

ОМАРОВ ЕРКЕН АБУГАЛИЕВИЧ

**Коррекция транспорта антибиотиков
в изолированные клетки периферической крови
ВИЧ-инфицированных лиц**

14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Республика Казахстан
Актобе, 2006

Работа выполнена в Западно-Казахстанской государственной медицинской академии им. Марата Оспанова Министерства здравоохранения Республики Казахстан

Научный руководитель: академик НАН РК,
Лауреат Государственной премии,
доктор медицинских наук, профессор
Кузденбаева Р.С.

Научный консультант: доктор медицинских наук,
профессор
Козаченко Н.В.

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
профессор
Ермекбаева Б.А.

доктор медицинских наук,
Нургожин Т.С.

Ведущая организация: Казахский национальный медицинский
университет им. С.Д.Асфендиярова

Защита состоится «___» _____ 2007 года в ___ часов на заседании
диссертационного совета К 09.04.01 при Западно-Казахстанской
государственной медицинской академии им. Марата Оспанова по адресу:
030019, г.Актобе, ул. Маресьева 68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Западно-Казахстанской
государственной медицинской академии им. Марата Оспанова

Автореферат разослан «___» _____ 2006 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук

Адайбаев Т.А.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Известно, что мишень химиотерапевтических противомикробных препаратов может располагаться не только во внеклеточном пространстве, но и во внутриклеточной среде [Serafim L.S., Lemos P.C., Levantesi C. 2002; Belyi I.F., 2002]

Проникновение патогенных бактерий в организм во многих случаях сопровождается их внедрением в клетки тканей хозяина. Это происходит либо активно, в соответствии с биологическими свойствами возбудителя, либо в результате поглощения бактерий клетками, способными к фагоцитозу. Значительное число микроорганизмов, обычно рассматриваемых как внеклеточные, могут находиться, переживать и даже размножаться внутри фагоцитов, проявляя устойчивость к действию клеточных и гуморальных противомикробных факторов [Portnoy D.A., Auerbuch V., Glomski I.J., 2002; Young D., Hussell T., Dougan G., 2002]. Дефекты иммунитета по фагоцитарному звену, характеризующиеся неспособностью полиморфноядерных лейкоцитов уничтожать бактерии, проявляются как инфекции с внутриклеточной локализацией [Orudjev E., Lange B.J., 2005]. Типичная ситуация складывается при ВИЧ инфицировании [McNabb J., Owens R.C., Xuan D., et al., 2000; Jaruratanasirikul S., Sriwiriyaajan S., 2001; Jason J., Inge K.L., 2001]. Снижение хемотаксиса и отсутствие завершенности фагоцитоза вследствие уменьшения продукции супероксидов при ВИЧ инфицировании являются факторами, предрасполагающими к развитию внутриклеточных инфекций [Kuritzkes D.R., 2001]. Несмотря на беспрецедентные успехи в терапии ВИЧ инфекции, СПИД остается главной мировой проблемой здравоохранения, оставаясь первой причиной смерти в Африке и четвертой ведущей причиной смерти во всем мире вследствие осложнений, связанных с внутриклеточным инфицированием [Pani A., Loi A.G., Mura M. et al., 2000]. Пролонгирование и рецидив инфекции, формирование хронических форм и бактерионосительство во многих случаях прямо связано с локализацией возбудителей в лейкоцитах крови, клетках печени, макрофагах костного мозга, элементах РЭС, в селезенке и лимфоузлах [Kuwata K., Yamada S., Tsuda H., et al., 2001]. Лечение инфекций с внутриклеточной локализацией возбудителей составляет одну из самых трудных проблем современной антибиотикотерапии [Hiemstra P.S., 2001]. Антибиотики при лечении СПИД-ассоциированных инфекций имеют гораздо меньший эффект, чем можно было бы ожидать [Eckert L.O., Watts D.H., Thwin S.S., 2003; Benson C.A., Williams P.L., Currier J.S., et al., 2003].

Это наглядно проявляется, например, при лечении туберкулеза у ВИЧ инфицированных детей [Chintu C., Mwaba P., 2005] и взрослых [Padmapriyadarsini C., Swaminathan S., 2005].

Внутриклеточно локализующиеся бактерии, в той или иной мере защищены от действия многих противомикробных средств и нередко сохраняют жизнеспособность после контакта с несомненно летальными для внеклеточных микроорганизмов концентрациями антибиотиков. В связи с этим, одной из причин несовпадения между степенью чувствительности бактерий и лечебной эффективностью этих препаратов является существенное изменение условий

взаимодействия микроорганизма и лекарственного средства во внутриклеточной среде [Portnoy D.A., Auerbuch V., Glomski I.J., 2002]. Необходимость рационального выбора антибиотиков при внутриклеточной локализации патогенных бактерий и потребность в достижении оптимального клинического эффекта заставляет учитывать параметры клеточной фармакокинетики антибиотиков. Внутриклеточная среда является мощным модифицирующим фактором в отношении эффекта препаратов. Можно выделить следующие факторы, обеспечивающие «защиту» бактерий, находящихся во внутриклеточной среде, от действия противомикробных препаратов: а) система мембран, включая плазматическую, эндоплазматические мембраны фаголизосом или окружающих бактерий; б) особенности внутриклеточного распределения лекарственного вещества среди внутриклеточных компонентов; в) рН микроучастков цитоплазмы, в которых находятся бактерии; г) особыми условиями существования бактерий, меняющими чувствительность их к антибиотикам; д) негативные последствия взаимодействия ряда антимикробных препаратов с естественными защитными системами клетки [Kent J.R., Almond M.K., Dhillon S., 2001]. Недостаточная степень проникновения антибиотиков через плазматические мембраны клеток является одним из основных лимитирующих факторов для эффекта антибиотиков при внутриклеточной локализации бактерии. Особенности этого процесса в условиях патологии, в частности ВИЧ-инфицирования, недостаточно изучены для прикладного использования этих данных. Параметры клеточной фармакокинетики антибиотиков в отношении фагоцитирующих клеток при ВИЧ инфицировании к настоящему времени не описаны, что существенно затрудняет выбор препаратов и режимов их использования.

Цель исследования

Изучить параметры взаимодействия антибиотиков с лейкоцитами ВИЧ инфицированных и установить возможности целенаправленной коррекции для повышения уровня активности препаратов в биофазе.

Задачи исследования

1) Изучить количественные характеристики связывания антибиотиков лейкоцитами периферической крови здоровых добровольцев.

2) Изучить количественные характеристики связывания антибиотиков лейкоцитами периферической крови ВИЧ инфицированных.

3) Определить возможность фармакокинетического взаимодействия антиретровирусных препаратов с противобактериальными антибиотиками на этапе проникновения последних в лейкоциты.

4) Определить влияние потенциальных корректоров связывания антибиотиков лейкоцитами: АТФ, протосубтилина, лизоцима колониестимулирующего фактора на проникновение антибиотиков в лейкоциты здоровых добровольцев и при ВИЧ инфицировании.

5) Определить возможность использования наночастиц поли-н-бутилцианоакрилата как транспортной системы ассоциированных с ними антибиотиков для увеличения количественных показателей связывания антибиотиков лейкоцитами ВИЧ инфицированных лиц.

Научная новизна работы

Впервые проведено изучение и описание количественных характеристик связывания антибиотиков (ампициллин, гентамицин, наночастицы, ассоциированные с ампициллином и гентамицином, цефтриаксон, рифампицин, доксицилин, эритромицин, азитромицин) изолированными лейкоцитами крови ВИЧ инфицированных. При этом установлен феномен нарушения (снижение) проникновения антибиотиков в полиморфноядерные лейкоциты и лимфоциты при ВИЧ инфицировании. Не установлено выраженного влияния антиретровирусного препарата зидовудин на процесс связывания антибиотиков изолированными лейкоцитами ВИЧ инфицированных. Изучена и доказана возможность коррекции (повышения) количественных характеристик связывания антибиотиков лейкоцитами здоровых людей и ВИЧ инфицированных в системе *in vitro* при добавлении в среду инкубации фармакологических субстанций – протосубтилина, лизоцима, АТФ, колониестимулирующего фактора. Установлено, что наночастицы поли-н-бутилцианоакрилата могут выполнять роль транспортной системы для доставки ассоциированных с ними антибиотиков (ампициллин или гентамицин) в изолированные лейкоциты, как здоровых людей, так и ВИЧ инфицированных.

Основные положения, выносимые на защиту

1) При ВИЧ инфицировании способность лейкоцитов связывать антибиотики снижается.

2) Антиретровирусный препарат зидовудин существенно не меняет связывания антибактериальных антибиотиков лейкоцитами здоровых добровольцев и ВИЧ инфицированных.

3) Поступление антибиотиков в лейкоциты здоровых людей и ВИЧ инфицированных может быть увеличено в присутствии биологически активных фармакологических субстанций – протосубтилин, АТФ, лизоцим, колониестимулирующий фактор и с помощью полимерных наночастиц.

