

УДК 616.24-002:616-08:615:599.323.4:616-092.4

*А.А. Биркун, Ю.Л. Криворутченко, О.Н. Постникова, А.А. Бабанин,
Н.Ю. Новиков, М.И. Федосов, Т.А. Логадырь*

*ГУ «Крымский государственный медицинский университет
им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь*

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ПРЕПАРАТОМ ЭКЗОГЕННОГО СУРФАКТАНТА И АМИКАЦИНОМ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ, ВЫЗВАННОЙ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

В опытах *in vivo* продемонстрированы преимущества комбинированной терапии амикацином (Амицил, Киевмедпрепарат, Украина) и экзогенным сурфактантом (Сузакрин, Докфарм, Украина) перед монотерапией амикацином или сурфактантом при лечении острой пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*. В популяции инфицированных крыс интратрахеальная инстилляционная смесь сурфактант-амикацин вызывала явное уменьшение бактериального обсеменения дыхательных путей и ограничение бактериемии, а также сдерживала угнетение поверхностной активности бронхоальвеолярного смыва. Более высокая эффективность комбинированного лечения по сравнению с другими исследованными формами медикаментозного воздействия свидетельствует о перспективности использования экзогенного лёгочного сурфактанта в качестве носителя антибиотиков, вводимых интратрахеальным путём.

Ключевые слова: *экзогенный сурфактант, антибиотики, амикацин, госпитальная пневмония, P. aeruginosa, поверхностная активность.*

Использование экзогенного лёгочного сурфактанта в качестве средства доставки противомикробных препаратов в респираторный отдел лёгких представляет собой перспективный метод лечения пневмоний, вызываемых бактериями и грибами [1].

Сурфактант – это липопротеиновый комплекс, который синтезируется клетками альвеолярной выстилки и обладает способностью снижать поверхностное натяжение. Этот эффект поддерживает нормальную альвеолярную вентиляцию и газообмен, а также предотвращает спадение альвеол [2]. Обеспечивая однородное периферическое распределение жидкости в дыхательных путях, экзогенный сурфактант способен улучшать доставку антибиотиков в просвет альвеол и тем самым повышать результативность противомикробной терапии и уменьшать вероятность развития побочных реакций [3].

К настоящему времени описаны особенности взаимодействия между некоторыми антибиотиками и препаратами экзогенного сурфактанта, а также ряд эффектов комбинированной сурфактант-антибактериальной терапии в опытах на лабораторных животных [3–7]. Многообещающие результаты были получены *in vitro* при исследовании комбинации отечественного препарата лёгочного сурфактанта свиньи и антибиотика амикацина [8–9]. Помимо того, что эти препараты не оказывали отрицательного влияния друг на друга, их сочетанное применение характеризовалось высокой активностью в отношении культур *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*.

В данной работе исследуется влияние комбинированной терапии амикацином и препаратом экзогенного сурфактанта на крыс при экспериментальной пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*. Терапию указанной

© А.А. Биркун, Ю.Л. Криворутченко, О.Н. Постникова и др., 2013

комбинацией сравнивали с монотерапией амикацином и экзогенным сурфактантом при эндотрахеальном введении, а также оценивали влияние этих воздействий на поверхностную активность бронхоальвеолярного смыва.

Материал и методы. В опытах использовали стерильный препарат лёгочного сурфактанта свиньи (Сузакрин, Докфарм, Украина) и антибиотик амикацин (Амицил, Киевмедпрепарат, Украина) из группы аминогликозидов. Сузакрин представляет собой эмульсию очищенных фосфолипидов, выделенных из лёгких свиньи, в изотоническом растворе (76 %; 50 мг в 1 мл эмульсии); содержит сурфактант-ассоциированные белки В и С, но лишён сурфактантных белков А и D. Амикацин обладает выраженной антисинегнойной активностью и рекомендован для лечения госпитальной пневмонии, вызванной полирезистентными штаммами [10]. Дозы сурфактанта и амикацина рассчитывали на основе максимальных суточных доз, рекомендованных для взрослых пациентов, а именно 10 и 15 мг/кг соответственно. Приготовление раствора антибиотика, эмульсии сурфактанта и экспериментальной смеси сурфактант-антибиотик осуществляли с соблюдением правил асептики непосредственно перед эндотрахеальным введением. Для растворения антибиотика, разведения раствора и эмульсии сурфактанта использовали стерильный 0,9%-ный раствор натрия хлорида.

