

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ РОСРСР САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО
НАДЗОРА

МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ
И МИКРОБИОЛОГИИ им. Г. Н. ГАБРИЧЕВСКОГО

На правах рукописи

МЕЛЬНИЦЕВА ДАРИСА ПЕТРОВНА

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИКОСОМ И ВОЗМОЖНОСТЬ
ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ**

03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 1992

Работа выполнена в Экспериментальной лаборатории медико-биологических проблем при Кемеровском государственном медицинском институте.

Научные руководители:

Заслуженный деятель науки РСФСР,
доктор медицинских наук, профессор В. М. Мельникова

Заслуженный деятель науки РСФСР,
доктор медицинских наук, профессор Т. И. Цраер

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Г. Е. Афиногенов
кандидат биологических наук Е. А. Шмелева

Ведущая организация: Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков

Защита состоится "26" марта 1992 г. в 10 часов на заседании специализированного совета К. 094.18.01 при Московском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского по адресу: ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского.

Автореферат разослан "25" февраля 1992 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
кандидат медицинских наук

З. Н. Ермаченко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Современная медицина использует широкий спектр химиотерапевтических средств для лечения инфекционных заболеваний. Наиболее распространенной группой антибактериальных препаратов являются антибиотики, широкое использование которых привело к росту антибиотикорезистентности микроорганизмов, которая для некоторых ранее высокоэффективных препаратов составляет 80-90% (С. Н. Соинсон, К. М. Мирзаев, 1987). В основном применяемые в практике антибактериальные средства используются для подавления размножения возбудителей в организме болезнетворных бактерий. В то же время недостаточное внимание уделяется препаратам, действие которых направлено на профилактику инфекционного процесса в самом начале его развития (З. Г. Петровская, 1980).

В связи с этим по-прежнему остается актуальной проблема поиска разработки новых антибактериальных препаратов, обладающих высокой эффективностью, низкой токсичностью и иммуногенностью (Д. Ланчини, Ф. Аренти, 1985). По нашему мнению, таким средством могут оказаться липосомы, для которых показана возможность направленного транспорта в ткани гнойной и огнестрельной ран (Т. И. Шраер с соавт., 1938). Это может играть существенную роль для воздействия как на поврежденные ткани, так и микрофлору ран.

Наиболее распространенным направлением использования липосом в биологии и медицине является создание липосомальных форм лекарственных препаратов (А. В. Стефанов, 1980; М. А. Владимирский с соавт.,

1977). Так, введение в состав липосом антибиотиков (Г. А. Коисов, И. Г. Гоммаров, 1980; К. А. Рогов с соавт., 1989; И. В. Бельяева с соавт., 1991; Л. Н. Березовская, 1991) позволяет получить бактерицидный эффект при использовании субингибиторных концентраций препарата (В. Губенко с соавт., 1991; M. C. Nasissou et al., 1988). Авторы объясняют усиление активности антибиотиков увеличением проницаемости внешней мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий вследствие воздействия на них липосом. Однако, усиление эффекта могло быть связано и с непосредственным антибактериальным действием липосом, хотя авторы этого не исследовали.

В литературе широко описаны возможные механизмы взаимодействия липосом с клетками (сорбция на поверхности клеточной мембраны, слияние с клеточной мембраной, эндоцитоз, обмен липидными молекулами др.) (Л. В. Марголис, Л. Д. Бергельсон, 1986). Описанные механизмы клеточно-липосомальных взаимоотношений изучены на примере их взаимодействия с эукариотическими клетками. Основываясь на свойствах липосом модифицировать клеточные мембраны, можно предположить, что они могут взаимодействовать также с поверхностными структурами бактериальных клеток.

Для эффективного воздействия липосом на жизнедеятельность бактериальной клетки необходимо выбрать их параметры для достижения максимальной активности липосомального препарата. Так, данные литературы свидетельствуют о зависимости физико-химических свойств липосомальной суспензии от величины pH (А. Л. Клибанов с соавт., 1989; S. Tomlinson et al., 1989) и выраженности процесса неферментативного окисления липидных компонентов липосом (К. А. Владимиров, 1989; O. Cantoni et al., 1989; Th. A. Dahl et al., 1989; M. A. Nesmeyanova, M. Bogdanov, 1989). Поэтому для решения вопроса о возможности использования липосом в качестве антибактериального средства актуальной

дачей является изучение данных показателей в липосомальной суспензии и стандартизация получаемых липосом по величине pH и уровню липидной перекисидации.

