

А.А. Биркун третий

Влияние антибиотиков, активных в отношении полирезистентных возбудителей госпитальной пневмонии, на поверхностную активность экзогенного сурфактанта

Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского

Ключевые слова: экзогенный сурфактант, антибиотики, поверхностная активность, фармакологическая совместимость.

В опытах *in vitro* с использованием модифицированного метода Pattle установлено, что поверхностная активность экзогенного сурфактанта (Сузакрин, Докфарм, Украина) существенно не изменяется при добавлении терапевтических концентраций амикацина (Амицил, Киевмедпрепарат, Украина) из группы аминогликозидов и цефепима (Cefepime HCl, Nectar Lifesciences Ltd., Индия) из группы цефалоспоринов. Добавление к сурфактанту терапевтической дозы колістиметата натрия (Коломицин Инъекция, Forest Laboratories UK Ltd., Великобритания) из группы полимиксинов сопровождается значительным снижением поверхностной активности обоих препаратов, что указывает на их фармакологическую несовместимость при смешивании в одном объеме. Предложенные экспериментальные суспензии сурфактант+амикацин и сурфактант+цефепим могут быть рекомендованы для дальнейших доклинических испытаний.

Вплив антибіотиків, активних відносно полірезистентних збудників шпитальної пневмонії, на поверхневу активність екзогенного сурфактанту

О.О. Биркун третий

У дослідях *in vitro* з використанням модифікованого методу Pattle встановлено, що поверхнева активність екзогенного сурфактанту (Сузакрін, Докфарм, Україна) істотно не змінюється при додаванні терапевтичних концентрацій амікацину (Аміцил, Київмедпрепарат, Україна) з групи аміноглікозидів та цефепіму (Cefepime HCl, Nectar Lifesciences Ltd., Індія) з групи цефалоспоринів. Додавання до сурфактанту терапевтичної дози колістиметату натрію (Коломицин Ін'єкція, Forest Laboratories UK Ltd., Велика Британія) з групи поліміксинів супроводжується значним зниженням поверхневої активності обох препаратів, що засвідчує їх фармакологічну несумісність при змішуванні в одному об'ємі. Запропоновані експериментальні суспензії сурфактант+амікацин та сурфактант+цефепім можуть бути рекомендовані для подальших доклінічних досліджень.

Ключові слова: екзогенний сурфактант, антибіотики, поверхнева активність, фармакологічна сумісність.

Патологія. – 2011. – Т.8., №1. – С. 13–16

Influence of antibiotics, which are active against causative agents of multidrug-resistant pneumonia, on surface activity of exogenous surfactant

A. A. Birkun the third

In vitro experiments using modified Pattle's method it have been determined that surface activity of the exogenous surfactant (Suzacrin, Docpharm, Ukraine) is not changed significantly when supplemented with therapeutical concentrations of aminoglycoside antibiotic amikacin (Amicil, Kievmedpreparat, Ukraine) and cephalosporin antibiotic cefepime (Cefepime HCl, Nectar Lifesciences Ltd., India). Supplementation of the surfactant suspension with therapeutic dose of polymyxin antibiotic colistimethate sodium (Colomycin Injection, Forest Laboratories UK Ltd., UK) is followed by significant decrease in surface activity of both compounds. This observation substantiates pharmacological incompatibility of exogenous surfactant and colistimethate sodium when mixed in same volume. It is advisable to investigate proposed experimental suspensions of surfactant+amikacin and surfactant+cefepime in further preclinical studies.

Key words: exogenous surfactant, antibiotics, surface activity, pharmacological compatibility.

Pathologia. 2011; 8(1): 13–16

Эффективность антибактериальной терапии зависит от формирования достаточной концентрации антибиотика в очаге инфекции, что справедливо в случаях госпитальной пневмонии [2]. Считается, что введение антибиотика в трахеобронхиальное дерево способствует созданию его высокой концентрации в очаге инфекции при низком уровне всасывания препарата в системный кровоток и, следовательно, низком уровне системной токсичности [4,7]. При воспалительных заболеваниях легких частицы вещества, введенного путем ингаляции или инстилляций, распределяются преимущественно в центральных отделах дыхательных путей, тогда как проникновение этих частиц в периферические отделы легких существенно ограничено [6].