Практическая значимость

Снижение способности антибиотиков проникать в лейкоциты при ВИЧ инфицировании может являться дополнительным объяснением затруднений в химиотерапии. Полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения в клинике исследования корректоров связывания антибиотиков лейкоцитами при ВИЧ инфицировании в случае возникновения системных инфекций с внутриклеточной локализацией возбудителей.

Внедрение в практику

Результаты работы внедрены в курс лекций кафедры фармакологии ЗКГМА им.М.Оспанова при изучении темы «Противовирусные средства».

Апробация работы

Основные положения работы доложены на XIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2006); Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2006); I научно-практической конференции «Клинические исследования лекарственных средств в Украине» (Киев, 2006); научном семинаре Национального центра биотехнологий Республики Казахстан (Астана, 2006); расширенном научном межкафедральном заседании кафедр

фармакологии, биохимии, микробиологии, нормальной физиологии ЗКГМА им.М.Оспанова (Актобе, 2006).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа написана на русском языке, изложена на 91 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных данных, заключения, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 30 таблицами и 23 рисунками. Указатель литературы включает 183 источников, в том числе 35 на русском и 148 на иностранных языках.

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы ЗКГМА им. М.Оспанова «Фармакоэпидемиология и фармакоэкономика лекарственных средств, применяемых в клинической практике», номер государственной регистрации 01 05 РК 00079.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на лейкоцитах периферической крови людей: здоровых добровольцев в возрасте 19-45 лет – 21 человек (14 мужчин и 7 женщин); ВИЧ инфицированные в стадии II - 8 человек (6 мужчин и 2 женщины, возраст 21-34 года); ВИЧ инфицированные в стадии III – 10 человек (7 мужчин и 3 женщины, возраст 17 – 31 год). Использовались следующие препараты: ампициллина натриевая соль («Синтез», Россия); гентамицина сульфат (гентамицин К, KRKA Словения); рифампицин (рифампицин, Акрихин, Россия), эритромицин (эритромицина фосфат, Россия); азитромицин (азитромицин, KRKA, Словения); цефтриаксон (Роцефин, F.Hoffmann-La Roche); доксицилин (вibraмицин, Polfa, Польша); препарат гентамицина, связанный с поли-н-бутилцианоакрилатными наночастицами; препарат ампициллина, связанный с поли-н-бутилцианоакрилатными наночастицами; протосубтилин (НИИ фармацевтической биотехнологии, Степногорск, Казахстан); АТФ (аденозин-5-(тетрагидрогентрифосфат) в виде натриевой соли, Здоровье народа, Украина); лизоцим (Cerato, Италия); колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (Молграмостим - Лейкомакс); зидовудин – антиретровирусный препарат (азидотимидин, РФ).

Периферическую венозную кровь собирали в силиконированные пробирки (20 мл) путем венепункции здоровых добровольцев обоего пола в возрасте 19–45 лет и ВИЧ инфицированных лиц во II и III стадии процесса, обоего пола в возрасте 18-34 лет. Осаждение эритроцитов ускоряли добавлением полиглюкина (6%) и выдерживали около 1 часа при комнатной температуре. Разделение лейкоцитов на фракции гранулоцитов и агранулоцитов с последующим делением последних на субфракции лимфоцитов и моноцитов проводили с использованием Ficoll-Paque Pharmacia (Pharmacia AB, Uppsala Sweden) согласно стандартной методике по A. Boyum.

К выделенным лейкоцитарным фракциям – агранулоцитам – лимфоцитам и гранулоцитам - полиморфноядерным лейкоцитам исследуемые антибиотики

подводили *in vitro* в условиях асептики. Инкубацию клеток с препаратами проводили в среде RPMI с добавлением 0,1% желатины и 5% сыворотки крови при 37[±]С (объем взвеси 1мл). Концентрации тестируемых антибиотиков подбирали в соответствии со средним терапевтическим уровнем, создающимся обычно в сыворотке крови, ориентируясь на пособие «Фармакокинетика химиотерапевтических препаратов», справочник «Рациональная антибиотикотерапия». В исследуемой системе лимфоциты были в количестве 2 млн, полиморфноядерные лейкоциты - 4 млн, легочные макрофаги - 5 млн (в среднем). Число клеток подсчитывали в камере Горяева, параллельно контролировали по белку. Инкубацию проводили в пластиковых пробирках в термостатируемом встряхивателе. В процессе инкубации жизнеспособность клеток контролировали по тесту с трипановой синью. В инкубационную систему добавляли (одновременно с антибиотиками во всех случаях и за 30 минут до антибиотика в случае с колониестимулирующим фактором) следующие фармакологические субстанции – АТФ (5 μ М), лизоцим (5 мкг/мл), протосубтилин (1 ЕД/мл), колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (1мкг/мл). Отделение клеток от внеклеточной жидкости проводили фильтрацией через мембранные фильтры Millipore, тип SM (3 мкм - 5 мкм - 8 мкм). Концентрацию антибиотика определяли в клеточном лизате и в фильтрате. Расчет показателя связывания антибиотика клетками определяли, относя концентрацию препарата в клетках (К) к внеклеточной (В) - коэффициент распределения К/В. Для определения соотношения клеточной и внеклеточной фаз лейкоцитарного осадка на фильтре использовали метод, описанный G. L. Mandell. Концентрацию антибиотиков в биосредах определяли методом диффузии в агар. Активность гентамицина определялась на питательной среде рН - 7,8-8,0 с тест-культурой *Bac. subtilis* ATCC 6633, 40 млн./мл. Активность ампициллина определялась на питательной среде рН - 7,0-7,2 с тест-культурой *Staphylococcus aureus* 209 P, 20 млн./мл. Активность цефтриаксона с тест-культурой *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, 30 млн./мл. на питательной среде рН - 7,0-7,2. Активность рифампицина – с тест-культурой *Bac. subtilis* ATCC 6633, 30 млн./мл, на питательной среде рН - 6,0-6,2. Активность эритромицина и азитромицина – с тест-культурой *Micrococcus luteus* ATCC 9341, на питательной среде рН - 7,8-8,0. Активность доксициклина с тест-культурой – L₂ при рН - 6,8-7,0.

Во всех случаях рассчитывали среднюю арифметическую величину (X), как частное от деления суммы вариантов (i) на их количество (n), и стандартную ошибку среднего арифметического значения при уровне вероятности p=95%.

Результаты исследования и их обсуждение

В фармакологии и химиотерапии известно, что терапевтический потенциал большинства лекарственных веществ лимитируется концентрацией в биофазе [Навашин С.М., 1995]. Лекарство распределяется в организме в соответствии со своими физико-химическими свойствами и, обычно, лишь небольшое количество препарата достигает своей мишени. Наиболее вероятный путь воздействия: *антибиотик - организм - бактерия*.

Возможность достижения антибиотиком своей терапевтической мишени особенно снижена при локализации бактерий во внутриклеточной среде

организма [van den Broeck, 1995]. Известно, что внутри клеток макроорганизма способны размножаться *Mycobacteria*, *Chlamydia*, *Listeria*, *Toxoplasma*, *Rickettsia*, *Esherlichia*, способны сохранять патогенность во внутриклеточной среде *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Streptococcus B* и другие возбудители [Maurin M., Raoult D., 1996]. Внутриклеточное инфицирование типичная и существенная особенность инфекции на фоне иммунодефицита для *Mycobacterium avium*, *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, *Legionella* [Torlkovic E., 1995].

Бактериальные инфекции на фоне синдрома приобретенного иммунодефицита характеризуются одним или несколькими из перечисленных признаков [Резник И.Б., 1998]: мультифокальностью инфекции; высокой частотой и склонностью к хронизации; плохим ответом на стандартную антибактериальную терапию; необычными (оппортунистическими) возбудителями.

Основной особенностью течения бактериальной инфекции при персистенции HIV является, безусловно, внутриклеточная локализация возбудителя [Meltzer M.S., Skillman D.R., 1990]. Сложности терапии связаны в первую очередь с очевидным фактом – низкая доступность патогена для противобактериального средства. Внутриклеточная локализация возбудителей в чрезвычайно затрудняет действие большинства противобактериальных средств [Coombes V.K., Johnson D.L., Mahony J.V., 2002]. Находясь в клетках макроорганизма, в том числе и в фагоцитах, бактерии во многих случаях не только сохраняют свою жизнеспособность, но и защищены от воздействия антибиотиков [Кивман Г.Я., Гуляев А.Е., 1988]. Во всех случаях присутствие бактерий в клетках организма обычно ассоциируется с угрожающим, непредсказуемым прогнозом [Couvreur P., Alphanary H. 2001, 2004], особенно при классическом синдроме приобретенного иммунодефицита, вызванного вирусом иммунодефицита человека [Hammerschlag M.R., 2002]. Очевидно, следует согласиться с мнением А.Е. Гуляева и Г.Я. Кивмана [1992, 1994], что в случаях, когда биофазой является внутриклеточная среда организма эффект антибиотиков зависит от степени проникновения препарата внутрь клетки, его внутриклеточной локализации, метаболизма и от влияния специфической внутриклеточной микросреды на его активность. Т.е. при внутриклеточной локализации инфекции прогноз химиотерапевтического эффекта, в первую очередь, должен строиться на основе анализа данных клеточной фармакокинетики и способности препаратов проникать внутрь клеток. Клеточная фармакокинетика антибиотиков – раздел интенсивно развивающейся фармакологии, содержащий большое количество нерешенных вопросов. Если в ряде работ констатируется наличие существенных особенностей общей фармакокинетики и фармакодинамики противобактериальных антибиотиков больных СПИДом и ВИЧ инфицированных [Gatti G., 1999; Jordan M.K., Polis M.A., 2000; Amsden G., Flaherty J., Luke D., 2001], то характерные черты распределения антибиотиков на клеточном уровне практически не описаны. Необходимо отметить, что к настоящему времени установить какие-либо особенности клеточной фармакокинетики противобактериальных препаратов на фоне ВИЧ– инфицирования по доступной нам литературе не обнаружено.

