

УДК 616.37 - 002 - 085.33:615.032

О.В. Ротар,

В.І. Ротар

Буковинський державний медичний
університет**СЕЛЕКТИВНА ДЕКОНТАМІНАЦІЯ
КИШЕЧНИКУ НАНОКАПСУЛЬОВАНИМИ
ФОРМАМИ АНТИБІОТИКІВ ПРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГОСТРОМУ
ПАНКРЕАТИТІ**

Ключові слова: ципрофлоксацин,
нанокапсульована форма, гострий
панкреатит.

Резюме. Уведення розчину нанокапсульованої форми ципрофлоксацину в просвіт кишечника білим щурам із гострим експериментальним панкреатитом у дозі 3 мг/кг ефективно запобігало колонізації слизової оболонки тонкої кишки патогенними та умовно-патогенними ентеробактеріями.

Вступ

У хворих на гострий панкреатит розвивається ішемія слизової тонкої кишки (ТК), порушуються її функції, у першу чергу бар'єрна, що призводить до транслокації бактерій і ендотоксину із кишечника в системну циркуляцію крові і розвитку гнійно-септичних ускладнень (ГСУ) [1, 2]. Ефективним методом запобігання міграції бактерій із кишечника і розвитку ГСУ вважається введення в просвіт кишечника комбінації антибіотиків, що пригнічують активність грамнегативних ентеробактерій і не всмоктуються у внутрішнє середовище організму [3]. Поряд із цим, при тривалому уведенні в просвіт кишечника антибіотиків широкого спектра часто розвивається тяжкий дисбактеріоз [4]. Одним із варіантів вирішення цієї проблеми є розробка і впровадження в практику фармакологічних систем, що забезпечують адресну доставку і регульоване вивільнення лікарської речовини.

Мета дослідження

Дослідити вплив ентерально уведеної нанокапсульованої форми ципрофлоксацину на транслокацію патогенної грамнегативної мікрофлори із кишечника в портальну кров та мезентеріальні лімфатичні вузли при експериментальному гострому панкреатиті.

Матеріал і методи

Робота виконана на білих щурах лінії Vistar, самцях, масою 200-250 гр. Під загальною анестезією (кетамін 50 мг/кг) моделювали гострий панкреатит L-аргініном за методом [5]. Через дві години після відновлення кровопостачання і кожні 12 годин експерименту в просвіт ТК тваринам I групи вводили розчин ципрофлоксацину (Ц) (3 мг/кг), тваринам II групи - нанокапсульовану форму ципрофлоксацину (НКФЦ) із такого ж

розрахунку одноразово. НКФЦ готовили на основі природного полімеру хітозану (Хт, ММ 600 кДа) методом іонного структуроутворення [6], за наявності Ц [7]. Розмір наночастинок становив 25 - 250 нм, стійких у діапазоні рН 2,0-7,0. Тваринам III групи в просвіт кишечника вводили по 3 мл нанокапсульованої форми флуоресцеїну-ізотіоціанату (FITC, "Sigma") на основі Хт (FITC-Хт). Тваринам контрольної групи (КГ) вводили по 3 мл стерильного 0,9% розчину хлориду натрію. Через 4 год у просвіт ТК всім тваринам вводили суміш патогенних бактерій (E. Coli Hly+, K. pneumoniae, P. aeruginosa, E. aerogenes, S. aureus) по 1 мл у концентрації 6,0 Іг КУО/мл. Тварин виводили з експерименту через 24, 48 і 72 години. Експерименти проводили відповідно до положень Конвенції ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях від 18.03.1986 р, Директиви ЄС №609 від 24.11.86 р, наказу МОЗ України № 66 від 13.06.2006 р і закону України "Про захист тварин від жорсткого відношення" (№ 1759 від 15.12.2009 р). Проводили бактеріологічне дослідження внутрішніх органів, портальної крові і мезентеріальних лімфовузлів, вивчали стан мукозної мікрофлори ТК. Ідентифікацію чистих культур здійснювали за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями та ознаками патогенності. Для аналізу використовували провідні аналітичні показники: індекс постійності (ІП), частоту зустрічальності (ЧЗ), популяційний рівень (ПР), коефіцієнт кількісного домінування (ККД) та коефіцієнт значущості (КЗ). Мукоадгезивні властивості розчинів Хт, мічених FITC, оцінювали за флуоресценцією гістологічних зрізів слизової оболонки ТК. Статистичну обробку даних проводили з використанням критерію t Стьюдента.

