесоюзный семинар, 28-29 июня 1988г. - Москва, 1988. - Ч. I. - С. 89-90 (в соавт. с Цыганенко А.Я., Калининченко Н.Ф., Васильченко В.Н. и др.).

9. Изучение действия нитазола и диоксилина в комбинации с антибиотиками на условно-патогенные микроорганизмы // Микробиология, иммунология, биотехнология - практике здравоохранения: Тез. докл. II обл. межинститутской конф. молодых ученых, 24-25 мая 1989 г. - Харьков, 1989. - С. 17-18.

10. Получение липосомальных форм гентамицина и тобрамицина // Наука и производство в решении комплексной проблемы "Антибиотики": Тез. докл. Всесоюзной конф., г. Москва, 28-30 ноября 1989 г. - Москва, 1989. - С. 124 (в соавт. с Цыганенко А.Я., Минухиним В.В., Ивановой Н.Н., Васильченко В.Н.).

11. Влияние интактных аминокислотидных липосом на окислительно-восстановительные процессы в иммунокомпетентных органах и тканях белых мышей при экспериментальной инфекции // Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях: Тез. докл. XI науч. конф. - Челябинск, 1992. - С. 110 (в соавт. с Цыганенко А.Я., Степаненко С.И., Васильченко В.Н.).

12. Влияние свободного и липосомального рифампицина на иммунный статус и выживаемость мышей с экспериментальной инфекцией // Актуальные проблемы современной медицины: Тез. докл. науч. конф., 23-24 ноября 1994 г. - Битебск, 1994 (в соавт. с Цыганенко А.Я., Степаненко С.И., Васильченко В.Н.).

Коваленко Н.И. Применение средств направленной доставки антибиотиков (липосом и внутритканевого диадинамофореза) и нитазола при гнойно-септической инфекции (экспериментальное исследование). Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.07. - микробиология. Харьковский НИИ микробиологии и иммунологии им. И.И.Мечникова. Харьков, 1996.

Установлен синергизм антимикробного действия нитазола с аминогликозидами, пенициллинами, хинолонами и макролидами. Экспериментально обоснована эффективность использования комбинации нитазола с гентамицином при перитоните.

Показано, что эндоинтестинальный диадинамофорез гентамицина способствует накоплению и удлиняет время его нахождения в органах брюшной полости в терапевтической концентрации.

Установлены протективные свойства аминофосфатидных липосом при экспериментальном перитоните и эффективность липосомальных форм гентамицина и рифампицина при экспериментальном перитоните, сепсисе и раневой инфекции у животных.

Kovalenko N.I. Application of means intending to enhance penetration of antibiotics (liposomes and interstitial diadinamophoresis) and nitazole in purulent infections (experimental researches). Disertation for Ph.D. course in biology in Speciality No. 03.00.07 - Microbiology. Kharkov Scientific Research Institute of Microbiology and Immunology named after I.I.Mechnikov. Kharkov, 1996.

The antimicrobial synergism of nitazole and aminoglycosides, penicillins, fluoroquinolones and macrolides has been established.

Experiments show that it is possible and advisable to combine nitazole and gentamycin in peritonitis. It is shown that endointestinal administration of gentamycin with the use of diadinamic current enhances and retain the therapeutic concentration in the abdominal organs.

The protective property of aminophosphatide liposomes in experimental peritonitis and the effect liposomal formes of gentamicin and rifampicin in experimental peritonites, sepsis and wound infections in animals are established.

Ключові слова: нитазол, рифампіцин, гентаміцин, ліпосоми, діадинамофорез, перитоніт, сепсис.

Підписано до друку 25.04.96, формат 60x84 I/16,
папір для розмножувальних апаратів, друк офсетний,
роталпринт, ВЛ ХОУС, зам. 495, тир.100 примірників,
м. Харків-310002, вул. Маршала Бажанова, № 28

436817

AB 35.019