Настоящая работа посвящена определению особенностей в клеточной фармакокинетике антибиотиков при ВИЧ–инфицировании, а также поиску возможных путей коррекции проникновения препаратов во внутриклеточную среду организма.

Нами были получены количественные показатели, характеризующие способность ряда антибиотиков проникать в полиморфноядерные лейкоциты и лимфоциты периферической венозной крови здоровых взрослых людей. Были исследованы следующие антибиотики: ампициллин, гентамицин, цефтриаксон, доксициклин, рифампицин, эритромицин, азитромицин. Препараты обладают различными химическими свойствами и различными механизмами транспорта через плазматические мембраны. Определение уровня связывания выбранных препаратов лейкоцитами позволило установить, что эти показатели для полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов достоверно не различаются. Ампициллин в свободной форме связывается лейкоцитами в минимальной степени, показатель отношения уровня внутриклеточной концентрации к внеклеточной меньше 0,1. Несколько большим был показатель связывания гентамицина – до 0,3. Для цефтриаксона установлено, что этот антибиотик более свободно поступает в клетки, соотношение концентрации внутри и вне лейкоцитов составляет до 0,6. Показатель проникновения в клетки доксициклина свидетельствует, что этот антибиотик свободно распределяется во внутриклеточном пространстве – до 1. Рифампицин по данным, полученным в условиях нашего эксперимента, накапливается внутри лейкоцитов – показатель проникновения около 4. Макролиды, представленные в работе, отличаются выраженной тенденцией к депонированию во внутриклеточной среде. Так показатель проникновения в лейкоциты для эритромицина нами определен в 10 – 11, а для азитромицина – до 18-20.

Данные, по проницаемости плазматических мембран лейкоцитов здоровых людей, полученные в условиях нашего эксперимента, в целом согласуются с известными литературными сведениями [Гуляев А.Е., Кивман Г.Я., 1990; Van der Auwera P., Prinz G., Petrikos G., 1991; Mandell G.L., 2002].

Результаты наших экспериментов подтверждают различную способность антибиотиков проникать внутрь лейкоцитов, а это в свою очередь, приводит к различной внутриклеточной концентрации препаратов. Это будет отражаться на фармакологическом эффекте. Наименьшим эффектом в ряду исследованных антибиотиков обладали ампициллин и гентамицин.

К настоящему времени предпринимаются многочисленные попытки увеличить проникновение лекарств во внутриклеточную среду путем воздействия на транспортные системы.

Наиболее изученными из транспортных систем являются полимерные наночастицы, доставляющие связанные с ними лекарства в клетки способные к пино или фагоцитозу [Couvreur P., Fattal E., Andremon A., 1992, Kreuter J., 1994] Этот способ использовался в настоящем исследовании. Поли-н-бутилцианоакрилатные наночастицы, содержащие ампициллин и гентамицин были специально изготовлены для данных экспериментов. Тестирование ампициллина и гентамицина ассоциированных с наночастицами, на лейкоцитах здоровых людей имело своим результатом значительное (от 7-13 раз для

ампициллина и до 5 раз – для гентамицина) увеличение показателя связывания антибиотиков клетками. Наночастицы, содержащие ампициллин или гентамицин, как видно, захватывались лейкоцитами в значительных количествах и уровень антибиотиков, высвобождающихся из полимерных частиц после их биодegradации во внутриклеточной среде, повышался в несколько раз против того, который мог создаваться при поступлении свободного антибиотика. Эти данные позволяют утверждать, что наночастицы можно использовать в качестве транспортной системы для доставки ампициллина или гентамицина в изолированные лейкоциты человека (как полиморфноядерные, так и в лимфоциты). Результаты, полученные в условиях нашего эксперимента, относительно характеристик, как в принципе, так и по численным значениям сходны с ранее описанными, например, в работах А.Ю. Шерстова, Б.А. Ермакбаевой и Э.К. Таирова [1997, 2002]. Это обстоятельство увеличивает степень достоверности фактических данных и позволяет прогнозировать вероятность получения подобных результатов не только в экспериментах с клетками здоровых людей, но и при патологии.

Другим способом, увеличения проницаемости плазматических мембран лейкоцитов для антибиотиков, использованным в условиях наших экспериментов, является попытка воздействия на процесс связывания биологически активных веществ, добавляемых в систему инкубации клеток с антибиотиками. В качестве корректоров связывания испытывали АТФ, лизоцим, протеолитический фермент имозимазу (протосубтилин), препарат колониестимулирующего фактора молграмастин. Выбор этих биологически активных соединений основывался на их биохимических свойствах и их роли в метаболизме [Пивень Л.И., 2001, Uetrecht J.P., 1994]. Известны сведения по фармакологии АТФ, позволяющие предполагать возможность значительного изменения проницаемости клеточных мембран при избытке этого вещества в питательной среде при изоляции лейкоцитов и макрофагов [Gandhi V., 2003]. Вовлечение лизоцима в связывание антибиотиков субклеточными структурами аппарата Гольджи [Sandoval R.M., Bacallao R.L., Dunn K.W., 2003] также может служить основанием для апробации этой субстанции в качестве корректора нарушенного связывания антибиотиков лейкоцитами.

В условиях наших экспериментов установлено, что присутствие в среде инкубации указанных фармакологических соединений может существенно увеличивать показатель связывания отдельных антибиотиков лейкоцитами. Так, АТФ, воздействуя на процессы транспорта через плазматические мембраны лейкоцитов, стимулирует переход в полиморфноядерные лейкоциты и лимфоциты гидрофильных антибиотиков - ампициллина (на 35-37%, соответственно для нейтрофилов и лимфоцитов), гентамицина (на 15-45%), цефтриаксона (25-13%). Поскольку, все указанные антибиотики транспортируются через плазматические мембраны с помощью механизма пассивной диффузии, то, можно предполагать воздействие АТФ на липидно-белковую конформацию мембран или их микровязкость. Увеличение связывания ампициллина, гентамицина, эритромицина и линкомицина клетками крови (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты вместе) *in vitro* в присутствии АТФ было обнаружено Л.И. Пивень [2002]. Установленные факты

позволяют утверждать, что АТФ, находясь во внеклеточной питательной среде *in vitro* может стимулировать транспорт гидрофильных антибиотиков через плазматические мембраны лейкоцитов человека. Сопоставление результатов по связыванию антибиотиков изолированными лейкоцитами и всеми клетками крови одновременно, позволяет предположить, что в процессе связывания антибиотиков клетками крови решающую роль играют именно лейкоциты.

Известно, что полимерные наночастицы проникают в клетки путем пиноцитоза [Kreuter J., 1994]. Можно предполагать, что присутствие АТФ в среде инкубации активирует и этот путь транспорта, поскольку мы получили в экспериментальных условиях увеличение показателей поглощения наночастиц полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами, содержащих ампициллин и гентамицин на 17-20%. Есть основания утверждать, что АТФ способствует более интенсивному проникновению гидрофильных антибиотиков через плазматические мембраны лейкоцитов и стимулирует пиноцитоз наночастиц. В качестве одного из объяснений полученного феномена можно принять гипотезу активации эндогенной АТФ цитохрома С в митохондриях с увеличением потока Ca^{++} , приводящего к усилению интрамитохондриального связывания антибиотиков и, вследствие последнего – к повышению клеточной сорбционной способности в отношении гидрофильных препаратов [Duan L., Gan H., Golan D.E., 2002].

Влияние лизоцима на процессы поступления антибиотиков через плазматические мембраны лейкоцитов внутрь полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов выражено в меньшей степени. Нам удалось зафиксировать возрастание показателей связывания для двух липофильных антибиотиков транспортирующихся путем пассивной диффузии – рифампицина (на 17-21%) и доксициклина (на 36-15%). Функция лизоцима (фермент мурамидаза), как одного из основных компонентов системы неспецифического иммунитета, известна [Кивман Г.Я., Балынь И.Р., Калинина Н.А, 1972]. Однако, в данном случае, видимо, эндогенный лизоцим в среде инкубации выполняет ферментативные функции либо на уровне клеточных мембран, либо на уровне сорбирующих антибиотика субклеточных компонентов, облегчая пассивный транспорт антибиотиков.