Возможный путь решения этой проблемы – использо-

вание препаратов экзогенного сурфактанта. Благодаря способности снижать поверхностное натяжение, последний может использоваться как средство доставки лекарственных препаратов, в том числе антибиотиков, в периферические отделы легких [5,11], где зачастую локализуется воспалительный процесс и существует предрасположенность к коллабированию альвеол. Тем не менее, до сих пор использование экзогенного сурфактанта в качестве средства доставки антибиотиков в дыхательные пути не нашло клинического применения. Одним из препятствий для внедрения этого метода в клиническую практику служит недостаток информации о совместимости и взаимном влиянии экзогенного сурфактанта и антибиотиков. Публикации, посвященные этой теме, крайне ограничены [3,9,10].

Цель работы

Определить, каким образом изменяются поверхностно активные свойства сурфактанта (в частности, его способность снижать поверхностное натяжение жидкости *in vitro*) под влиянием растворов некоторых антибиотиков, активных в отношении полирезистентных микроорганизмов – возбудителей госпитальной инфекции дыхательных путей.

Материалы и методы исследования

В исследовании использован препарат экзогенного сурфактанта Сузакрин (Докфарм, Симферополь, Украина), предназначенный для комплексного лечения бронхолегочных заболеваний, в том числе острых пневмоний и синдрома острого легочного повреждения (СОЛП) различной этиологии. Препарат представляет собой эмульсию очищенных фосфолипидов сурфактанта свиньи в физиологическом растворе. В состав эмульсии входит до 375 мг (76%) чистых фосфолипидов (1 мл эмульсии содержит 50 мг очищенных фосфолипидов сурфактанта). На долю дипальмитоилфосфатидилхолина приходится приблизительно 85% фосфолипидов. В 4 сериях эксперимента коммерческий препарат доводили до конечной концентрации фосфолипидов 20,6 мг/мл путем его разведения (реэмульгирования) в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия (NaCl; контроль) или в эквивалентном количестве растворов 3 антибиотиков в хлориде натрия (3 серии опытов). Приготовление опытных (с растворами антибиотиков) и контрольной (с физраствором) суспензий сурфактанта выполняли с соблюдением правил асептики непосредственно перед началом исследования.

Использовали следующие антибактериальные препараты, рекомендованные для лечения госпитальных инфекций органов дыхания: амикацин (Амицил, Киев-медпрепарат, Киев, Украина) из группы аминогликозидов (конечная концентрация в суспензии, содержащей сурфактант, 29,4 мг/мл), колистиметат натрия (Коломицин Инъекция, Forest Laboratories UK Ltd., Бексли, Великобритания) из группы полимиксинов (117647 МЕ/мл) и цефепим (Cefepime HCl, Nectar Lifesciences Ltd., Чандигарх, Индия) из группы цефалоспоринов IV поколения (58,8 мг/мл). Для стандартизации исследований и сбалансированного расчета количества или активности препаратов в экспериментальных суспензиях придерживались исходно заданных условий:

а) конечная концентрация сурфактанта должна быть одинаковой во всех 4 сериях, включая контрольную, для корректного статистического сравнения результатов;

б) количество или активность препаратов в 34 мл каждой суспензии (допустимый объем при интратрахеальном введении взрослому пациенту в течение суток) должны соответствовать средним суточным дозам, рекомендованным для взрослого мужчины массой 70 кг (фосфолипиды сурфактанта – 700 мг/сут, амикацин – 1000 мг/сут, колистиметат натрия – 4 000 000 МЕ/сут и цефепим – 2000 мг/сут.).

Вспомогательным целям служило определение

поверхностной активности (или визуальная оценка устойчивости пены) неразведенного препарата Сузакрин (содержание фосфолипидов 50 мг/мл) и рекомендованных для медицинского применения концентраций амикацина (167 мг/мл), колистиметата натрия (500 000 МЕ/мл) и цефепима (100 мг/мл), а также использованного растворителя (0,9% раствор NaCl). Таким образом, всего сформировано 3 серий, включая 3 опытных, контрольную и 5 вспомогательных.