Обговорення результатів дослідження

Індукція ГП супроводжувалася елімінацією із пристінкового шару слизової оболонки (ПШСО) індигенної анаеробної мікрофлори (табл. 1). Уже через 24 год від початку ГП популяційний рівень (ПР) біфідобактерій (ББ), лактобактерій (ЛБ) та ентерококів (Ен) вірогідно ($p<0,01$) знизився на

35-42 % у тварин всіх груп і залишався на такому рівні до закінчення експерименту. У тварин КГ ПШСО активно колонізували уведені патогенні (*E. Coli* Hly+) та умовно-патогенні ентеробактерії (едвардсієли, протеї, клебсієли), стафілококи на високому ПР (табл. 1) і через 48 та 72 год за ІІ, ЧЗ і ККД становилися константними, що не

Таблиця 1

Вплив ципрофлоксацину на видовий склад та популяційний рівень мікрофлори слизової оболонки тонкої кишки тварин з експериментальним гострим панкреатитом, (М+m)

Виділені мікроорганізми	Контроль (n=10)		24 год (n=7)		48 год (n=7)		72 год (n=7)		
	N	ПР	N	ПР	N	ПР	N	ПР	
Контрольна група	<i>Bifidobacterium</i> spp.	10	6,87±0,19	7	4,79±0,08	5	4,32±0,07	4	4,67±0,09
	<i>Lactobacillus</i> spp.	10	6,51±0,24	7	4,85±0,11	5	4,67±0,04	4	4,26±0,04
	<i>Bacteroides</i> spp.	10	5,97±0,21	7	6,05±0,07	7	5,76±0,05	7	4,99±0,12
	<i>Eubacterium</i> spp.	2	5,17±0,21	2	5,08±0,20	0	0	1	3,20
	<i>Clostridium</i> spp.	0	0	2	4,44±0,24	3	3,56±0,09	5	3,81±0,13
	<i>E. coli</i>	10	4,97±0,17	7	5,39±0,12	7	5,78±0,27	7	5,74±0,11
	<i>E. coli</i> Hly+	0	0	4	4,36±0,08	5	4,81±0,19	6	5,29±0,27
	<i>E. aerogenes</i>	0	0	2	3,95±0,15	3	4,45±0,16	4	4,93±0,25
	<i>K.pneumoniae</i>	0	0	3	4,09±0,05	3	4,39±0,03	4	4,64±0,07
	<i>P.aeruginosa</i>			3	3,91±0,11	3	4,36±0,18	2	4,89±0,13
	<i>P. mirabilis</i>	0	0	4	4,03±0,05	3	4,32±0,06	5	4,71±0,20
	<i>Enterococcus</i> spp.	8	6,74±0,22	6	4,71±0,11	3	3,66±0,18	3	3,94±0,13
	<i>Streptococcus</i> spp.	7	4,34±0,12	6	4,81±0,18	7	5,02±0,11	7	5,18±0,14
	<i>Staphylococcus</i> spp.	0	0	3	4,20±0,03	7	4,51±0,10	7	4,88±0,09
І група	<i>Bifidobacterium</i> spp.	10	6,87±0,19	7	4,09±0,06*	4	4,01±0,07*	4	4,07±0,08*
	<i>Lactobacillus</i> spp.	10	6,51±0,24	7	4,25±0,15*	5	4,17±0,09*	4	4,06±0,09*
	<i>Bacteroides</i> spp.	10	5,97±0,21	7	5,95±0,09	7	5,56±0,06	7	4,69±0,12
	<i>Eubacterium</i> spp.	2	5,17±0,21	2	5,01±0,20	0	0	1	0
	<i>Clostridium</i> spp.	0	0	2	4,34±0,14	3	4,26±0,09*	5	3,91±0,11
	<i>E. coli</i>	10	4,97±0,17	7	4,29±0,19*	7	4,18±0,17*	7	4,04±0,11*
	<i>E. coli</i> Hly+	0	0	2	3,06±0,28*	2	3,01±0,29*	2	2,91±0,27*
	<i>E. aerogenes</i>	0	0	2	3,23±0,15*	2	3,05±0,16*	1	2,65*
	<i>K.pneumoniae</i>	0		2	3,04±0,07*	2	3,09±0,03*	2	2,89±0,05*
	<i>P.aeruginosa</i>			2	3,09±0,11*	2	3,06±0,18*	1	3,01*
	<i>P. mirabilis</i>	0	0	3	3,11±0,05*	2	3,02±0,06*	2	2,53±0,20*
	<i>Enterococcus</i> spp.	8	6,74±0,22	6	3,71±0,11*	3	3,26±0,18*	3	3,04±0,13*
	<i>Streptococcus</i> spp.	7	4,34±0,12	6	4,01±0,12*	7	3,82±0,09*	7	3,62±0,11*
	<i>Staphylococcus</i> spp.	0	0	2	3,20±0,03*	3	3,01±0,10*	2	2,98±0,09*
ІІ група	<i>Bifidobacterium</i> spp.	10	6,87±0,19	7	4,11±0,11*	3	4,03±0,09*	2	4,16±0,05*
	<i>Lactobacillus</i> spp.	10	6,51±0,24	7	4,35±0,17*	5	4,17±0,11*	4	4,11±0,12*
	<i>Bacteroides</i> spp.	10	5,97±0,21	7	5,88±0,11	7	5,46±0,11	7	4,37±0,18*
	<i>Eubacterium</i> spp.	2	5,17±0,21	2	4,98±0,18	0	0	1	3,32
	<i>Clostridium</i> spp.	0	0	2	4,31±0,21	3	3,16±0,12	5	3,76±0,11
	<i>E. coli</i>	10	4,97±0,17	7	4,19±0,12*¥	7	3,98±0,07*¥	7	3,84±0,11*¥
	<i>E. coli</i> Hly+	0	0	2	2,54±0,07*¥	1	2,02*¥	0	0*¥
	<i>K.pneumoniae</i>	0	0	1	2,42*¥	0	0*¥	0	0*¥
	<i>P. mirabilis</i>	0	0	1	2,53*¥	1	2,13*¥	0	0*¥
	<i>Enterococcus</i> spp.	8	6,74±0,22	6	3,51±0,11*¥	4	3,16±0,18*¥	2	2,94±0,13*¥
	<i>Streptococcus</i> spp.	7	4,34±0,12	6	3,88±0,08*¥	7	3,64±0,06*¥	7	3,38±0,07*¥