В условиях нашего эксперимента нам удалось определить и влияние ферментного препарата протосубтилина на процесс связывания антибиотиков лейкоцитами. Установлено, что протеолитический фермент протосубтилин увеличивал поступление во внутриклеточную среду лейкоцитов липофильных рифампицина (на 22-45%, для полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов, соответственно) и доксициклина (на 43-51%), проникающих путем пассивной диффузии и, в меньшей степени присутствие протосубтилина отражалось на количестве эритромицина (рост на 12-14%) и азитромицина (увеличение в среднем на 11% для обоих типов клеток), поступающих в клетки путем активного энергозависимого транспорта. Считается, например, что азитромицин является лизосомотропным антибиотиком и в его проникновении через клеточные мембраны предполагается активный транспортный механизм и частично – пиноцитоз [Tyteca D., Van Der Smissen P., Mettlen M., et al., 2002]. В данном случае можно предполагать, что протосубтилин либо активирует

транспортные мембранные системы для макролидов, либо стимулирует пиноцитоз, либо оба эти процесса одновременно, но в разной степени. Протосубтилин является иммобилизованным протеолитическим ферментом бактериального происхождения. Относительно протеолитического фермента – трипсина, в частности, известно его свойство увеличивать уровень концентрации совместно назначаемых с ними антибиотиков в биофазе, даже в тех случаях, когда таковой является внутриклеточное пространство [Кивман Г.Я., Рудзит Э.А., Яковлев В.П., 1982]. Очевидно, протосубтилин, также сохраняет в этом отношении свойства остальных протеолитических ферментов.

Предварительное (за 30 минут) внесение макрофагально-гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в среду инкубации лейкоцитов и антибиотиков, видимо, приводит к стимуляции механизмов захвата полимерных наночастиц, содержащих антибиотики. В условиях нашего эксперимента уровень ампициллина и гентамицина во внутриклеточной среде полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов здоровых людей после введения колониестимулирующего фактора возрос на 30-40% за счет более интенсивного поглощения клетками полимерных наночастиц, содержащих эти антибиотики. Процесс связывания клетками свободных антибиотиков, представленных в исследовании – ампициллин, гентамицин, цефтриаксон, эритромицин, доксициклин, рифампицин или азитромицин, - не реагировал количественными изменениями на эффект присутствия колониестимулирующего фактора в среде инкубации. Полученные нами изменения относятся только к антибиотикам в форме полимерных наночастиц. Известно, что колониестимулирующие факторы как *in vivo* так и *in vitro* неизменно демонстрируют способность увеличивать активность пиноцитоза и фагоцитоза, т.е. эндоцитоза, вообще [Sarkar CA, Lauffenburger DA. 2003]. А биосовместимые полимерные наночастицы, использованные в условиях нашего эксперимента для переноса антибиотиков, как известно, поступают во внутриклеточную среду почти исключительно путем фаго или пиноцитоза [Гуляев А.Е., Рахимов К.Д., Скидан И.Н., 2000; Couvreur P., Fattal E., Andremont A., 1991]. Стимуляция процессов лейкоцитов должна привести к повышению уровня антибиотиков во внутриклеточной среде, поступающих туда в составе фагоцитируемых наночастиц, что и зафиксировано нами.

Сходные результаты – увеличение степени поглощения некоторых антибиотиков, в частности антибиотиков, ассоциированных с полимерными наночастицами поли-н-бутилцианоакрилата в присутствии молграмостима получены для перитонеальных и альвеолярных макрофагов в работах А.Ю.Швечихина [2003, 2004].

Резюмируя результаты, полученные в экспериментах по исследованию связывания антибиотиков лейкоцитами здоровых людей, можно констатировать, что повысить уровень концентрации ампициллина, гентамицина, цефтриаксона в лейкоцитах можно за счет стимуляции процессов связывания АТФ. Для полимерных наночастиц, содержащих антибиотики АТФ, и, особенно, колониестимулирующий фактор являются стимуляторами поглощения их лейкоцитами. Концентрация доксициклина и рифампицина во внутриклеточной среде увеличивается под действием лизоцима и

протосубтилина, эритромицина и азитромицина – под действием протосубтилина. Установлено, что полимерные наночастицы поли-н-бутилцианоакрилата могут служить переносчиками антибиотиков и обеспечивать создание во внутриклеточной среде высокой активности связанных с ними препаратов.

Установленные факты стимуляции связывания антибиотиков лейкоцитами позволяют нам представить новые доказательства о возможности направленного воздействия на процессы проникновения лекарственных веществ в клетки. Данные, полученные в экспериментах с лейкоцитами здоровых людей явились контролем для экспериментов с изолированными клетками ВИЧ инфицированных лиц.

Особенности процесса взаимодействия антибиотиков с лейкоцитами при ВИЧ инфицировании рассматривались нами в качестве основного положения работы, а приведенные выше фактические данные служили контролем.

Полиморфноядерные лейкоциты и лимфоциты получали от ВИЧ инфицированных лиц с II и III стадиями процесса.

В обоих случаях получены однонаправленные результаты, но в стадии III все основные тенденции выявляются более отчетливо (таблица 1)

Показано, что показатели связывания антибиотиков полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами значительно снижены. Полиморфноядерные лейкоциты и лимфоциты при ВИЧ инфицировании в III стадии практически не способны связывать ампициллин и гентамицин в свободной форме. Поглощение клетками этих антибиотиков в форме наночастиц происходит, но количественно показатели связывания снижены как для полимерных частиц, содержащих ампициллин, так и гентамицин в 3-6 раз. Связывание цефтриаксона и доксициклина клетками ВИЧ инфицированных уменьшено до 2 раз, азитромицина – более чем в 3 раза, эритромицина в 3-4 раза. Менее остальных страдает в этом случае процесс связывания рифампицина: уровень концентрации этого антибиотика во внутриклеточной среде полиморфноядерных лейкоцитов снижается на 42%, а лимфоцитов – на 27%.

Можно считать доказанным, что лейкоциты ВИЧ инфицированных уменьшают способность связывать антибиотики из окружающей среды, уровень концентрации антибиотиков во внутриклеточной среде существенно снижается. В этих условиях для гидрофильных антибиотиков только их полимерные формы – наночастицы способны обеспечивать определенный уровень активности во внутриклеточной среде. В отношении липофильных антибиотиков можно констатировать, что в наименьшей степени страдает поступление в лейкоциты рифампицина при ВИЧ инфицировании. В целом, для всех антибиотиков при ВИЧ инфицировании в условиях наших экспериментов зарегистрировано повреждение процесса связывания их лейкоцитами.

Это обстоятельство служило побудительным мотивом поиска путей коррекции нарушенных механизмов связывания антибиотиков лейкоцитами. В качестве корректоров были апробированы различные биологически активные соединения и полимерные наночастицы.

Полимерные наночастицы рассматривались, по опыту с клетками здоровых людей, в качестве транспортных систем, доставляющих антибиотики во

внутриклеточную среду. Это положение в целом подтвердилось и в случае с лейкоцитами ВИЧ инфицированных. Если в III стадии ВИЧ инфицирования, связывание ампициллина и гентамицина лейкоцитами практически прекращается, то наночастицы все-же обеспечивают доставку антибиотиков внутрь клеток. Транспортирование ампициллина с помощью наночастиц в полиморфноядерные лейкоциты и лимфоциты позволяет создать внутри клеток небольшой, но имеющий терапевтическое значение уровень концентрации - прирост антибиотика внутри клеток в 3-4 раза. Уровень гентамицина внутри лейкоцитов возрастает более чем в 11 раз при доставке этого антибиотика в составе наночастиц.

В итоге, полимерные наночастицы как с ампициллином, так и с гентамицином обеспечивают накопление антибиотиков внутри лейкоцитов ВИЧ инфицированных до уровня превосходящего уровень антибиотиков во внеклеточной среде. Вероятно, что роль полимерных наночастиц как транспортной системы для антибиотиков сохраняется и в условиях нарушенного связывания препаратов при ВИЧ инфицировании, хотя количество антибиотиков доставляемых наночастицами во внутриклеточную среду при этом существенно ниже по сравнению с условиями здорового человека.

Присутствие субстанции АТФ в среде инкубации лейкоцитов от ВИЧ инфицированных с антибиотиками меняет выраженность процесса проникновения антибиотиков в клетки. Под действие АТФ происходит увеличение связывания полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами ампициллина – на 30 – 60%, гентамицина, примерно на 50% и цефтриаксона, - в 2 раза (рисунок 1). Захват лейкоцитами полимерных наночастиц, содержащих ампициллин или гентамицин под влиянием АТФ не изменяется.