Эксперимент проводили при температуре воздуха 26°C. Тестируемые суспензии, контрольные и вспомогательные пробы (по 5 образцов в каждой серии) подвергали вспениванию в стерильных пробирках при помощи одноразовых медицинских шприцев, оснащенных инъекционными иглами 0,6×30 мм (23 G). Вспенивание достигалось 3-кратной аспирацией и возвратом исследуемого материала в пробирку. При образовании устойчивой пены для оценки поверхностной активности использовали модифицированный метод Pattle [1], который позволяет охарактеризовать динамику силы поверхностного натяжения на границе раздела фаз газ-жидкость в соответствии с изменениями диаметра пузырьков воздуха. Для этого висячие капли полученной пены (по 5 в каждой серии) изучали в проходящем свете при помощи микроскопа Olympus BX40, оснащенного цифровой фотокамерой Olympus C3030-ADU, которую подключали к персональному компьютеру. Фотографирование (10×10) в каждой капле по одному полю зрения, равномерно заполненному пузырьками, осуществлялось в автоматическом режиме в течение 20 мин с интервалом 30 с. Таким образом, каждая повторность в серии включала 41 снимок, а каждая серия из 5 повторений – 205. Полученные снимки (всего 1230 кадров) анализировали при помощи программного продукта Olympus DP-Soft. На всех снимках каждой повторности маркировали и отслеживали изменения 20 произвольно выбранных пузырьков. Диаметр пузырьков (мкм) измеряли только в первом и последнем (сделанном спустя 20 мин) снимках. В целом проведено 1200 измерений пузырьков. Для каждой повторности рассчитывали индекс стабильности (ИС) по формуле:

$$ИС = \frac{\sum d_x^2}{\sum d_y^2},$$

где d_x – результат последнего измерения в серии (41-й снимок), а d_y – результат первого измерения.

Полученные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики с определением средних арифметических значений (M), стандартной ошибки (m) и уровня значимости различий (p) с помощью t -критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Предварительное исследование пенообразующих свойств официальной формы Сузакрина, антибиотиков в терапевтических концентрациях и их растворителя показало (табл. 1), что поверхностная активность выбранных для приготовления экспериментальных

Пенообразующие свойства исходных препаратов, включая диаметр пузырьков, возникающих при их вспенивании, и индекс стабильности

Показатели пенообразования и поверхностной активности	Препараты				
	суспензия сурфактанта (Сузакрин)	раствор колистиметата натрия	раствор амикацина	раствор цефепима	раствор NaCl
Свойства пены	стойкая, сохраняется >20 мин	стойкая, сохраняется >20 мин	нестойкая, исчезает через 5–7 с	нестойкая, исчезает через 10–15 с	пены не образует
Диаметр пузырьков, $M \pm m (n)$, мкм:					
(а) начало опыта	51,55±1,06 (100)	110,62±1,65 (100)	–	–	–
(б) конец опыта (через 20 мин)	47,46±0,94 (100)	87,54±2,27 (100)	–	–	–
разница между(а) и (б)	4,09±0,29 (100)	23,07±1,58 (100)	–	–	–
Индекс стабильности (ИС)	0,85±0,02 (5)	0,65±0,03 (5)	–	–	–

Примечание: $M \pm m (n)$ – среднее±стандартная ошибка среднего.

суспензий ингредиентов варьирует в широких пределах: от практически полного отсутствия способности вспениваться у физраствора до способности сурфактанта и колистиметата натрия формировать стойкую пену, которая сохранялась до 20 мин и более. При этом растворы амикацина и цефепима занимали хоть и промежуточное, но близкое к физраствору положение.

Пузырьки раствора колистиметата натрия по размеру значительно превосходили пузырьки суспензии сурфактанта как в начале ($p < 0,001$), так и в конце опыта ($p < 0,001$), причем их диаметр в течение опыта уменьшался на 21%, а сурфактанта – на 8% ($p < 0,001$). Величина ИС также свидетельствовала о существенно более высокой поверхностной активности сурфактанта, по сравнению с колистиметатом натрия ($p < 0,001$).

При сравнении свойств препарата Сузакрин до и после добавления к нему физиологического раствора установлено (табл. 1, 2), что уменьшение концентрации фосфолипидов сурфактанта в 2,4 раза (до 20,6 мг/мл против изначальных 50 мг/мл) не привело к существенному изменению поверхностной активности по показателю ИС ($p > 0,05$). Однако в начале и конце опыта диаметр пузырьков менее концентрированного препарата Сузакрин значительно превосходил диаметр пузырьков исходной суспензии сурфактанта ($p < 0,001$), что может

указывать на тенденцию к снижению поверхностной активности.