Взрослые самцы крыс линии Вистар ($n = 119$) массой 180–220 г были разделены на инфицированных и неинфицированных в зависимости от характера субстанции, введённой в трахею на этапе индукции пневмонии (соответственно бактериальная суспензия или изотонический раствор). Всего сформировано 10 групп животных: неинфицированные крысы без терапии (интактные; 6 особей), с введением изотонического раствора (18), сурфактанта (12), амикацина (16) и комбинации сурфактант-амикацин (11); инфицированные крысы без терапии (11), с введением изотонического раствора (12), сурфактанта (11), амикацина (11) и комбинации сурфактант-амикацин (11).

Для индукции пневмонии использовали бактериальную взвесь, приготовленную из

суточной культуры *P. aeruginosa* (штамм АТСС 27853). Оптическая плотность взвеси соответствовала 10 единицам мутности по стандарту MacFarland ($3,0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл). Пункцию трахеи с болюсным введением 0,2 мл бактериальной взвеси (или изотонического раствора) проводили при ингаляционной анестезии газовой смесью севофлуран/кислород.

Болюсное интратрахеальное введение экспериментальной комбинации сурфактант-антибиотик, сурфактанта, амикацина или изотонического раствора выполняли через 6 часов после индукции пневмонии путём повторной пункции трахеи при том же методе анестезии. Аналогично вводили препараты неинфицированным животным, которым исходно вместо микробной взвеси закапывали раствор. Объём вводимого в трахею раствора, эмульсии или экспериментальной комбинации составлял 0,4 мл; срок от момента введения лечебных препаратов до конца эксперимента – 18 часов.

Отбирали пробы и умерщвляли подопытных животных в условиях глубокой анестезии в начале эксперимента (интактные крысы), спустя 6 (инфицированные крысы без терапии) и 24 часа от начала опыта.

Пробы бронхоальвеолярного смыва и крови засеивали на твёрдые питательные среды. Перед посевом образцы крови инкубировали в течение 24 часов в сахарном бульоне при температуре 37 °С. Идентификацию бактерий и подсчёт колоний осуществляли при помощи традиционных микробиологических методов [11].

Для оценки поверхностной активности проб бронхоальвеолярного смыва использовали модифицированный метод Pattle [12], который позволяет установить динамику силы поверхностного натяжения в соответствии с изменениями диаметра пузырьков воздуха. Пробы бронхоальвеолярного смыва подвергались вспениванию в пробирках с помощью шприцев. Полученную пену изучали с помощью микроскопа Olympus CX41, оснащённого фотокамерой Olympus C5050Z (Япония). Фотографирование одного поля зрения выполнялось при увеличении 200 в течение 20 минут с интервалом 30 секунд. Для анализа всех снимков ($n = 4797$) использовали программный продукт Olympus DP-Soft 3.11. Изменения 20 произвольно

выбранных пузырьков отслеживали на всех снимках каждой повторности. Диаметр пузырьков измеряли только на первом и последнем (полученном спустя 20 минут) снимках. В целом выполнено 4680 измерений пузырьков. Для каждой последовательности рассчитывали индекс стабильности (ИС) по формуле

$$ИС = \Sigma d_x^2 / \Sigma d_y^2$$

где d_x – результат последнего измерения в серии (41-й снимок);

d_y – результат первого измерения (1-й снимок).

Пробы лёгочной ткани были подвергнуты гистопатологическому исследованию методом световой микроскопии при окраске срезов гематоксилином и эозином.