Цель и задачи исследования. Определить в опытах *in vitro* возможность влияния липосом на жизнеспособность микроорганизмов, наиболее часто встречающихся при раневой инфекции, и изучить некоторые механизмы их антибактериальной активности. Оценить динамику качественных и количественных изменений раневой микрофлоры *in vivo*, происходящих под действием липосом, и определить возможность их использования для профилактики раневой инфекции.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние липосом из фосфатидилхолина (ФХ) и холестерина (Х) в молярном соотношении 7:5 на жизнедеятельность представителей условно патогенных и патогенных микроорганизмов *in vitro* при различных сроках инкубации в физиологическом растворе и растворе плазмы.

2. Исследовать следующие возможные механизмы антибактериального действия липосом:

а) изучить влияние структуры препарата на их антибактериальную активность при совместной инкубации с бактериальными клетками;

б) изучить влияние pH липосомальной суспензии на антибактериальную активность липосом при их совместной инкубации с бактериальными клетками;

в) изучить влияние уровня перекисного окисления липидов на антибактериальную активность липосом при их совместной инкубации с бактериальными клетками;

г) изучить изменение степени адгезии бактерий к эукариотическим клеткам под действием липосом.

3. Оценить эффективность однократного подкожного введения

суспензии липосом экспериментальным животным на микробиологическую характеристику и клиническое течение огнестрельных ран.

Научная новизна. В доступной нам научной и патентной литературе имеются лишь единичные сообщения, касающиеся вопроса взаимодействия липосом с бактериальными клетками (L. J. Barsukov et al. 1986; S. Tomlinson et al., 1989). Также мы не встретили сообщений о влиянии липосом на жизнедеятельность микроорганизмов и возможность их применения при лечении раневой инфекции. Впервые выявленный нами антибактериальный эффект липосом как в экспериментах *in vitro*, так и животных с раневой инфекцией, а также исследование механизмов, благодаря которым может осуществляться их бактерицидное действие, является новым в микробиологии, фармакологии и практической медицине. В связи с этим, многие поднимаемые в работе вопросы изучены нами впервые.

Основные положения, вынесенные на защиту

1. Суспензия фосфатидилхолин-холестериновых липосом обладает прямым бактерицидным действием по отношению к условно патогенным патогенным микроорганизмам.

2. Бактерицидная активность препарата определяется не только химическим составом, но и наличием везикулярной структуры используемых липидов.

3. Одними из основных параметров липосом, определяющими их бактерицидную активность, являются pH липосомальной суспензии и ее содержание в ней продуктов перекисного окисления липидов.

4. Помимо прямого бактерицидного действия препарата, его антибактериальная активность *in vivo* может быть реализована путем подавления первой фазы инфекционного процесса за счет антиадгезивной активности липосом, проявляющейся в субингибиторных концентрациях.

5. При однократном подкожном введении животным с огнестрельных

аной суспензия липосом сохраняет свое антибактериальное действие, что проявляется в снижении уровня обсемененности раны и степени инвазии бактерий вглубь тканей раневого канала.

Практическое значение работы. Обоснована возможность применения липосом для подавления размножения условно патогенной микрофлоры и целесообразность их использования для профилактики раневой инфекции. Определены некоторые параметры, влияющие на антибактериальную активность липосомальной суспензии. Проведенные экспериментальные исследования легли в основу при разработке принципиально нового фармакологического препарата для лечения микробно загрязненных ран, получившего название "Липоран". Токсикологические испытания "Липорана" показали его безвредность для организма. Полученные в работе данные об антибактериальной активности "Липорана" в комплексе с другими исследованиями препарата представлены в Фармакологический комитет Министерства здравоохранения СССР (протокол № 1 от 1.02.90). Получено разрешение на проведение I фазы клинических испытаний. В настоящее время проводится разработка лабораторной и промышленной технологии получения "Липорана", в которой учтены выбранные в работе физико-химические параметры липосом, обеспечивающие наиболее выраженный антибактериальный эффект.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 150 страницах машинописи, иллюстрирована 17 рисунками, 3 фотографиями и 30 таблицами. Библиографический указатель содержит 97 отечественных и 62 зарубежных источника.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены:

- на Всесоюзной школе-семинаре "Химиотерапия раневой инфекции

в травматологии и ортопедии" (г. Москва, 28 - 30 сентября 1990 г.)

