

С.С. СТЕБУНОВ,
П.В. ОРЕХОВСКИЙ,
В.К. ОКУЛИЧ, С.В. ПАНЬКО,
С.А. КУДРЯВЦЕВ,
Д.Г. СОСИНОВИЧ,
А.С. КАРПИЦКИЙ,
А.А. ОЛАДЬКО, А.А. АЛЕКСЕЕВ,
А.А. ЛЫЗИКОВ
Витебский государственный
медицинский университет,
Республика Беларусь

УД : 579:577.18

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ IN VITRO И IN VIVO ПРОЛОНГИРОВАННЫХ ФОРМ АНТИБИОТИКОВ

Исследована антимикробная активность пролонгированных микрокапсулированных лекарственных форм препаратов, содержащих рифампицин и/или метронидазол. На стандартных штаммах *S. aureus* и *E. coli* методом серийных микроразведений показано, что антимикробная активность препаратов рифампицина в капсульной и бескапсульной форме достоверно не отличалась, а микрокапсулированная форма метронидазола оказалась более активной по отношению к штамму *E. coli* по сравнению с их стандартными формами. При испытании микрокапсульных форм *in vivo* на беспородных белых крысах при моделировании перитонита показана большая эффективность микрокапсул рифампицина и метронидазола, по сравнению с фармакопейными формами этих препаратов. Полученные результаты подтверждают перспективность дальнейшей разработки и внедрения в клиническую практику поликомпозиционных пролонгированных форм антибактериальных препаратов.

К **Л** **Ю** : микрокапсулы, антибиотики.

IN VITRO AND IN VIVO ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROLONGED ANTIBACTERIAL DRUG FORMS

S.S. STEBUNOV, P.V. OREKHOVSKY, V.K. OKULICH, S.V. PANKO, S.A. KUDRAVCEV,
D.G. SOSINOVICH, A.S. KARPICKI, A.A. OLADKO, A.A. ALEXSEEV, A.A. LAZIKOV
Vitebsk State Medical University (Vitebsk)

We investigated the antimicrobial activity of prolonged microcapsule forms of rifampicin and metronidazole. For testing we used standard strains of *S. aureus* and *E. coli*. It was shown, that antimicrobial activity of rifampicin microsphere form did not differ from solution drug form (determined by serial microdilution method), but metronidazole prolonged form was more active to *E. coli* in comparison with standard form. The results of *in vivo* modeling of peritonitis (animals - white nonlinear rats) showed that microsphere forms of both drugs were more effective than standard drug forms. Our data confirmed the prospects of further development and clinical testing of polycomposed prolonged antibacterial drug forms.

KEY WORDS: microcapsule, antibiotics.

Известные способы получения микрокапсул из производных целлюлозы, например получение микрокапсул фенацетина методом коацервации 2% раствора ацетифталата целлюлозы при 60°C 20% раствором сульфата натрия или фазового расслоения системы этилцеллюлоза-циклогексан-полиэтилен требуют выдерживания строгих температурных режимов, повышенных температур (50-100°C), что может вызвать разрушение инкапсулируемых

веществ, применения высокотоксичных для организма органических растворителей и реагентов (уксусный ангидрид, четыреххлористый углерод, бензол, формалин и др.) [1]. Кроме того, традиционные технологии предназначены для получения микрокапсулированных форм либо только водорастворимых, либо маслорастворимых препаратов, либо препаратов, находящихся в твердой фазе (порошки).

Целью исследования являлась изучение антимикробной активности пролонгированных форм антибактериальных препаратов.

Материалы и методы. При разработке нашего способа микрокапсулирования решалась задача устранения указанных недостатков. Поэтому был разработан способ получения микрокапсул, содержащих лекарственные вещества, основанный на процессе осаждения коацервата водорастворимого полисахарида на границе раздела фаз, включающий последующую перешивку образовавшейся оболочки микрокапсул комплексообразователями, позволяющий получить различные микрокапсулированные формы без использования токсичных органических и неорганических реагентов в "мягких условиях" ($t=20-25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}-7,0-9,0$).