Сравнение всех числовых данных выполнено с помощью t-теста Стьюдента. Уровень вероятности различий $p < 0,05$ рассматривался как статистически значимый.

Результаты. У интактных крыс и неинфицированных крыс, получавших изотонический раствор, сурфактант, амикацин и комбинацию амикацин-сурфактант, отсутствовали как морфологические признаки пневмонии, так и рост *P. aeruginosa* при бактериологическом исследовании проб бронхоальвеолярного смыва и крови.

Спустя 18 часов после инстилляций, независимо от введённой субстанции, у неинфицированных крыс наблюдалось снижение поверхностной активности бронхоальвеолярного смыва (табл. 1). Разница в величине диаметра пузырьков свидетельствует о том, что у неинфицированных крыс, которым вводили смесь амикацина с сурфактантом, поверхностная активность смыва

снижалась в меньшей степени, чем у крыс, получавших чистый сурфактант ($p < 0,001$) и чистый амикацин ($p < 0,01$).

Развитие острой гнойной пневмонии подтвердилось при микроскопии срезов лёгочной ткани во всех группах инфицированных животных.

Через 6 часов после введения бактериальной взвеси развитие воспалительного процесса сопровождалось высеванием *P. aeruginosa* у большинства животных из бронхоальвеолярного смыва, а у некоторых и из крови (табл. 2, группа без терапии). Кроме того, судя по разнице в величине диаметра пузырьков, происходило снижение поверхностной активности бронхоальвеолярного смыва ($p < 0,001$; по сравнению с интактными крысами).

Спустя 24 часа после заражения определялись бактериологические признаки прогрессирования синегнойной инфекции, а именно бактериемия у большей части животных, тотальное обсеменение образцов бронхоальвеолярных смывов и наиболее высокие значения количества образующихся колоний (табл. 2, группа животных, которым вводили изотонический раствор). При этом разница в величине диаметра пузырьков свидетельствует о том, что поверхностная активность бронхоальвеолярных смывов продолжала уменьшаться ($p < 0,001$; по сравнению с группой без терапии), будучи также более низкой, чем у неинфицированных крыс, получавших изотонический раствор ($p < 0,001$; по сравнению с группой, получавшей раствор, табл. 1).

У животных с пневмонией, получавших сурфактант, через 24 часа после инфици-

Таблица 1. Показатели поверхностной активности бронхоальвеолярного смыва у интактных и неинфицированных крыс спустя 18 часов от введения препаратов ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных				
	интактные	неинфицированные, которым введён			
		изотонический раствор	сурфактант	амикацин	сурфактант + амикацин
ИС	0,97±0,04 (6)	0,80±0,06 (17)	0,71±0,07 (11)	0,70±0,07 (16)	0,81±0,06 (11)
D, мкм	0,69±0,30 (120)	3,85±0,31 (340)	6,12±0,45 (220)	5,87±0,41 (320)	4,10±0,41 (220)

Примечания: 1. В скобках число наблюдений.

2. $p < 0,05$.

рования (18 часов после введения препарата) показатели обсеменённости *P. aeruginosa* не имели существенных отличий от таковых у заражённых крыс, получавших раствор (табл. 2). Вместе с тем, угнетение поверхностной активности бронхоальвеолярных смывов при введении экзогенного сурфактанта было менее выраженным, чем при инстиляции раствора, на что указывают разные величины диаметра пузырьков ($p < 0,001$).

угнетение поверхностной активности бронхоальвеолярных смывов, что подтверждается сравнением величины диаметра пузырьков ($p < 0,05$) в группах крыс, которым вводили амикацин и раствор (табл. 2).