Примітки. N – кількість виділених штамів, ПР – популяційний рівень; * - $p<0,05$ порівняно з показниками контрольної групи тварин; ¥ - $p<0,05$ порівняно з показниками тварин І групи

властиво для слизової ТК в інтактних тварин. За таких умов не тільки збільшується ПР аеробної популяції, але значно підвищується її агресивні

властивості, що дозволяє даній мікрофлорі подолати бар'єр ПШСО тонкої кишки і здійснювати транслокацію у внутрішнє середовище орга-

Таблиця 2

Вплив нанокапсульованої форми ципрофлоксацину на міграцію мікрофлори із кишечника в портальну кров і мезентеріальні лімфовузли у тварин з експериментальним гострим панкреатитом, Ig КУО/г (M+m)

Виділені мікроорганізми			Тривалість захворювання, год					
			24		48		72	
			N	ПР	N	ПР	N	ПР
Контрольна група	Портальна кров	E. coli	1	3,31	-	-	-	-
		E. coli Hly+	3	4,31±0,14	2	3,91±0,18	1	3,43
		S. epidermidis	1	3,01	-	-	-	-
		S. aureus	2	3,72±0,18	2	3,24±0,16	1	2,54
		E. aerogenes	2	3,74±0,12	1	3,21	-	-
		K. pneumonia	3	4,42±0,11	2	3,82±0,12	1	2,30
		P. aeruginosa	2	4,30±0,13	2	3,64±0,13	-	-
		P. mirabilis	3	4,08±0,12	2	3,51±0,11	2	3,06±0,09
		E. faecalis	1	2,68	-	-	-	-
	МЛН	E. coli	2	3,86±0,35	1	3,00	-	-
		E. coli Hly+	3	4,38±0,21	3	3,96±0,15	2	3,07±0,09
		S. epidermidis	1	3,94±0,21	-	-	-	-
		S. aureus	2	3,41±0,11	2	3,28±0,13	1	3,12
		E. aerogenes	2	3,34	2	3,37	-	-
		K. pneumonia	3	4,32±0,35	2	4,15±0,08	1	3,54
		P. aeruginosa	2	4,11±0,19	2	3,93±0,17	1	3,78
		P. mirabilis	3	4,42±0,21	3	4,02±0,12	2	3,52±0,09
		E. faecalis	1	3,06	-	-	-	-
І група	Портальна кров	E. coli Hly+	2	3,12±0,14*	1	2,91±0,18*	-	-
		S. epidermidis	1	3,01*	-	-	-	-
		S. aureus	2	3,12±0,18*	1	2,86±0,16*	-	-
		E. aerogenes	1	2,74±0,12*	-	-	-	-
		K. pneumonia	2	3,02±0,11*	1	2,86±0,12*	-	-
		P. aeruginosa	2	3,11±0,13*	-	-	-	-
		P. mirabilis	2	2,51±0,12*	1	2,31±0,11*	-	-
		E. coli	1	3,06±0,25*	-	-	-	-
		E. coli Hly+	3	3,21±0,12*	2	3,56±0,15*	-	-
	МЛН	S. epidermidis	1	2,84*	-	-	-	-
		S. aureus	2	2,61±0,07*	2	3,08±0,13*	1	2,42
		E. aerogenes	1	2,76*	1	2,54*	-	-
		K. pneumonia	2	3,03±0,35*	2	3,11±0,08*	1	2,84
		P. aeruginosa	2	2,81±0,19*	1	2,93*	1	2,58
		P. mirabilis	2	2,91±0,21*	2	3,02±0,12*	1	2,64±0,09
		E. coli	2	2,81±0,11 ^{¥*}	-	-	-	-
		S. epidermidis	1	2,12 ^{¥*}	-	-	-	-
		E. aerogenes	1	2,08 ^{¥*}	-	-	-	-
ІІ група	Портальна кров	E. coli	2	2,36±0,35 ^{¥*}	1	2,34 ^{¥*}	1-	2,16 ^{¥*}
		E. faecalis	1	2,21 ^{¥*}	-	-	-	-
		S. epidermidis	1	2,33 ^{¥*}	1	2,05 ^{¥*}	-	-
	МЛН	P. mirabilis	1	2,60 ^{¥*}	1	2,31 ^{¥*}	-	-