Лизоцим также влияет на процесс взаимодействия антибиотиков с клетками таким образом, что связывание рифампицина полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами возрастает на 40 и 50%, а связывание доксициклина – на 45 и 55% (рисунок 2). Связывание других антибиотиков существенно не изменилось.

В присутствии протеолитического протосубтилина увеличиваются показатели, характеризующие связывание рифампицина полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами – на 44 и 40% соответственно; эритромицина – 14% и 10%; азитромицина – на 37% и 12%; а также и доксициклина – на 30%, для обоих типов клеток. При этом уровень концентрации этих антибиотиков внутри лейкоцитов становится таким же как и у здоровых людей (рисунок 3).

Колонистимулирующий фактор в основном во влиял на поглощение полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами наночастиц, содержащих ампициллин и гентамицин. Наночастицы с ампициллином связываются лейкоцитами больше в 3-5 раз, а наночастицы с гентамицином - примерно в 2 раза. Уровень концентрации антибиотиков внутри лейкоцитов становился равным уровню, достигающегося в клетках здоровых людей при доставке препаратов с помощью наночастиц (рисунок 4).

Таблица 1 - Связывание антибиотиков изолированными клетками (мкг/10⁶ клеток) инфицированных лиц (III стадия)

Антибиотики	Контроль, клетки здоровых		Опыт, клетки ВИЧ-инфицированных	
	полиморфноядерные лейкоциты	лимфоциты	полиморфноядерные лейкоциты	лимфоциты
Ампициллин, n= 8	0,28 ± 0,1	0,30 ± 0, 14	0,2 ± 0,18	0,1 ± 0,08
Ампициллин + наночастицы, n=10	3,82 ± 0,15	2,31 ± 0,12	0,58 ± 0,113	0,3 ± 0,1
Гентамицин, n= 6	0, 47 ± 0,06	0,38 ± 0,02	0,25 ± 0,1	0,1 ± 0,05
Гентамицин + наночастицы, n = 6	2,76 ± 0,16	2,1 ± 0,13	1,06 ± 0,09	1,1 ± 0,1
Рифампицин, n=5	1,95 ± 0,16	1,32 ± 0,13	1,1 ± 0,07	0,8 ± 0,05
Эритромицин, n=6	5,21 ± 0,46	4,4 ± 0,37	1,78 ± 0,2	1,5 ± 0,1
Азитромицин, n=5	8,20 ± 0,54	7,10 ± 0,71	2,1 ± 0,14	2,0 ± 0,1
Доксициклин, n=6	1,1 ± 0,2	0,94 ± 0,1	0,63 ± 0,06	0,5 ± 0,05
Цефтриаксон, n=7	0,84 ± 0,05	0,67 ± 0,07	0,42 ± 0,02	0,3 ± 0,02

Примечание: p1 – достоверность отличий показателей для полиморфноядерных лейкоцитов
p2 – достоверность отличий показателей для лимфоцитов

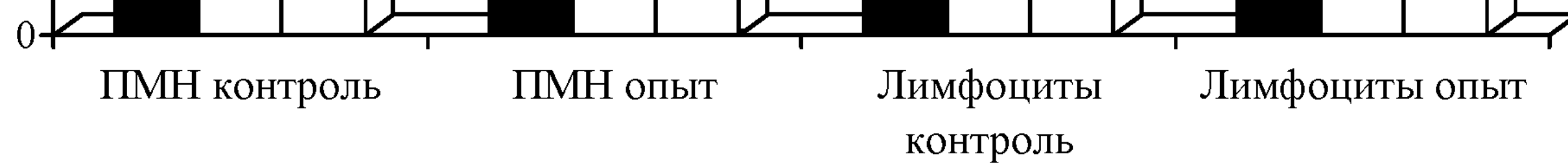


Рисунок 1 - Связывание антибиотиков изолированными клетками (мкг/10⁶ клеток) периферической крови ВИЧ инфицированных лиц (III стадия) в присутствии АТФ (ПМН – полиморфноядерные нейтрофилы)

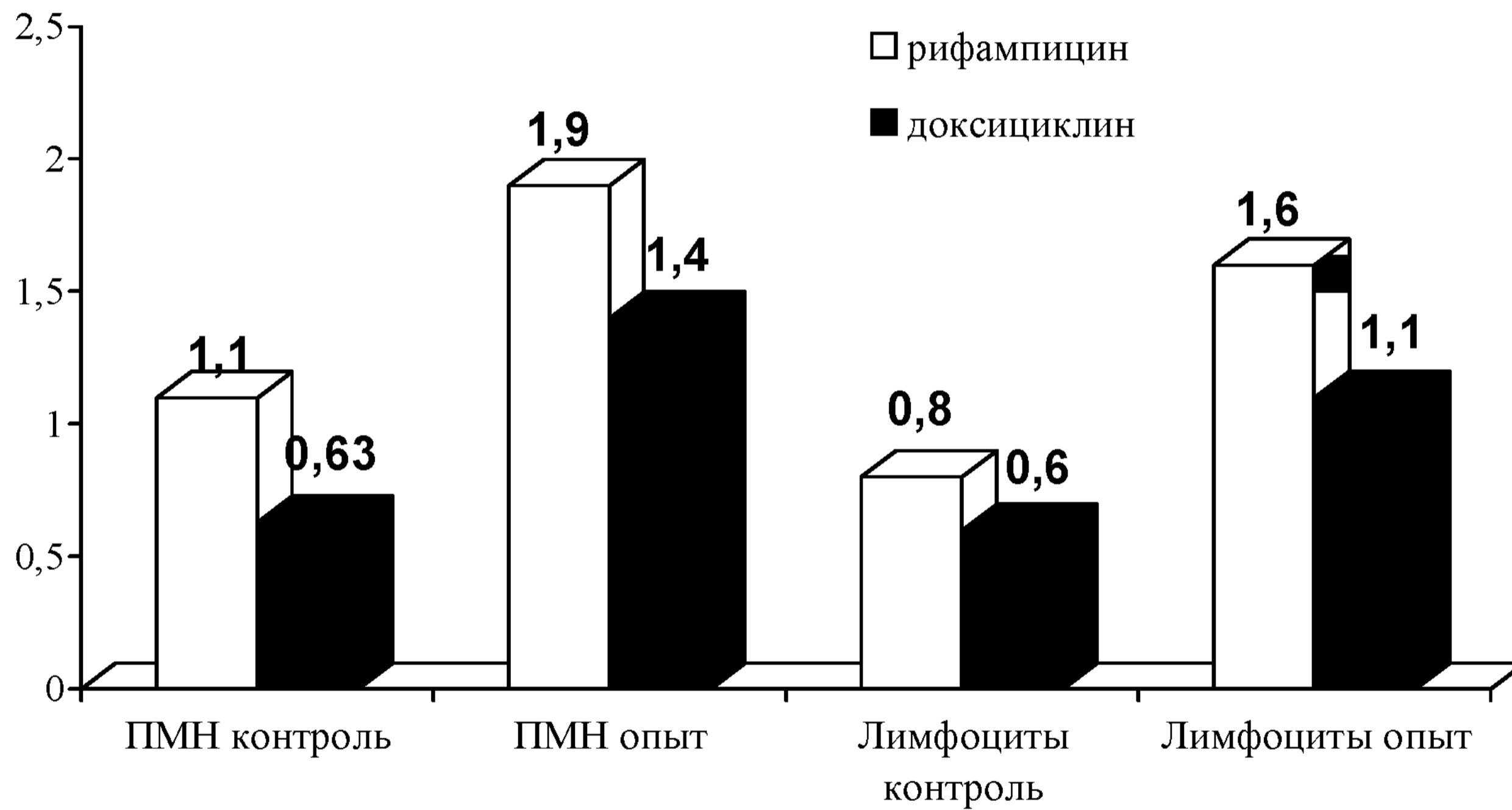


Рисунок 2 - Связывание антибиотиков изолированными клетками (мкг/10⁶ клеток) периферической крови ВИЧ инфицированных лиц (III стадия) в присутствии лизоцима (ПМН – полиморфноядерные нейтрофилы)