У крыс с экспериментальной пневмонией, которым интратрахеально вводили смесь амикацина с сурфактантом, интенсивность обсеменения бронхоальвеолярных смывов синегнойной палочкой была существеннее,

Таблица 2. Обсеменённость бронхоальвеолярных смывов (БАС) и крови *Pseudomonas aeruginosa* (*P. a.*) и показатели поверхностной активности БАС у инфицированных крыс ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных				
	без терапии	которым введён			
		изотонический раствор	сурфактант	амикацин	сурфактант + амикацин
<i>P. a.</i> -позитивные крысы, кровь ($\% \pm m$)	36 \pm 15 (11)	58 \pm 15 (12)	36 \pm 15 (11)	36 \pm 15 (11)	27 \pm 14 (11)
<i>P. a.</i> -позитивные крысы, БАС ($\% \pm m$)	91 \pm 9 (11)	100 \pm 25 (12)	100 \pm 27 (11)	82 \pm 12 (11)	55 \pm 16 (11)
Пределы концентраций <i>P. a.</i> , БАС, КОЕ/мл	0–500 000	100–1 000 000	100–1 000 000	0–100 000	0–10 000
Средняя обсеменённость <i>P. a.</i> , БАС ($\log_{10} \pm m$)	3,47 \pm 0,38 (10)	4,52 \pm 0,34 (12)	4,20 \pm 0,38 (11)	2,4 \pm 0,41 (9)	2,33 \pm 0,33 (6)
ИС	0,85 \pm 0,04 (11)	0,71 \pm 0,07 (12)	0,88 \pm 0,05 (11)	0,1 \pm 0,10 (11)	0,88 \pm 0,05 (11)
<i>d</i> пузырьков, мкм	2,62 \pm 0,25 (220)	5,56 \pm 0,39 (240)	2,33 \pm 0,32 (220)	7,09 \pm 0,52 (220)	2,52 \pm 0,33 (220)

Примечания: 1. КОЕ/мл – колониеобразующие единицы в миллилитре; \log_{10} – десятичный логарифм средней геометрической.

2. В скобках число наблюдений.

У инфицированных крыс, получавших амикацин, в те же сроки наблюдались иные изменения. Под воздействием антибиотика в образцах бронхоальвеолярных смывов определялось значительно меньшее число жизнеспособных *P. aeruginosa*, чем у крыс, которым вводили изотонический раствор ($p < 0,01$) или сурфактант ($p < 0,05$). Наряду с демонстрацией антисинегнойной активности, введение амикацина усиливало

вено меньше, чем у инфицированных крыс, получавших чистый сурфактант ($p < 0,01$) или изотонический раствор ($p < 0,001$). Отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$) по всем бактериологическим показателям между крысами этой группы и крысами, получавшими чистый амикацин, свидетельствует о сохранении противомикробной активности антибиотика после смешивания с сурфактантом свиньи и последующей

совместной (в одном объёме) инстилляцией обоих препаратов. Более того, самые низкие из всех сравниваемых групп показатели экстенсивности и интенсивности бактериального обсеменения (табл. 2, группа крыс, которым вводили сурфактант+амикацин) указывают на отчётливую тенденцию к увеличению антисинегнойных эффектов амикацина *in vivo* при введении его вместе с сурфактантом. Наряду с этим, при использовании для лечения комбинации амикацина с сурфактантом отсутствовало угнетение поверхностной активности бронхоальвеолярных смывов, свойственное введению чистого амикацина: индекс стабильности и разница в величине диаметра пузырьков были соответственно выше ($p < 0,05$) и ниже ($p < 0,001$) у крыс, получавших смесь препаратов. Показатели поверхностной активности бронхоальвеолярных смывов у этих животных были сходны с таковыми у крыс при терапии чистым сурфактантом (табл. 2).