Экспериментальная суспензия «Сузакрин+амикацин» характеризовалась, по сравнению с контролем (табл. 2), меньшим диаметром пузырьков как в начале, так и в конце опыта ($p < 0,001$), а также значительно меньшей склонностью к сокращению размера пузырьков при 20-минутной экспозиции ($p < 0,001$). При этом ИС не претерпевал существенных изменений ($p > 0,05$), оставаясь на свойственном сурфактанту высоком уровне.

Суспензия «Сузакрин+цефепим» также сохраняла высокую поверхностную активность по показателю ИС ($p > 0,05$), но отличалась от контроля бóльшим диаметром пузырьков в начале опыта ($p < 0,01$) и несколько более выраженным или ускоренным уменьшением их размера ($p < 0,01$).

Между суспензией «Сузакрин+колистиметат натрия» и контрольной суспензией отсутствовала статистически существенная разница в первоначальном размере пузырьков ($p > 0,05$), но в конце опыта пузырьки экспериментальной суспензии значительно уступали в диаметре пузырькам сурфактанта ($p < 0,001$). Соответственно, тенденция к уменьшению размера пузырьков была более выраженной при добавлении антибиотика ($p < 0,001$). В данных условиях опыта отмечено значимое

Таблица 2

Показатели поверхностной активности экспериментальных суспензий, включающих Сузакрин и антибиотики

Показатели поверхностной активности	Сузакрин + физраствор (контроль)	Сузакрин + колистиметат натрия	Сузакрин + амикацин	Сузакрин + цефепим
Диаметр пузырьков, $M \pm m (n)$, мкм:				
(а) начало опыта	77,98±2,03 (100)	83,23±3,23 (100)	56,04±2,01 (100)	86,55±2,17 (100)
(б) конец опыта (через 20 мин)	67,35±1,56 (100)	53,52±3,14 (100)	51,45±2,12 (100)	70,20±1,86 (100)
разница между (а) и (б)	10,62±1,18 (100)	29,71±2,23 (100)	4,59±0,62 (100)	16,34±1,33 (100)
индекс стабильности (ИС)	0,76±0,04 (5)	0,49±0,06 (5)	0,85±0,05 (5)	0,67±0,04 (5)

Примечание: $M \pm m (n)$ – среднее±стандартная ошибка среднего.

снижение ИС как по сравнению с контролем ($p < 0,01$), так относительно исходных для препарата сурфактанта ($p < 0,001$) и раствора колистиметата натрия ($p < 0,05$).

Результаты исследования свидетельствуют, что способность сурфактанта снижать поверхностное натяжение жидкости существенно не изменялась при добавлении к суспензии амикацина и цефепима. В то же время, при смешивании суспензии сурфактанта с раствором колистиметата натрия зарегистрировано явное подавление поверхностной активности. Этот эффект может быть связан с особенностями взаимодействия колистиметата натрия с фосфолипидами, входящими в состав сурфактанта. Известно, что антибактериальная эффективность колистиметата натрия связана с его способностью разрушать двойной слой фосфолипидов оболочки бактериальных клеток [8]. Не исключено, что аналогичным образом этот антибиотик действует и на сурфактант, по меньшей мере, *in vitro*.

Возможность взаимодействия между экзогенным сурфактантом и антимикробными препаратами впервые показана в работах van 't Veen A. и соавт. [9,10]. Функция сурфактанта не изменялась при добавлении цефтазидима и пентамидина, тогда как при смешивании с амфотерицином В и амоксициллином наблюдалось угнетение поверхностно активных свойств. Снижение активности сурфактанта в смеси с тобрамицином происходило в тех случаях, когда в качестве растворителя использовался 0,9% NaCl, однако этого не отмечалось, если тобрамицин смешивали с суспензией сурфактанта в 0,2 М NaHCO₃ [10].

Лечение госпитальной инфекции дыхательных путей представляет сложную задачу, решение которой, помимо совершенствования существующих схем терапии, предполагает внедрение в клиническую практику новых лечебных мероприятий. Использование сурфактанта в качестве средства доставки антибиотиков в очаг инфекции является одним из перспективных направлений. Данное исследование позволило определить, что в смеси с амикацином и цефепимом поверхностная активность сурфактанта не снижается, тогда как после смешивания с колистиметатом натрия поверхностно активные свойства сурфактанта и антибиотика подавляются. Таким образом, для дальнейшего изучения микробиологической эффективности экспериментальных суспензий и для проведения модельных опытов на лабораторных животных более уместным следует считать использование композиций Сузакрина с амикацином и цефепимом. Сочетание Сузакрина с колистиметатом натрия (Коломицин инъекция, Forest Laboratories UK Ltd.) представляется нецелесообразным, в связи установленной фармакологической несовместимостью препаратов.