- на международном симпозиуме "Липосомы в биологии и медицине" (г. Ташкент, 12-16 ноября 1990 г.)

- на Всесоюзной научной конференции "Огнестрельная рана и раневая инфекция" (г. Ленинград, 19-21 февраля 1991 г.)

- на заседании Кемеровского областного общества хирургов (г. Кемерово, 19 марта 1991 г.)

- на XXII пленуме правления Всесоюзного научного общества травматологов - ортопедов (г. Иркутск, 27-29 июня 1991 г.)

- на совместной конференции кафедр микробиологии, хирургии и патологической физиологии Кемеровского Государственного медицинского института (г. Кемерово, 21 ноября 1991 г.).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальный материал. В качестве объекта исследования бактерицидных свойств липосом в работе использованы музейные штаммы *S. aureus* 209-P, *Ps. aeruginosa* 2134, *E. coli* M17, *Pr. mirabilis* 8. Клинический штамм *S. enteritidis* 1735.

Для изучения антиадгезивных свойств липосом использовали клинические высоковирулентные штаммы *S. aureus* 2/8, *Ps. aeruginosa* 51 эукариотические клетки линий HEp-2, HeLa и иммортализованные астроциты спинного ганглия крысы.

Для моделирования патологического процесса использовали половозрелых кроликов обоего пола породы "Шиншилла" весом 2.5-3.5 кг.

Методы исследования. Липосомы из фосфатидилхолина и холестерина в молярном соотношении 7:5 готовили по методу Bangham et al (1965) с последующей ультразвуковой обработкой суспензии при 22 кГц и 4 С. Содержание протонов водорода в липосомальной суспензии определяли методом рН-метрии. Содержание продуктов ПОЛ в липосомальной

липосомально-бактериальных суспензиях определяли в тесте с триарбитуровой кислотой по содержанию в суспензии малонового альдегида (МДА) (Л. И. Андреева с соавт., 1983). Для получения липосом разной степени окисленности использовали ФХ, предварительно подвергнутый окислению в системе Fe-аскорбат. При получении суспензии липидов в эллипсоидальной форме к высушенной смеси липидов добавляли равное весовое количество холестерина натрия и после тщательного перемешивания эмульгировали в 0.15 М растворе NaCl. Для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) липосом применяли метод серийных разведений липосомальной суспензии в жидкой питательной среде (Г. Н. Эршин, 1971). В качестве инкубационных сред использовали 0.15 М раствор хлорида натрия и 20% раствор плазмы абортового донора в физиологическом растворе. Определение динамики гибели бактериальных клеток при совместной инкубации их с липосомальными суспензиями определяли методом предельных разведений (Н. С. Егоров, 1983). Степень адгезии бактериальных клеток к эукариотическим оценивали путем подсчета бактериальных клеток, сорбированных на поверхности эукариотических клеток, методом прямой световой микроскопии. Изучение особенностей течения инфекционного процесса под действием липосом проводили на кроликах с моделью сквозной огнестрельной раны мягких тканей бедра. Суспензии липосом вводили под кожу голени в течение 1 часа после нанесения травмы в дозе 25 мг/мл/кг. Микробиологические исследования тканей раневого канала проводили через 1, 3, 6 и 9 суток после травмы. Забор тканей осуществляли на расстоянии 0.5; 1.0; 1.5 и 2 см от края раневого канала к периферии. Уровень микробного обсеменения тканей оценивали по количеству бактерий на 1 г/ткани. Идентификацию бактерий, выделенных из тканей раневого канала, осуществляли по общепринятым методам (М. О. Биргер, 1973; Методические указания, 1985). Для обработки цифровых результатов исследования

применяли методы описательной статистики. Достоверность различий между двумя или несколькими выборками оценивали по критерию Стьюдента. Достоверными считали различия при $P < 0.05$. Математические операции, их графическое отображение и редакцию текстового материала проводили на персональном компьютере IBM PS по стандартным прикладным программам (LEXICON 6.66, STADIA, SUPERCALCK-4, GRAPHEDOKTOR HALLO).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние липосом на рост бактериальных культур. Если при вводе на контрольных суспензиях рост исследуемых культур наблюдался на протяжении всего периода наблюдения (3 суток), то совместная инкубация бактериальных клеток с липосомальной суспензией показала, что через 24 часа инкубации МИК липосомальной суспензии в физиологическом растворе составила: для *Ps. aeruginosa* и *E. coli* - 6 мг/мл, для *S. aureus* и *Pr. mirabilis* - 3.1 мг/мл и для *S. enteritidis* - 1.5 мг/мл. К концу периода наблюдения (48 - 72 часа) для всех исследуемых штаммов бактерий подавляющей рост микроорганизмов оказалась минимальная использованная концентрация липосом (1.5-3 мг/мл).