Сущностью способа является то, что на водный раствор натриевой соли полисахарида, используемого в качестве эмульгатора для первичной эмульсии, содержащей масляный раствор лекарственного вещества или эмульсии типа "вода в масле" - в воде", действуют при различных температурных условиях водным раствором соли поливалентного металла и затем полученную первичную оболочку капсул перешивают комплексообразователями. Совокупность этих признаков позволяет получать микрокапсулированные лекарственные формы препаратов находящихся в водном, масляном растворе либо в виде порошка как маслорастворимых, так и водорастворимых лекарственных препаратов. Исследования выхода рифампицина и метронидазола *in vitro* проводилось при соотношении 1:100 объема микрокапсул к фосфатно-солевому буферному раствору ($\text{pH} 7,2$) при постоянном перемешивании среды ($t=37^{\circ}\text{C}$). Замеры оптической плотности аликвот диализной среды производили на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 333 нм для рифампицина и $l=277$ для метронидазола. Пересчеты концентраций осуществляли по заранее выстроенным калибровочным графикам для чистых препаратов. Исследования показали, что к 52 часу наблюдений кривая выхода рифампицина достигала максимума при общей диффузии в среду 63,3% препарата, содержащегося в депо, тогда как кривая выхода метронидазола становилась практически параллельной оси абсцисс на 9^{ом} часу наблюдений при выходе 7,2% препарата из капсул.

Результаты и обсуждение

Антибактериальная активность полученных форм (Таблица 1) проводилась известными методами [3, 4]. В начале антимикробная активность определялась ориентировочно методом диффузии в агаре. На чашку Петри

с мясопептонным агаром (МПА) вносили взвесь 10^9 колоний образующих единиц (КОЕ) суточной культуры музейных штаммов *S. aureus* (Cowan I) и *E. coli* (O₂₆). Испытываемый препарат в объеме 20 мкл вносили в лунки и после суточной инкубации измеряли зоны задержки роста. При отсутствии зоны задержки препарат считался необладающим антимикробной активностью (МПК=0).

При наличии зоны задержки роста у препарата определялась методом серийных микроразведений минимальная подавляющая концентрация (МПК) или рабочее разведение образца. Готовили двухкратные разведения препарата на мясопептонном бульоне 0,1мл в стерильной планшете (одна лунка контрольная без препарата). В каждую лунку разведения вносили 10^3 изучаемой культуры микроорганизмов. Учет проводили визуально, где МПК определяли как последнее разведение, в котором отсутствовал рост культуры. В сомнительных случаях учет контролировали фотометрически при длине волны 620 нм.

Как видно из таблицы 1 антимикробная активность препаратов рифампицина в капсульной и бескапсульной форме достоверно не отличалась. Более высокая активность спиртового раствора рифампицина и метронидазола по сравнению с их микрокапсульной формой связана с более высокой их концентрацией в растворе. Так, например, было установлено, что антимикробная активность препаратов рифампицина в микрокапсулированной форме (МПК *S. aureus* - 0,001172, *E. coli* - 7,5) и в виде раствора (МПК *S. aureus* - 0,00146, *E. coli* - 4,69), учитывая возможную двухкратную ошибку метода, достоверно не отличалась. Более высокая активность спиртового раствора рифампицина по сравнению с его микрокапсульной формой связана с более высокой концентрацией антибиотика в растворе (1:5) и метронидазола (МПК *S. aureus* - 78,125, *E. coli* - 625). Микрокапсулированная форма метронидазола оказалась более активной по отношению к штамму *E. coli* - МПК-9,76 в сравнении с раствором (МПК- *E. coli* - 625), тогда как по отношению к штамму *S. aureus*, наблюдалась обратная зависимость. Из вышеизложенного вытекает, что антимикробные препараты в микрокапсульной форме *in vitro* имеют близкую активность с их исходными принятыми формами. Выраженная антимикробная активность пролонгированных микрокапсульных форм также была подтверждена с использованием госпитальных штаммов, выделенных в Республиканском центре "Инфекция в хирургии".

С целью проверки эффективности микрокапсульных форм проводились испытания, полученных лекарственных форм *in vivo* на крысах.

Для экспериментов использовались беспородные

**Фармакологические формы антибактериальных препаратов
и их антибактериальная активность *in vitro***

№	остав препарата	Рифампицин мг/мл	Метронидазол л мг/мл	ссоциато- образователь мг/мл	МПК мкг/мл	
					<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	МК с рифампицином	6	0	0	0,001172	7,5
1а	Р-р рифампицина	30	0	0	0,00146	4,69
2	МК без антимикробных агентов	0	0	0	0	0
2а	МК без антимикробных агентов и комплексообразователя (плацебо)	0	0	0	0	64 р*
3	МК с метронидазолом	0	10	0	0	9,76
3а	Р-р метронидазола	0	50	0	78,125	625
4	МК с рифампицином и метронидазолом	3	5	0	256000 р*	160 р*
5	Р-р рифампицина с метронидазолом	15	25	0	256•10 ⁴ р*	6400р*
6	Р-р комплексообразователя 1, 2, 3	0	0	0	0	0
7	МК с рифампицином в ассоциате	6	0	6	64•10 ⁴ р*	800р*
8	МК ассоциатообразователя	0	0	6	4,69	0
9	Р-р рифампицина в ассоциате (суспензия)	30	0	30	256•10 ⁴ р*	25600р*
10	Р-р ассоциатообразователя	0	0	30	0,2929	4,68
11	МК с ассоциатом рифампицина и метронидазолом	3	5	3	8000р*	600

Примечание: * - в ассоциациях МПК концентрация не определялась, а указывалось рабочее разведение препарата; МК – микрокапсулы.