Обсуждение результатов. Первый опыт применения экзогенного сурфактанта в качестве средства доставки антибиотиков в дыхательные пути *in vivo* получен V. S. Kharasch et al. [1]. Ими установлено, что сурфактант значительно улучшает распределение пентамида в лёгких здоровых хомяков. В исследовании [6] продемонстрировано значительное превосходство комбинированной терапии сурфактантом и тобрамицином перед монотерапией тобрамицином, что подтверждалось лучшей выживаемостью мышей с инфекцией дыхательных путей, вызванной *Klebsiella pneumoniae*. Хотя эти наблюдения составили основу для дальнейших исследований сочетанного применения экзогенного сурфактанта и антибиотиков, комплексная оценка антибактериальной

эффективности и влияния комбинированного режима на поверхностную активность *in vivo* в сравнении с другими схемами терапии до сих пор не проводилась.

Данное исследование демонстрирует преимущества комбинированной терапии сурфактантом и амикацином перед монотерапией амикацином или сурфактантом при лечении острой пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*. Интратрахеальная инстиляция смеси сурфактант-амикацин приводила к явному уменьшению бактериального обсеменения дыхательных путей и ограничению бактериемии в популяции инфицированных крыс. Кроме того, комбинированная терапия сдерживала подавление поверхностной активности бронхоальвеолярных смывов. Эти эффекты не связаны с прямым взаимным влиянием ингредиентов экспериментальной комбинации, поскольку *in vitro* в смеси препараты лёгочного сурфактанта свиньи и амикацина не изменяли своих поверхностно-активных и противомикробных свойств [8, 9]. Вероятнее всего, описанные положительные эффекты комбинированной терапии обусловлены более эффективной доставкой антибиотика в респираторный отдел лёгких, а также заместительными поверхностно-активными свойствами сурфактанта свиньи.

Таким образом, отсутствие отрицательного взаимодействия между сурфактантом свиньи и амикацином, а также более высокая эффективность комбинированного лечения по сравнению с другими исследованными формами медикаментозного воздействия свидетельствуют о том, что использование экзогенного лёгочного сурфактанта в качестве носителя антибиотиков, вводимых интратрахеальным путём, представляет собой перспективный метод терапии, который до сих пор не нашёл применения в клинической практике.

Список литературы

1. Pulmonary surfactant as a vehicle for intratracheal delivery of technetium sulfur colloid and pentamidine in hamster lungs / V. S. Kharasch, T. D. Sweeney, J. Fredberg [et al.]. // Am. Rev. Respir. Dis. – 1991. – Vol. 144. – P. 909–913.
2. Загорулько А. К. Сурфактантная система легких и заместительная сурфактантная терапия / А. К. Загорулько, А. А. Биркун, Н. Ю. Новиков. – Симферополь, 1995. – 74 с.
3. Haitsma J. J. Exogenous surfactant as a drug delivery agent / J. J. Haitsma, U. Lachmann, B. Lachmann // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 2001. – Vol. 47 (2–3). – P. 197–207.
4. Influence of pulmonary surfactant on *in vitro* bactericidal activities of amoxicillin, ceftazidime, and tobramycin / A. van't Veen, J. W. Mouton, D. Gommers [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 1995. – Vol. 39 (2). – P. 329–333.

5. Exogenous pulmonary surfactant as a drug delivering agent: influence of antibiotics on surfactant activity / A. van 't Veen, D. Gommers, J. W. Mouton [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 1996. – Vol. 118 (3). – P. 593–598.

6. Pulmonary surfactant as vehicle for intratracheally instilled tobramycin in mice infected with *Klebsiella pneumoniae* / A. van't Veen, J. W. Mouton, D. Gommers, B. Lachmann // Br. J. Pharmacol. – 1996. – Vol. 119. – P. 1145–1148.

7. Lung clearance of intratracheally instilled ^{99m}Tc-tobramycin using pulmonary surfactant as vehicle / A. van 't Veen, D. Gommers, S. J. C. Verbrugge [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 1999. – Vol. 126. – P. 1091–1096.

8. Биркун А. А. Влияние антибиотиков, активных в отношении полирезистентных возбудителей госпитальной пневмонии, на поверхностную активность экзогенного сурфактанта / А. А. Биркун // Патологія. – 2011. – Т. 8, № 1. – С. 13–16.