При использовании в качестве среды инкубации 20% раствора плазмы антибактериальный эффект липосом оказался менее выраженным. Так, через 24 часа взаимодействия бактерицидной для этих культур оказалась только концентрация препарата 25.0 мг/мл. При продлении сроков инкубации до 48 часов уменьшение подавляющей концентрации 12.5 мг/мл было зарегистрировано только для культуры *S. aureus*, для остальных культур этот показатель остался прежним. В конце периода наблюдения эти концентрации также не изменились.

Проведенные исследования показали, что использованные и

липосомы обладают прямым антибактериальным действием по отношению к основным видам условно патогенных и патогенных микроорганизмов, которое можно расценивать как бактерицидное (Г. Н. Першин, 1971). В доступной литературе мы не встретили сообщений о возможности подавления роста бактерий под действием фосфолипидных везикул. Снижение бактерицидного эффекта липосом после добавления в среду инкубации плазмы крови может быть следствием сорбционной активности липосом по отношению к белковым компонентам плазмы и продуктам их деградации (G. Weismann et al., 1977; D. Hoekstra, G. Scherphof, 1979), что может вызвать увеличение проницаемости липосом и их разрушение (I. M. Allen, 1981). Кроме того, добавление в среду инкубации питательных веществ, содержащихся в плазме, также может способствовать размножению бактерий.

Некоторые механизмы бактерицидной активности липосом. Одной из причин, подавляющих рост бактериальных клеток, может явиться упорядоченная структура бислойных везикул, позволяющая им активно взаимодействовать с бактериальной клеткой.

Исследования показали, что в отличие от липосом, суспензия недипсомальной формы липидов в физиологическом растворе проявляла антибактериальное действие на клетки *S. aureus* в концентрации $> 6,2 \text{ мкг/мл}$ только через 48 часов инкубации. На клетки используемых грамотрицательных палочек липиды в недипсомальной форме на протяжении всего периода наблюдения антибактериального действия не оказывали. Таким образом, в механизмах зарегистрированного бактерицидного эффекта липосом существенное значение имеет наличие упорядоченной бислойной структуры везикул.

Влияние pH липосомальной суспензии на ее антибактериальную активность. Попытка стандартизовать полученный препарат по его антибактериальному действию показала, что достигаемый эффект липосо-

мальной суспензии находится в зависимости от ее кислотности. Изучение динамики роста культур *Ps. aeruginosa* и *S. aureus* в физиологическом растворе при значениях pH от 3 до 9 показало, что летальной для бактериальных клеток оказалась только pH 3 (Рис. 1А). При остальных исследуемых значениях pH уменьшения количества жизнеспособных клеток не наблюдалось, несмотря на отсутствие в инкубационной среде питательных веществ.

В то же время при воздействии на культуру *S. aureus* липосомальной суспензии с теми же значениями pH (Рис. 1Б) уже через 6 часов отмечена полная гибель бактерий при pH 3, 4 и 5, через 12 часов - при pH 6 и к окончанию срока инкубации (24 часа) - при остальных значениях pH. Воздействие препарата на культуру синегнойной палочки носило несколько иной характер: гибель бактерий вызывал препарат со значениями pH < 5. Слабокислые, нейтральные и щелочные суспензии существенного влияния на рост этой культуры не оказывали.

Различия в активности липосомальной суспензии по отношению к представителям грамположительной и грамотрицательной флоры, вероятно, связаны с различиями в строении их клеточной стенки. Как показано в работе S. Tomlinson et al., (1989), слияние липосом с внешней мембраной грамотрицательных бактерий происходит наиболее активно при нейтральных значениях pH. Вероятно, встраиваясь в мембрану и привнося в нее несвойственный бактериям холестерин, липосомы стабилизируют внешнюю мембрану и делают клетку более устойчивой к воздействию повреждающих факторов. Поэтому при значениях pH, близких к нейтральным, липосомы бактерицидного действия на культуру *Ps. aeruginosa* не оказывают, в отличие от культуры *S. aureus*, у которой внешняя мембрана отсутствует.