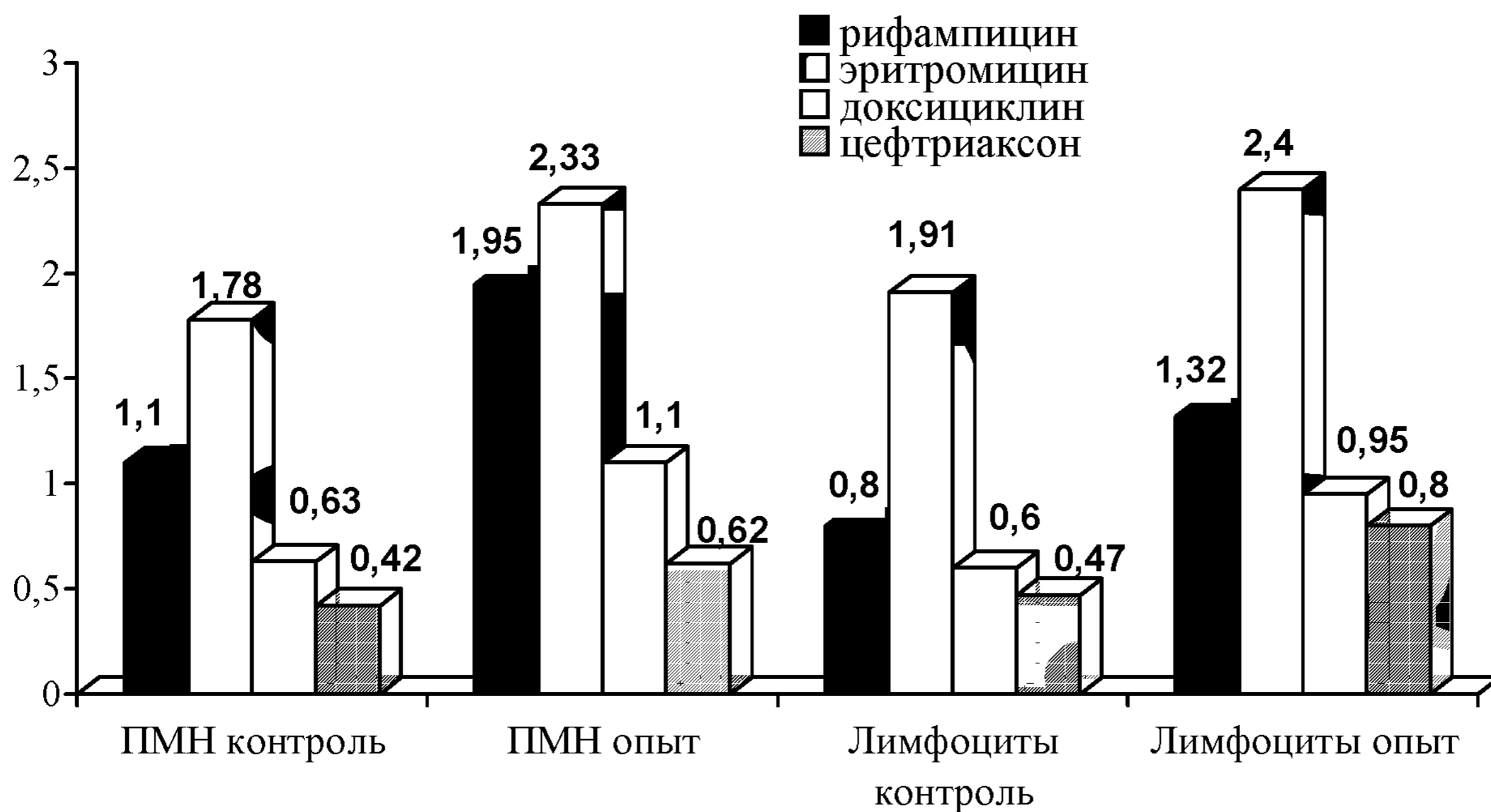


Рисунок 3 -Связывание антибиотиков изолированными клетками ($\text{мкг}/10^6$ клеток) периферической крови ВИЧ инфицированных лиц (III стадия) в присутствии протосубтилина (ПМН – полиморфноядерные нейтрофилы)

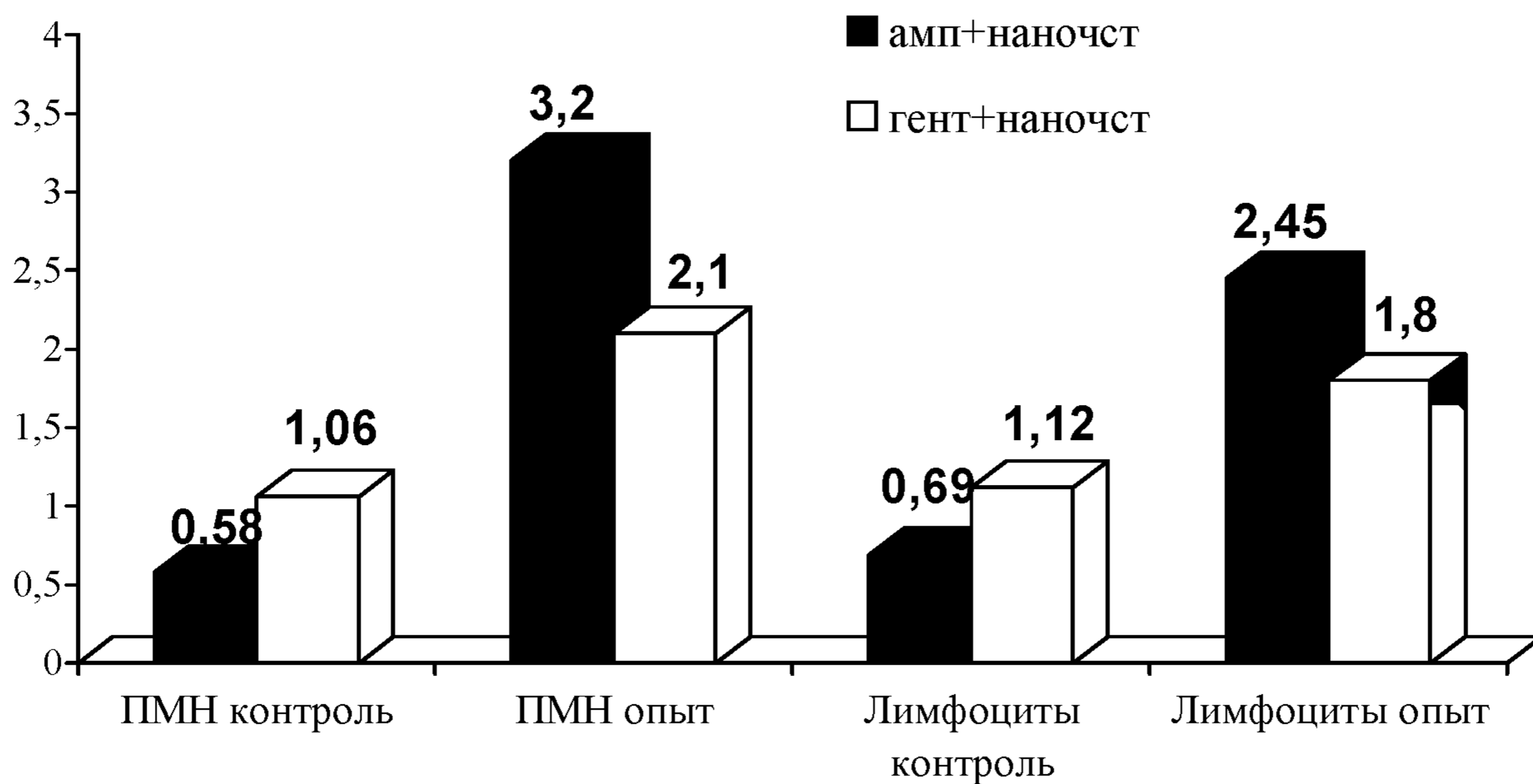


Рисунок 4 - Связывание антибиотиков изолированными клетками ($\text{мкг}/10^6$ клеток) периферической крови ВИЧ инфицированных лиц (III стадия) в присутствии колониестимулирующего фактора (ПМН – полиморфноядерные нейтрофилы)

Можно считать, что описан феномен стимуляции проникновения антибиотиков через плазматические мембраны полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов периферической крови ВИЧ инфицированных. Так, поступление ампициллина, гентамицина, цефтриаксона в лейкоциты ВИЧ инфицированных возрастает в результате воздействия субстанции АТФ или арглабина на механизм пассивной диффузии гидрофильных соединений. Рифампицин и доксициклин проникают в лейкоциты более активно под влиянием лизоцима или протосубтилина облегчающих пассивную диффузию через плазматические мембраны для липофильных соединений. Внутриклеточная концентрация эритромицина или азитромицина возрастает в присутствии арглабина и протосубтилина, вероятно, вследствие активации энергозависимых транспортных систем на уровне клеточных мембран лейкоцитов. Полимерные наночастицы поли-н-бутилцианоакрилата, несмотря на явное повреждение лейкоцитов и изменение функции поглощения клеткой лекарственных веществ, все-таки в определенной мере способны доставлять антибиотики во внутриклеточную среду. Кроме того, под влиянием ряда биологически активных соединений может быть достигнуто и некоторое повышение захвата полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами наночастиц, содержащих антибиотики. Особенно значительно у полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов при ВИЧ инфицировании функция захвата полимерных наночастиц активируется колониестимулирующим фактором.

В целом, картина действия корректоров связывания антибиотиков лейкоцитами однотипна у здоровых людей и ВИЧ инфицированных.