белые крысы самцы. Для моделирования перитонита микробную смесь, состоящую из равного количества стандартных штаммов *S. aureus* и *E. coli* – по 1,5 мл. Шерсть в месте введения (средняя треть правой половины брюшной стенки) выбривали, кожу обрабатывали раствором йода, после чего вводили в брюшную полость 3 мл полимикробной взвеси на физиологическом растворе [2]. Через 6 часов после введения микроорганизмов у всех крыс наблюдали симптомы перитонита: заторможенность, вялость, отказ от пищи, учащение дыхание, вздутие живота. У контрольных групп забор экссудата (200 мкл) проводили стерильным шприцом

через 24 часа после заражения. Всем остальным крысам через сутки вводили препараты (Таблица 2) и через 7 часов забирали по 200 мкл экссудата. Каждый полученный экссудат в течение часа разводили на физиологическом растворе и готовили 6 десятикратных разведений по 100 мкл, из которого наносили равномерно на чашку Петри с мясопептонным агаром. Подсчет колоний проводили через 24 часа после инкубации в термостате при 37°C. В дальнейшем проводили перерасчет колония образующих единиц (КОЕ) на 1 мл экссудата.

Полученные результаты (Таблица 2) подтверждают результаты тестов *in vitro*. Отсутствие роста наблюдает-

**Фармакологические формы антибактериальных препаратов
и их антибактериальная активность in vivo (на крысах)**

№	Препараты	ОЕ/мл экссудата (через 7 ч после введения пр-та или через 31 ч после заражения)
1	Контроль без лечения ч/з 24 ч после заражения	2 500
2	Метронидазол (1мл) + рифампицин (1мл)	2 500
3	МК рифампицин + метронидазол (1мл)	0 (роста нет)
4	Метронидазол (1мл)	92 500
5	Рифампицин (1мл)	1 375
6	МК метронидазол (1мл)	425
7	МК рифампицин (1мл)	400

Примечание: МК – микрокапсулы.

ся только при использовании микрокапсул рифампицина и метронидазола через 7 часов после их введения в брюшную полость. Микрокапсулы, содержащие только рифампицин или метронидазол, хуже подавляют рост микроорганизмов, видимо, за счет более узкого спектра действия и отсутствия эффекта синергизма. Однако, эффект данных микрокапсульных препаратов по сравнению с контролем (без лечения) и особенно при однократном применении растворов метронидазола и /или рифампицина значителен. Более высокое содержание микроорганизмов в экссудате при применении раствора метронидазола по сравнению с контрольной группой, возможно, так как взятия проб в первом случае происходило на 7 часов позднее.

Более низкая эффективность растворов антибактериальных препаратов по сравнению с микрокапсульными формами, несомненно, связана с быстрой элиминацией препаратов при внутриполостном введении. При применении микрокапсульных форм выделение препаратов происходит постепенно и активность сохраняется более длительно, что и подтверждает данное исследование.

Заключение

Таким образом, разработанная технология микрокапсулирования позволяет получить композиционные пролонгированные формы антибактериальных веществ с выраженной пролонгацией их выхода из депо, что может быть использовано при парентеральном введении препаратов в очаги воспалительных патологических процессов с целью реализации мишенно-транспортных фармакологических подходов.

Технология микрокапсулирования позволяет получить композиционные пролонгированные формы как масло-, так и водорастворимых антибактериальных веществ с сохранением их антимикробной активности, что наглядно подтвердили результаты испытаний in vitro и in vivo.

Полученные результаты подтверждают перспективность дальнейшей разработки и внедрения в клиническую практику поликомпозиционных пролонгированных форм антибактериальных препаратов.

литература

1. Имаписи Ю. Биополимеры. – М., 1988.
2. Косинец А.Н. Профилактика и лечение гнойно-воспалительных осложнений при экстренных операциях на органах брюшной полости// Дисс . . . д-ра мед.наук.: - М., 1994.
3. Навашин П.С., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия. – М., 1982. – 496 С.
4. Sahn D. F. S., Washington II J.A. Antibacterial Susceptibility Test: Dilution Methods //Manual of Clinical Microbiology. Albert Balows. - Washington, D.C. - 1991. - 1363P.