Таким образом, бактерицидная активность липосомальной суспензии имеет прямую зависимость от ее pH. Активность суспензии по от-

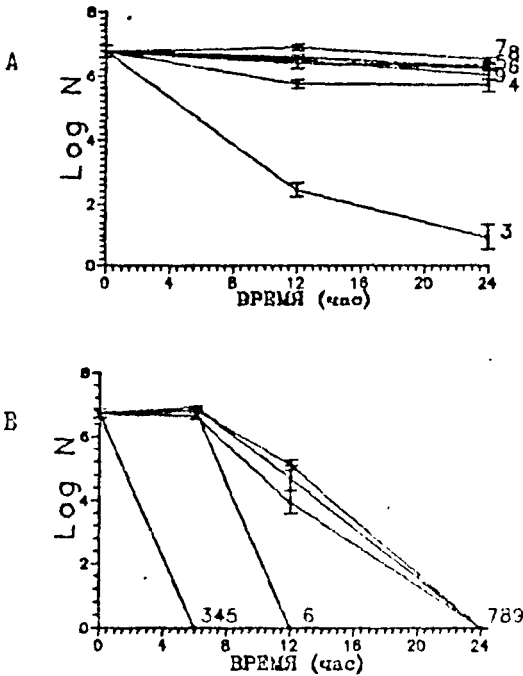


Рис. 1. Динамика роста культуры *S. aureus* в физиологическом растворе (А) и липосомальной суспензии (Б) с различными значениями pH. Цифрами обозначены значения pH.

ожению к исследуемым культурам наиболее выражена при значениях $\text{Ж}=5$. Возможно, именно этим можно объяснить отсутствие литературных данных об антибактериальной активности липосом. Подтверждением этому могут служить работы L. J. Varsukov et al. (1986), S. Tomlinson et al. (1989), в которых авторы использовали липосомы с нейтральными значениями pH. При этом воздействие липосом на бактериальную клетку было кратковременным.

Влияние уровня перекисного окисления липосомальных липидов на антибактериальную активность липосом. Одним из факторов, оказывающих цитотоксический эффект на клетки макроорганизма, является неферментативное окисление липидов клеточных мембран (О. Н. Воскресенская, А. П. Лавицкий, 1970; Ю. А. Владимиров, 1989). Мы предположили, что низкая жизнеспособность бактериальных клеток также может оказывать влияние на накопление в инкубационной среде продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Поэтому параллельно с определением количества жизнеспособных клеток мы определяли содержание продуктов ПОЛ в липосомальной и липосомально-бактериальных суспензиях с разным значением pH.

Исследования показали, что в первые 12 часов инкубации во все исследуемых суспензиях уровень вторичных продуктов ПОЛ достоверно не изменялся, а к концу периода наблюдения содержание продуктов ПОЛ увеличивалось обратнопропорционально значениям pH. При этом наиболее значительное повышение уровня МДА определялось в липосомальной суспензии с клетками золотистого стафилококка. В суспензиях, содержащих клетки синегнойной палочки, увеличение уровня перекисного окисления липидов также наблюдалось, но в значительно меньшей степени, чем в суспензиях, не содержащих бактериальных клеток. Следовательно, в процессе инкубации липосом с бактериальными клетками происходит гибель бактерий и накопление в суспензии продуктов ПОЛ. Однако осталось неясным, влияет ли увеличение продуктов ПОЛ в среде инкубации на антибактериальную активность липосом, или эти два процесса между собой не связаны. Поэтому была проведена дополнительная серия экспериментов для определения роли продуктов перекисного окисления липосомального ФХ в зарегистрированном антибактериальном эффекте липосом на мультислойных липосомах из ФХ, предварительно подвергнутого различной степени окисленности.

Исследования показали, что антибактериальное действие окисленных липосом проявляется уже через 1 час инкубации значительным снижением количества жизнеспособных клеток в суспензии. Через 3 часа отмечено полное отсутствие роста для обеих исследуемых культур. Уменьшение содержания продуктов ПОЛ в суспензии липосом значительно меняло динамику роста бактериальных культур. Так, в суспензиях окисленных и среднеокисленных липосом только через 6 часов инкубации достоверно снизилось количество жизнеспособных клеток. Продление инкубации до 24 часов достоверно не изменило количество клеток *Ps. aeruginosa*, в то же время для культуры *S. aureus* отмечено полное отсутствие роста.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в механизме бактерицидного действия липосом существенная роль принадлежит действию продуктов перекисного окисления липосомальных липидов, с повышением уровня которого бактерицидная активность липосомальной суспензии увеличивается.