Особенный фрагмент работы был закономерно посвящен попытке определения вероятного влияния антиретровирусных препаратов на клеточную фармакокинетику противобактериальных антибиотиков.

В условиях нашего эксперимента, когда *in vitro* полиморфноядерные лейкоциты и лимфоциты, взятые у здоровых волонтеров, инкубировали с антибиотиками в среде, содержащей антиретровирусный препарат зидовудин, не получено достоверных изменений в связывании гентамицина, ампициллина и их форм в виде наночастиц, а также цефтриаксона, доксициклина, азитромицина и рифампицина. Эти же эксперименты для ампициллина в виде наночастиц, цефтриаксона, доксициклина и рифампицина были повторены в динамике в промежутке от 5 минут до 4 часов. Здесь определена слабая, не подтвержденная статистически, тенденция к уменьшению показателя связывания антибиотиков клетками. Принципиально параметры связывания антибиотиков клетками здоровых людей в присутствии зидовудина не меняются.

Инкубация лейкоцитов ВИЧ инфицированных (III стадия) с антибиотиками в присутствии зидовудина также не дает результатов, которые бы позволяли уверенно говорить о возможном изменении клеточной фармакокинетики антибиотиков на фоне зидовудина. Есть лишь незначительная тенденция к уменьшению численного показателя связывания клетками доксициклина, азитромицина и рифампицина.

Эти результаты позволяют нам отрицать высокий риск изменения параметров клеточной фармакокинетики противобактериальных антибиотиков, а именно, способности антибиотиков проникать внутрь лейкоцитов.

С другой стороны, к настоящему времени известны данные, свидетельствующие о значительном воздействии ряда противобактериальных антибиотиков на уровень активности и фармакокинетику антиретровирусных препаратов, зидовудина в частности.

Так установлено, что под влиянием рифампицина и рифабутина может снижаться уровень концентрации лопинавира, ретонавира и зидовудина в крови здоровых добровольцев [la Porte CJ, Colbers EP, Bertz R, 2004]. Авторы довольно убедительно объясняют подобный эффект индукцией рифампицином цитохрома P450 3A. Фармакокинетического взаимодействия здесь не предполагается. Это же подтверждается в официальном руководстве CDC [Centers for Disease Control and Prevention (CDC)., 2002].

Влияние обратного рода – антиретровирусных препаратов на кинетику противобактериальных описано в меньшей степени.

Фармакокинетическое взаимодействие обнаружено также и в случае одновременно назначаемых рифампицина и антиретровирусного препарата эфавиренс. Описан эффект индинавира на фармакокинетику рифампицина, установлено, что противовирусный препарат индинавир, как ингибитор цитохрома P 450, но не зидовудин, который не обладает подобным эффектом, несколько повышает уровень концентрации антибиотика в крови при совместном применении [Jaruratanasirikul S, Sriwiriyan S., 2001].

Кроме того, нам удалось получить сведения из работы М. С. Zink и соавт [2005] что тетрациклиновый антибиотик миноциклин на фоне стандартной антиретровирусной терапии не меняет параметры проникновения через гематоэнцефалический барьер, период полувыведения и клиренс, т.е. основные параметры общей фармакокинетики. Клеточную фармакокинетику авторы не исследовали, но установленное снижение кажущегося объема распределения может свидетельствовать о худшем проникновении препарата в клетки. Следует подчеркнуть, что этот параметр был отчетливо снижен и до курса антиретровирусной терапии, а после его начала не менялся дополнительно. Это косвенно подтверждает полученные нами данные, что проникновение антибиотиков в лейкоциты снижено при ВИЧ инфицировании и не усугубляется под действием антиретровирусных препаратов.

Сходные результаты описаны и в работе [Polis MA, Piscitelli SC, Vogel S, et al., 1997], где исследовали взаимодействие противобактериального антибиотика кларитромицина и антиретровирусного препарата зидовудина. Кларитромицин влиял (уменьшал) на максимальный уровень зидовудина в крови, снижал AUC (в период 0 - 4 часа), но зидовудин не влиял на основные параметры фармакокинетики кларитромицина, а, главное, не изменял кажущийся объем распределения, который косвенно отражает степень проникновения антибиотика в клетки. Это вполне согласуется с данными по клеточной фармакокинетике, полученными в условиях нашего эксперимента.

Можно полагать, что снижение эффективности использования антибиотиков при лечении бактериальных инфекций на фоне ВИЧ инфицирования или

СПИДа (среди прочих вероятных причин) связано с особенностями клеточной фармакокинетики препаратов обусловленными функциональным состоянием лейкоцитов. Влияние на параметры клеточной фармакокинетики противобактериальных антибиотиков антиретровирусных препаратов незначительно, судя по полученным в условиях наших экспериментов, данным по интерференции зидовудина и большой группы классических антибиотиков.

Таким образом, в работе получены доказательства того, что при ВИЧ инфицировании проницаемость плазматических мембран лейкоцитов для антибиотиков и транспортные механизмы доставки антибиотиков во внутриклеточную среду настолько нарушаются, что могут затруднять достижение внутри лейкоцитов эффективного уровня концентрации противобактериальных средств. Однако, можно считать, что восстановление нарушенных процессов проникновения антибиотиков в клетки при ВИЧ инфицировании возможно с помощью полимерных наночастиц, как транспортной формы препаратов и ряда фармакологических соединений – АТФ, лизоцима, протосубтилина и колониестимулирующего фактора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных данных позволяет констатировать явное изменение фармакодинамики ряда наиболее часто применяемых антибиотиков, а также снижение их эффективности в отношении внутриклеточно локализованных микроорганизмов на фоне инфицирования ВИЧ.

Снижение способности антибиотиков проникать в лейкоциты при ВИЧ инфицировании может являться дополнительным объяснением затруднений в химиотерапии.

Некоторые из исследованных в настоящей работе биологически-активных субстанций и препаратов могут быть использованы как корректоры транспорта антибиотиков, значительно увеличивая проникновение последних в лейкоциты ВИЧ-инфицированных лиц и увеличивая их антимикробную эффективность.

Полученные нами результаты позволили сделать выводы:

1. Изолированные полиморфноядерные лейкоциты и лимфоциты периферической крови здоровых людей связывают *in vitro* антибиотики в различной степени от минимальной (отношении клеточной концентрации к внеклеточной $< 0,1$) - ампициллин, далее гентамицин (0,32 – 0,25), цефтриаксон (0,59 – 0,49), доксициклин (0,98 – 0,70), рифампицин (4,0 – 2,7), эритромицин (11,3 – 9,5) до максимальной (17,9 – 15,6) – азитромицин. Во внутриклеточной среде полиморфноядерных лейкоцитов антибиотики создают более высокую концентрацию, чем в лимфоцитах.

2. Увеличение количественного показателя связывания антибиотиков изолированными полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами здоровых людей возможно в следующих ситуациях: при включении ампициллина или гентамицина в структуру биodeградирующих полимерных наночастиц из поли-*n*-бутилцианоакрилата (в 7-13 и в 5 раз соответсвенно); под влиянием присутствующей в среде инкубации субстанции АТФ – для ампициллина (рост на 37 и 35%), гентамицина (15 и 45%), цефтриаксона (25 и 13%), наночастиц ассоциированных с антибиотиками (17 и 24% - ампициллин содержащие

частицы и 19 и 22% гентамицин содержащие); в присутствии лизоцима – для рифампицина (17 и 21%) и доксициклина (36 и 15%); в присутствии протосубтилина – для эритромицина (12 и 14%), азитромицина (11% для обоих типов лейкоцитов); в присутствии колониестимулирующего фактора – наночастиц (с ампициллином на 28 и 41% и с гентамицином – на 35 и 47%).

3. Изолированные полиморфноядерные лейкоциты и лимфоциты периферической крови ВИЧ инфицированных в стадии II и III связывают в условиях *in vitro* антибиотики в меньшей степени, чем лейкоциты здоровых людей. Снижение показателя связывания для ампициллина до 50%, для гентамицина – почти в 3 раза, для наночастиц с ампициллином и наночастиц с гентамицином – уменьшение в 3-6 раз, для цефтриаксона в 2 раза, доксициклина – более чем в 2 раза, рифампицина, эритромицина и азитромицина – снижение в 3-4 раза. В меньшей степени у ВИЧ инфицированных нарушается связывание рифампицина: этот антибиотик в полиморфноядерные лейкоциты проникает хуже на 42%, а в лимфоциты – на 27%.

4. Связывание антибиотиков изолированными полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами периферической крови ВИЧ инфицированных в стадии II и III существенно не меняется в присутствии в среде инкубации антиретровирусного препарата зидовудин.

5. Сниженные количественные показатели связывания антибиотиков лейкоцитами ВИЧ инфицированных восстанавливаются, или увеличиваются при использовании наночастиц для транспорта ампициллина или гентамицина; а также под влиянием присутствия в среде инкубации АТФ – для ампициллина, гентамицина, цефтриаксона, наночастиц ассоциированных с антибиотиками; в присутствии лизоцима – для рифампицина и доксициклина; протосубтилина – для эритромицина, азитромицина; колониестимулирующего фактора – наночастиц с антибиотиками.