Выводы

1. Добавление к суспензии препарата Сузакрин терапевтических концентраций амикацина и цефепима не приводит к снижению поверхностной активности первого *in vitro*, что позволяет рекомендовать композиции экзогенного сурфактанта и этих антибиотиков для дальнейших доклинических испытаний.

2. Добавление к Сузакрину терапевтической дозы колистиметата натрия сопровождается значительным снижением поверхностной активности обоих препаратов, что свидетельствует об их фармакологической несовместимости при суспендировании в одном объеме.

3. Дальнейшее испытание экспериментальных суспензий Сузакрина и антибиотиков, активных в отношении полирезистентных возбудителей госпитальной пневмонии, должно включать сравнительное исследование антибактериальных свойств и оценку эффективности суспензий при моделировании воспалительных процессов в легких у лабораторных животных.

Литература

1. *Zavaliy M.A.* Метод оценки эффективности применения бронхоальвеолярного защитного комплекса при лечении острого гнойного синусита в условиях эксперимента / *Zavaliy M.A., Balabanov A.G., Zagorulyko A.K.* и др. // Журнал ушных, носовых и горловых хвороб. – 2008. – №5-с. – С. 68–69.
2. *Baldwin D.R.* Pulmonary disposition of antimicrobial agents: *in vivo* observations and clinical relevance / *Baldwin D.R., Honeybourne D., Wise R.* // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1992. – Vol. 36 (6). – P. 1176–1180.
3. *Caldwell E.J.* Influence of a pulmonary surfactant on the *in vitro* activity of tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa* / *Caldwell E.J., Piper D.S.* // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1999. – Vol. 43 (12). – P. 3044.
4. *Clemente Bautista S.* Administration of anti-infective agents through the inhaled route / *Clemente Bautista S., Fernández Polo A., Gil Luján G.* et al. // *Farm Hosp.* – 2007. – Vol. 31(2). – P. 112–119.
5. *Haitsma J.J.* Exogenous surfactant as a drug delivery agent / *Haitsma J.J., Lachmann U., Lachmann B.* // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2001. – Vol. 47 (2–3). – P. 197–207.
6. *Laube B.L.* Homogeneity of bronchopulmonary distribution of 99mTc aerosol in normal subjects and in cystic fibrosis patients / *Laube B.L., Links J.M., LaFrance N.D.* et al. // *Chest.* – 1989. – Vol. 95 (4). – P. 822–830.
7. *Luyt C.E.* Aerosolized antibiotics to treat ventilator-associated pneumonia / *Luyt C.E., Combes A., Nieszkowska A.* et al. // *Curr Opin Infect Dis.* – 2009. – Vol. 22 (2). – P. 154–158.
8. *Mestres C.* Interaction of colistin with lipids in liposomes and monolayers / *Mestres C., Alsina M.A., Busquets M.A.* et al. // *Int J Pharm.* – 1998. – Vol. 160 (1). – P. 99–107.
9. *van 't Veen A.* Influence of pulmonary surfactant on *in vitro* bactericidal activities of amoxicillin, ceftazidime, and tobramycin / *van 't Veen A., Mouton J.W., Gommers D.* et al. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1995. – Vol. 39 (2). – P. 329–333.
10. *van 't Veen A.* Exogenous pulmonary surfactant as a drug delivering agent: influence of antibiotics on surfactant activity / *van 't Veen A., Gommers D., Mouton J.W.* et al. // *Br J Pharmacol.* – 1996. – Vol. 118(3). – P. 593–598.
11. *Vermehren C.* Lung surfactant as a drug delivery system / *Vermehren C., Frokjaer S., Aurstad T., Hansen J.* // *Int J Pharm.* – 2006. – Vol. 307 (1). – P. 89–92.

Сведения об авторе:

Биркун А.А. третий, клинический ординатор, каф. медицины неотложных состояний с курсом анестезиологии КГМУ им. С.И. Георгиевского.

Адрес для переписки:

Биркун Алексей Алексеевич третий. г. Симферополь, ул. Калинина, 51, кв. 1.
E-mail: HuskyGo@gmail.com.