Динамика гибели исследуемых бактериальных культур под действием липосом различной концентрации. После того, как были определены некоторые параметры для стан дартизации суспензии липосом, было проведено изучение динамики гибели культур *Ps. aeruginosa* и *S. aureus* под действием липосомальных суспензий различной концентрации (25.0; 12.5; 6.2; 3.1; 1.5; 0.8; 0.4; 0.2 и 0.0 мг /мл). На основании полученных данных были выбраны следующие параметры липосомальной суспензии: pH 4.8+-0.12, МДА 51.7 - 75.7 нмоль/мл.

Показано, что скорость гибели бактериальных клеток зависит от концентрации липосомальной суспензии. При этом культура *S. aureus* проявила большую чувствительность к действию липосомальной суспензии, так как для нее бактерицидной оказалась суспензия липосом в концентрации 0.8 мг/мл, тогда как для культуры *Ps. aeruginosa* - 1.6

мг/мл. В то же время, в целом картина гибели исследуемых культур, относящихся к двум различным группам бактерий, при выбранных параметрах липосом имеет сходный характер, что позволяет сделать предположение об эффективности использования липосомальной суспензии для воздействия на различные условно патогенные виды возбудителей раневой инфекции.

Наученно влияння липосом на адгезию бактерий к эукариотическим клеткам. Одним из основных факторов, определяющих течение микробно загрязненных ран, является выраженность первой фазы инфекционного процесса, т.е. адгезии и колонизации бактерий в тканях раны. Поэтому воздействие на этот начальный этап инфекционного процесса может явиться существенным фактором для профилактики развития раневой инфекции. Исследования показали, что независимо от вида используемых бактерий и клеточных линий эукариот наибольшее количество бактериальных клеток адсорбировалось из контрольных суспензий. Адгезия на липосомально-бактериальных суспензиях осуществлялась не столь интенсивно и при этом носила ярко выраженный дозозависимый характер (Табл. 1). В среднем для используемых видов бактериальных и эукариотических клеток степень адгезии бактерий по сравнению с контрольной группой составила: при концентрации липосом 25.0 мг/мл - 32%, при минимальной используемой концентрации 0.025 мг/мл - 63% ($P < 0.001$). Можно предположить, что сорбированные на клетках липосомы создают барьер между адгезинами бактериальной и рецепторами эукариотической клеток, что значительно уменьшает процесс адгезии. Этот эффект наряду с прямым бактерицидным действием липосом может оказывать существенное влияние на развитие раневой микрофлоры в условиях целостного организма.

Таким образом, проведенные исследования показали, что суспензия липосом в ингибиторных и субингибиторных концентрациях обладает

Табл. 1. Уровень адгезии клеток Staphylococcus aureus к эукариотическим клеткам линии НЕР-2

концентрация мг/мл	n	M (IA)	m	ПКХ	МН	% к конт-ролю	P1	P2
0.0 (К)	160	15.4	0.734	89	1370.6	-	-	-
0.025	129	6.73	0.427	70	471.1	43.7	<0.001	-
0.25	115	5.86	0.489	66	386.8	38.3	<0.001	>0.05
2.5	150	4.59	0.351	58	266.2	30.0	<0.001	<0.05
25	165	4.03	0.323	64	261.1	26.7	<0.001	>0.05

1 - достоверность различий по сравнению с контрольной серией

2 - достоверность различий по сравнению с предыдущей концентрацией

антиадгезивным действием. При этом эффективными оказались концентрации липосомальной суспензии в 125-250 раз ниже бактерицидных, что совпадает с литературными данными по изучению антиадгезивного действия субингибиторных концентраций других антибактериальных препаратов, в частности, антибиотиков (J.-F. Desnoffes, 1989; D. M. Schifferli, E. H. Beachey, 1988). Кроме того, показано, что зарегистрированный эффект не носит специфический характер ни по отношению к бактериальным культурам, ни по отношению к эукариотическим клеткам.

Изучение антибактериального действия липосомальной суспензии у животных с остстрельной раной мягких тканей.

Возможность практического использования липосом как антибактериального препарата предполагает подтверждение зарегистрированного *in vitro* бактерицидного и антиадгезивного эффектов суспензии липосом при введении ее в организм. Ранее в исследованиях, проведенных в нашей лаборато-

рии, был решен вопрос о способе введения препарата для его направленного транспорта к очагу травматического повреждения. Показано (Г. И. Браер с соавт., 1938), что такой транспорт оптимально осуществляется при подкожном введении липосом дистальнее раны. При этом период полувыведения препарата составляет 4-6 суток.