9. Оценка влияния экзогенного сурфактанта на антибактериальные свойства препаратов, активных в отношении полирезистентных возбудителей госпитальной пневмонии / А. А. Биркун, Ю. Л. Криворутченко, О. Н. Постникова [и др.] // Укр. біофарм. журн. – 2012. – № 1–2. – С. 96–102.

10. American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2005. – Vol. 171 (4). – P. 388–416.

11. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. М. О. Биргера. [3-е изд., перераб. и доп.]. – М.: Медицина, 1982. – 464 с.

12. Метод оценки эффективности применения бронхоальвеолярного защитного комплекса при лечении острого гнойного синусита в условиях эксперимента / М. А. Завалий, А. Г. Балабанцев, А. К. Загоруйко [та ін.] // Журнал вушних, носових і горлових хвороб. – 2008. – № 5. – С. 68–69.

О.О. Біркун, Ю.Л. Криворутченко, О.М. Постнікова, А.А. Бабанін, М.Ю. Новіков, М.І. Федосов, Т.О. Логадир

МІКРОБІОЛОГІЧНЕ Й ФІЗИКО-ХІМІЧНЕ ОЦІНЮВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ КОМБІНОВАНОЇ ТЕРАПІЇ ПРЕПАРАТОМ ЕКЗОГЕННОГО СУРФАКТАНТА ТА АМІКАЦИНОМ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ПНЕВМОНІЇ, ЩО СПРИЧИНЕНА PSEUDOMONAS AERUGINOSA

У дослідях *in vivo* продемонстровані переваги комбінованої терапії амікацином (Аміцил, Київмедпрепарат, Україна) та екзогенним сурфактантом (Сузакрин, Докфарм, Україна) перед монотерапією амікацином або сурфактантом при лікуванні гострої пневмонії, що спричинена *P. aeruginosa*. В популяції інфікованих щурів інтратрахеальна інстиляція суміші сурфактант–амікацин викликала явне зменшення бактеріального обсіменіння дихальних шляхів і обмеження бактеріємії, а також стримувала пригнічення поверхневої активності бронхоальвеолярного змиву. Більш висока ефективність комбінованого лікування в порівнянні з іншими дослідженими формами медикаментозного впливу свідчить про перспективність застосування екзогенного легеневого сурфактанту в якості носія антибіотиків, що вводяться інтратрахеальним шляхом.

Ключові слова: екзогенний сурфактант, антибіотики, амікацин, госпітальна пневмонія, *P. aeruginosa*, поверхнева активність.

А.А. Birkun, Y.L. Krivorutchenko, O.N. Postnikova, A.A. Babanin, N.Yu. Novikov, M.I. Fedosov, T.A. Logadir

MICROBIOLOGICAL AND PHYSICOCHEMICAL ASSESSMENT OF EFFICIENCY OF COMBINED TREATMENT WITH EXOGENOUS SURFACTANT AND AMIKACIN IN EXPERIMENTAL PNEUMONIA CAUSED BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA

In vivo experiments have demonstrated advantages of combined therapy with amikacin (Amicil, Kievmedpreparat, Ukraine) and exogenous surfactant (Suzacrin, Docpharm, Ukraine) over monotherapy with amikacin or surfactant when treating acute pneumonia caused by *P. aeruginosa*. In the

population of infected rats an intratracheal instillation of the surfactant-amikacin mixture has produced an obvious reduction in bacterial contamination of respiratory tract and a restriction of bacteriemia, as well as constrained a suppression of bronchoalveolar wash surface activity. Higher efficiency of combined treatment as compared with other investigated treatment modalities is indicative of prospectivity of exogenous pulmonary surfactant use as a carrier for intratracheally administered antimicrobials.

Key words: *exogenous surfactant, antimicrobials, amikacin, hospital-acquired pneumonia, P. aeruginosa, surface activity.*

Поступила 23.11.12