Практические рекомендации

1. Учитывать в условиях клиники особенности взаимодействия антибиотиков с лейкоцитами у ВИЧ инфицированных при возникновении инфекции с внутриклеточной локализацией возбудителей.
2. При выборе антибиотиков при инфекции у ВИЧ инфицированных в случае расположения патогенных бактерий во внутриклеточной среде отдавать предпочтение препаратам сохраняющим способность к проникновению через плазматические мембраны – рифампицину, эритромицину, азитромицину (кроме стандартных критериев выбора).
3. Провести клиническую апробацию корректоров проницаемости клеточных мембран лейкоцитов для антибиотиков у ВИЧ инфицированных.

Список опубликованных работ по теме диссертации

- 1 Омаров Е.А. Связывание антибиотиков лейкоцитами у ВИЧ-инфицированных лиц //Фармация Казахстана. - 2006. -№ 5. - С. 46-47.
- 2 Омаров Е.А., Швечихин. А.Ю. Связывание антибиотиков при использовании «Молграмастина» лейкоцитами у ВИЧ-инфицированных лиц //Фармация Казахстана. -2006. - № 7. - С. 42-43.
- 3 Омаров Е.А., Швечихин А.Ю. Коррекция показателя связывания антибиотиков лейкоцитами ВИЧ-инфицированных лиц с помощью препарата колониестимулирующего фактора //Медицина. -2006. - № 4. - С. 38-39.
- 4 Кузденбаева Р.С., Козаченко Н.В., Омаров Е.А. Взаимодействие антиретровирусных препаратов и антибиотиков на этапе проникновения в лейкоциты ВИЧ-инфицированных //Тезисы докл. XIII Росс. нац. конгр. «Человек и лекарство». Москва, 2006. - С. 671.
- 5 Кузденбаева Р.С., Козаченко Н.В., Омаров Е.А. Взаимодействие антибиотиков с изолированными лейкоцитами ВИЧ-инфицированных //Тезисы докл. XIII Росс. нац. конгр. «Человек и лекарство». Москва, 2006. - С. 676.
- 6 Кузденбаева Р.С., Козаченко Н.В., Гуляев А.Е., Омаров Е.А. Возможность изменения клеточной проницаемости для антибиотиков с помощью арглабина //Российский биотерапевтический журнал. - 2006. - Т.5, № 1. -С.43.
- 7 Кузденбаева Р.С., Омаров Е.А. Изменение способности антибиотиков проникать в лейкоциты при ВИЧ-инфицировании //Матер. I науч.-практ. конф. «Клинические исследования лекарственных средств в Украине». Киев, 2006. - С. 37-38.

Омаров Еркен Әбуғалиұлы

«АҚТҚ инфекциясын жұқтырған адамдардың перифериялық қанындағы оқшауланған клеткалардың антибиотиктерді тасымалдау коррекциясы»

14.00.25 – фармакология, клиникалық фармакология мамандығы бойынша медицина ғылымдарының кандидаты ғылыми дәрежесін алу үшін ұсынылған диссертация

ТУЙІНІ

Зерттеу төмендегі адамдардың шеткі қандарының лейкоциттеріне жүргізілді: өз еркімен қатысқан 19-45 жас аралығындағы дені сау 21 адам (14 ер адам мен 7 әйел); II сатыдағы ВИЧ инфекциясын жұқтырғандар – 8 адам (6 ер адам мен 2 әйел, жас аралықтары 21-35); III сатыдағы ВИЧ инфекциясын жұқтырғандар – 10 адам (7 ер адам мен 3 әйел, жастары 17-31 аралығында). Төмендегі препараттар қолданылды: ампициллин натрий тұзы («Синтез», Ресей); гентамицин сульфаты (гентамицин К, KRKA Словения); Рифампицин (Рифампицин, Акрихин, Ресей); Эритромицин (Эритромицин фосфат, Ресей, Азитромицин (Азитромицин, KRKA, Словения); Цефтриаксон (Роцефин, F.Hoffmann-La Roche); Доксициклин (Вибрамицин, Polfa, Польша); Поли-н-бутилцианоакрилатты нанобөлшектермен байланыстырылған гентамицин препараты; Поли-н-бутилцианоакрилатты нанобөлшектермен байланыстырылған ампициллин препараты; Протосубтилин (Фармацевтикалық биотехнология ҒЗИ, Степногорск, Қазақстан); АТФ (Аденозин-5-(тетрагидрогентрифосфат) натрий тұздары түрінде, Здоровье народа, Украина); Лизоцим (Cerato, Италия); Гранулоциттер мен макрофагтардың колониестимуляциялаушы факторы; (Молграмостим - Лейкомакс); Зидовудин – антиретровирусты препарат (Азидотимидин, РФ). Зерттеліп отырған антибиотиктер бөліп алынған лейкоцитарлы фракциялар – лимфоциттер және полиморфноядерлі лейкоциттермен *in vitro* байланыстырылды. Кейбір ғылыми тәжірибелер барысында инкубациялық жүйеге келесі фармакологиялық субстанциялар қосылды (барлық жағдайда антибиотиктермен қатар, ал колониестимуляциялаушы фактор жағдайында - антибиотиктің алдынан 30 минут бұрын) - АТФ (5μM), лизоцим (5 мкг/мл), протосубтилин (1 ЕД/мл), Гранулоциттер мен макрофагтардың колониестимуляциялаушы факторы (1мкг/мл). Жасушалар сыртқы сұйықтығынан SM типті (3 мкм - 5 мкм - 8 мкм) Millipore мембранды сүзгісінен өткізу арқылы ажыратылды. Антибиотиктің концентрациясы жасуша лизаты мен фильтраттан анықталды.

Жұмыстың мақсаты: антибиотиктердің ВИЧ инфекциясын жұқтырғандар лейкоциттерімен өзара әрекеттесу параметрлерін анықтау және биофазада препараттардың белсенділігін арттыру үшін нысаналы мүмкіндіктер жасау.

Алғашқыда антибиотиктердің дені сау ересек адамдардың полиморфноядерлі лейкоциттеріне және перифериялы көктамыр қанындағы лимфоциттерге ену қабілетін сипаттайтын сандық көрсеткіштер алынды. Нәтижесінде ампициллин, гентамицин, цефтриаксондардың лейкоциттердегі

концентрация деңгейін АТФ арқылы көтеруге болатындығы анықталды. Полимерлі нанобөлшектер үшін АТФ және, әсіресе, колониестимуляциялаушы фактор олардың лейкоциттерге енуіне түрткі болады. Доксициклин мен рифампицин концентрациясы жасуша ішінде лизоцим мен протосубтилин әсерімен, ал эритромицин мен азитромицин концентрациясы протосубтилин ықпалымен көбейеді. Біз үшін ВИЧ инфекциясын жұқтыру жағдайында антибиотиктер мен лейкоциттердің өзара әрекеттесу процесінің ерекшеліктері осы жұмыстың негізгі тақырыбы болып саналды. Антибиотиктерін полиморфноядерлі лейкоциттермен және лимфоциттермен әрекеттесу көрсеткіштерінің төмен екендігі анықталды. ВИЧ инфекциясын жұқтыру жағдайының III сатысында полиморфноядерлі лейкоциттер мен лимфоциттер ампициллин мен гентамицинді еркін түрде қабылдай алмайды. Жасушалар бұл антибиотиктерді нанобөлшектер түрінде сіңіреді, бірақ құрамында ампициллині бар полимерлі бөлшектер үшін де, гентамицин үшін де байланысу көрсеткіштерінің саны 3-6 есе төмен. ВИЧ инфекциясын жұқтырғандардың жасушаларының цефтриаксон мен доксицилинді сіңіруі 2 есеге, азитромицинді – 3-тен артық есеге, эритромицинді – 3-4 есеге төмен. Рифампициннің әсер етуі басқаларына қарағанда күштірек: бұл антибиотиктің полиморфноядерлі лейкоциттер жасушалары ішіндегі концентрациясы 42%, лимфоцит жасушаларында - 27%.

ВИЧ инфекциясын жұқтырғандар лейкоциттерінің антибиотиктерді сіңірудегі төмен сандық көрсеткіштері ампициллин мен гентамицинді қозғайтын нанобөлшектерді пайдаланған жағдайда; сондай-ақ, ампициллин, гентамицин, цефтриаксон және антибиотиктермен байланыстырылған нанобөлшектер үшін - инкубациялық ортада АТФ болған жағдайда; рифампицин мен доксициклин үшін – лизоцим қатысқан жағдайда, эритромицин мен азитромицин үшін – протосубтилин болған жағдайда; колониестимуляциялаушы фактор – антибиотикті нанобөлшектер бар болған жағдайда қалпына келуі немесе белгілі дәрежеге көбеюі мүмкін.