Эксперименты, проведенные *in vivo*, подтвердили данные стандартных опытов. Если у животных с огнестрельной травмой (контрольная группа) на протяжении всего периода наблюдения колебания численности микроорганизмов, контаминирующих рану, находились в пределах от $4.55 \pm 0.30 \log$ кл/г до $7.61 \pm 0.31 \log$ кл/г, то у животных после однократного введения липосом (опытная группа) колебания составляли $1.04 \pm 0.73 - 5.48 \pm 0.71 \log$ кл/г (Рис. 1). При этом на протяжении всего периода наблюдения во всех исследуемых образцах тканей значительная численность микроорганизмов в тканях у животных опытной группы была достоверно ниже, чем у животных контрольной группы. Причем отличие от опытных животных у последних этот показатель практически всегда превышал критический уровень, что явилось следствием прогрессирующего размещения бактериальных клеток в тканях с активными протекающими процессами тканевого распада (М. И. Кузин, Б. И. Костюков, 1931). В то же время у животных, которым были введены липосомы, микробная обсемененность достигала критического уровня однократно только в тканях, непосредственно прилегающих к раневому каналу.

В обеих группах животных максимальные значения численности бактерий на всей исследуемой глубине тканей наблюдались на 3 сут после ранения, т.е. в период максимальных клинических проявлений фазы раневого процесса. Но если у опытных животных в дальнейшем происходило подавление локального воспалительного процесса, сопровождающееся значительным уменьшением микробной обсемененности, то у животных контрольной группы максимальные клинические проявления

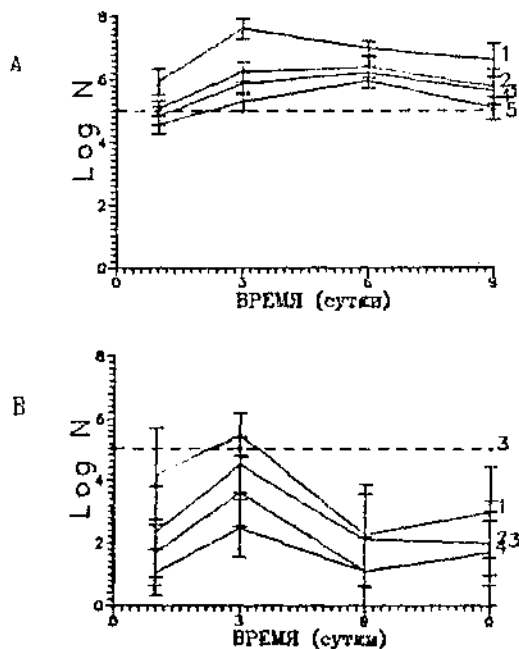


Рис. 2. Динамика микробной обсемененности тканей огнестрельной раны на различном удалении от раневого канала у животных контрольной (А) и опытной (Б) групп (1 - 0.0-0.5 см, 2 - 0.5 - 1.0 см, 3 - 1.0-1.5 см, 4 - 1.5-2.0 см, 5 - критический уровень).

Эйного воспаления наблюдались в период с 5 по 9 сутки после ранения, когда отмечалось сохранение высокой численности высеваемых микроорганизмов и их значительная распространенность в ткани к периферии от раневого канала. Последнее было показано при изучении пографической распространенности бактерий в тканях огнестрельной раны. Показано, что у животных обеих групп по мере удаления от раневого канала происходит прогрессивное снижение численности бактерий. Но если у контрольных животных наблюдалось постепенное сниже-

низ обсемененности тканей, то у животных после введения липс изменения в степени обсемененности различных слоев тканей были еще резкими. Так, если через 1 сутки после нанесения травмы у животных контрольной группы наблюдалось незначительное снижение числа бактерий, и на расстоянии 2.0 см этот показатель только на 30 был ниже, чем на поверхности раневого канала, то у животных опытной группы уже на расстоянии 1.0 см от раневого канала отмечено снижение уровня обсемененности на 43.4%, а на расстоянии 2.0 см - 74.9%. В динамике характер распространенности бактерий по направлению к здоровым тканям остался прежним, и к концу периода наблюдения разница в количестве бактерий в тканях, удаленных от раневого канала на расстояние 2.0 см, в сравнении с поверхностными тканями у животных опытной группы составила 44.0%, в то время как у контрольных животных - 23.3%.