* p<0,05 порівняно з показниками контрольної групи тварин; ¥ p<0,05 порівняно з показниками тварин І групи

нізму (табл. 2). Через 24 і 48 год у порталній крові (ПР) і мезентеріальних лімфовузлах (МЛВ) виявлялися *E.coli* HLY+, *K. pneumoniae*, *E.coli*, *S.epidermidis*, *E.tarda*, *P.mirabilis*, ПР яких був високим (3-4,5 Ig КУО/г). Елімінація патогенної і умовно-патогенної мікрофлори із ПК і МЛВ у тварин КГ була сповільненою і на 72 годину експерименту ПР *E. coli* Hly+, *K. pneumoniae*, *E. tarda*, *P. mirabilis*, а також *P. aeruginosa* знаходився в межах 3,06 - 3,86 Ig КУО/г.

Кількість виділених штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів із ПШСО та їх ПР у тварин І групи, порівняно з тваринами КГ, через 24 год зменшувалися на 28-36%, хоча і не для всіх штамів вірогідно (табл. 1). Уведений через кожних 12 год ентерально Ц швидко (протягом 2 год) абсорбувався в кров у проксимальному відділі ТК, і його концентрація в просвіті і на слизовій оболонці ТК стає нижче терапевтичної, що не створює надійного захисту від уведеної патогенної мікрофлори. Так, кількість виділених штамів патогенних і умовно-патогенних бактерій і їх ПР зберігалися на тому ж рівні через 48 і 72 год. Поряд із цим, висока концентрація Ц у крові і тканинах сприяла швидкому виведенню патогенної мікрофлори із ПК (табл. 2): на 72-гу годину експерименту практично не висівалися мікроорганізми із ПК. Патогенні та

умовно-патогенні бактерії більш тривало колонізують регіональні МЛВ, причому, ПР *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P.aeruginosa* на 72-гу годину від початку експерименту практично не відрізнявся від показників тварин КГ, яким у процесі експерименту не використовували Ц.

В експериментальних тварин ІІ групи через 24 год після індукції ГП і ентерального уведення НКФЦ із слизової оболонки тонкої кишки практично не виділялися *P. aeruginosa*, *E. aero-genes*, *S. aureus*. Уведений ентерально Ц у вигляді наночасток (НКФЦ) транспортується через приепітеліальний слизовий шар завдяки особливим властивостям Хт [8] і фіксується на апікальній частині ентероцитів, що підтверджується при флуоресцентній мікроскопії гістологічних зрізів слизової тонкої кишки експериментальних тварин ІІІ групи (рис.). При підвищенні рН вище 7,0 наночастки стають нестабільними. Із наночасток, сформованих Хт, поступово звільняється ципрофлоксацин і створюється постійна і тривала концентрація антибіотика безпосередньо в ПШСО, що більш ефективно захищає слизову оболонку від патогенних бактерій. Так, колонізація слизової оболонки ТК тварин ІІІ групи відбувалася на 24-ту годину експерименту патогенними і умовно-патогенними бактеріями (*E. coli* Hly+, *K. pneumoniae* і *P. mirabilis*), ПР яких становив,