Принимая во внимание идентичность травмы у обеих групп животных и значительное накопление липсом в патологически измененных тканях уже через 1 час после их введения, выявленные качественные и количественные отличия, зарегистрированные при микробиологических исследованиях раневой микрофлоры у животных контрольной и опытной групп, а также менее выраженный процесс гнойного воспаления в одной группе можно связать только с действием вводимого препарата. Существенное значение в полученном эффекте могут иметь показания экспериментов *in vitro* бактерицидное и антиадгезивное действия липсом.

Таким образом, проведенное исследование на животных с открытой раной подтвердило результаты модельных экспериментов. Используемый препарат липсом после однократного подкожного введения оказывает выраженный антибактериальный эффект, что выражается не только снижением численности бактерий, контаминирующих ткани

и, но и уменьшением распространенности микроорганизмов к периферии т раневого канала.

ВЫВОДЫ

1. Суспензия фосфатидилхолин-холестериновых липосом обладает прямым бактерицидным действием по отношению ко всем исследованным условно патогенным и патогенным микроорганизмам в дозах 1,5-3,2 мг/мл и выше. Чувствительность к действию препарата убывает в ряду: *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*.

2. Бактерицидная активность препарата определяется не только его молекулярным составом, но и обусловлена наличием везикулярной структуры используемых липидов, при отсутствии которой эффективность препарата снижается в 4 - 16 раз.

3. Бактерицидная активность липосомальной суспензии зависит от ее pH и содержания продуктов ПОД. Оптимальными параметрами липосомальной суспензии являются pH 4,8±0,12, уровень МДА 51,70±2,34 ммоль/мл - 75,75±7,03 ммоль/мл. При этих условиях МПК препарата составляет для *Staphylococcus aureus* - 0,8 мг/мл, для *Pseudomonas aeruginosa* - 1,6 мг/мл.

4. Суспензия липосом в концентрациях в 3,2-32,0 раз ниже ингибиторных обладает антиадгезивным действием по отношению к эукариотическим клеткам.

5. Введение суспензии фосфатидилхолин-холестериновых липосом с заданными параметрами подкожно животным дистальнее огнестрельной раны в дозе 25 мг/мл/кг приводит к снижению уровня обсемененности раны и инвазивности бактерий вглубь тканей раневого канала.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Противовоспалительные эффекты липосом/ В. М. Крейнес, В. М. Мельникова, Я. М. Марголин и др. // Вестн. Акад. мед. наук СССР. - 1990 № 6. - С. 44-47.
2. Мельянцева Л. П., Крейнес В. М., Лагунова Н. Т. Экспериментальное обоснование и эффективность антибактериальной терапии нестрельных ран с помощью препарата "липоран" / Всесоюзная юбилейная научная конференция, посвященная 180-летию со дня рождения Н. И. Пирогова и 150-летию начала его научной и педагогической деятельности в Медико-хирургической академии России, 19-21 февраля 1991: Тез. докл. - Л., 1990, С. 34-36.
3. Крейнес В. М., Марголин Я. М., Мельянцева Л. П. Применение "липорана" при отсроченной первичной хирургической обработке нестрельных ран / Всесоюзная юбилейная научная конференция, посвященная 180-летию со дня рождения Н. И. Пирогова и 150-летию начала его научной и педагогической деятельности в Медико-хирургической академии России, 19-21 февраля 1991: Тез. докл. - Л., 1990, С. 89.
4. Использование липосом с ингибиторами фосфолипаз для лечения огнестрельных ран/ Ю. Г. Шапошников, Я. М. Марголин, В. М. Крейнес и др. // XIII пленум правления Всесоюзного научного общества травматологов-ортопедов, 27-29 июня 1991: Тез. докл.: Иркутск, 1991, с. 112-113.
5. Мельянцева Л. П., Крейнес В. М. Антибактериальная активность липосом // Актуальные проблемы химиотерапии бактериальных инфекций. Всесоюз. конф., 22-24 октября 1991: Тез. докл., М.-1991. - Ч. 4. - С. 433.
6. Мельянцева Л. П. Влияние липосомальной суспензии на микробную обсемененность травматически поврежденных мягких тканей. // Профилактика и лечение раневой инфекции у травматолого-ортопедических больных. - М.: Изд-во ЦИТО, 1991. - С. 33-36.