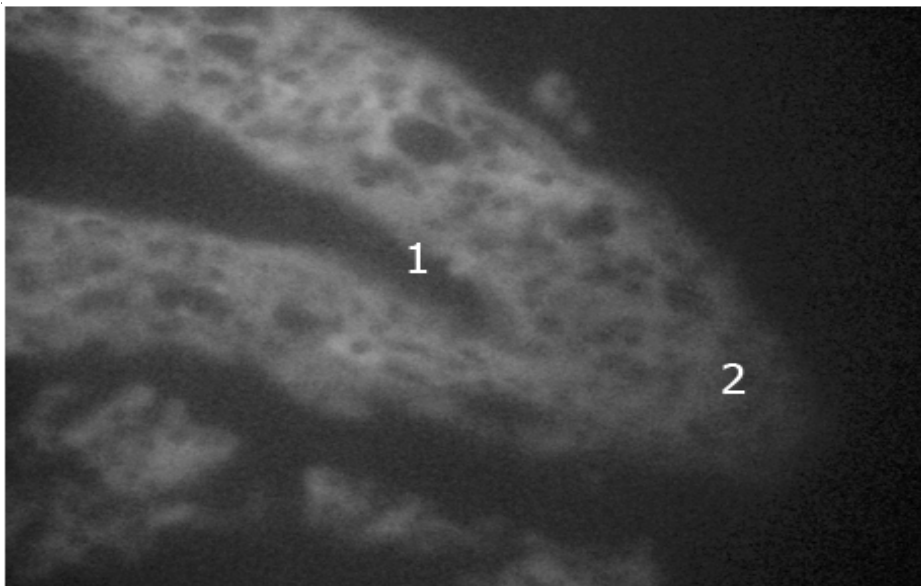


Рис. Люмінесцентна мікроскопія слизової оболонки здухвинної кишки через 12 год розвитку гострого панкреатиту та введення флуоресцеїн-ізотіоціонат-мічених наночасток хітозану, об. 15, ок. 60.

Примітки: 1-ворсіна слизової оболонки тонкої кишки, 2 - слиз, із флуоресцеїн-ізотіоціонат-міченими наночастками хітозану

відповідно, тільки 2,42-2,53 Ig КУО/г, що в 30-40 разів нижчий ($p < 0,01$) аналогічного показника КГ (табл. 1). Причому колонізація слизової оболонки була не тривалою: на 48-му годину виділено тільки по одному штаму *E. coli* Hly+ і *P. mirabilis*, ПР їх був у межах 2,02-2,13 Ig КУО/г, а на 72-гу годи-

ну експерименту бактерії із слизової оболонки не висівалися. Портальна бактеріємія утримувалася в дослідних тварин тільки протягом першої доби експерименту, у ПК не визначалися введені патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми (табл. 2). Елімінація бактерій із регіональних МЛВ від-

бувалася значно швидше ніж у тварин I та контрольної груп і на 72-гу годину експерименту виділено тільки один штам *E. coli*, ПР якого становив тільки 2,16 lg КУО/г. Як свідчать дані, представлені в табл. 1, уведення НКФЦ по 3 мг/кг одноразово експериментальним тваринам II групи зменшувало ступінь дисбактеріозу, що розвивався у тварин після індукції ГП за рахунок зменшення кількості штамів патогенних та умовно-патогенних бактерій. Крім того, кількість виділених штамів індигенної анаеробної мікрофлори (ББ, ЛБ, Ен) та їх ПР після 24-ї години і до закінчення експерименту під впливом НКФЦ практично не змінювалися.

Висновки

За результатами роботи отриманий експериментальний зразок розчину нанокapsульованої форми ципрофлоксацину для перорального використання на основі природного полімеру хітозану, величина наночасток яких залежала від процентного вмісту хітозану, а стабільність наночасток - від рН середовища.

Ципрофлоксацин, уведений перорально в нанокapsульованій формі, транспортується через приепітеліальний шар слизу до епітелію тонкої кишки завдяки властивостям хітозану і в дозі 3мг/кг ефективно захищає слизову оболонку від колонізації патогенними і умовно-патогенними бактеріями при експериментальному гострому панкреатиті.

Перспектива подальших досліджень

Подальша розробка терапевтичних систем, що забезпечують адресну доставку і регульоване звільнення лікарських препаратів для запобігання гнійно-септичних ускладнень гострої хірургічної патології.

Література. 1. Deutch E.A. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure / E.A. Deutch // Arch. Surg. - 1990. - V. 125. - P. - 403 - 404. 2. Flint R.S. The role of the intestine pathophysiology and management of severe acute pancreatitis / R.S. Flint, J.A. Windsor // HPB. - 2003. - V. 5. - P. 69 - 85. 3. Бондар М.В. Проблема дисбактеріозу в

практиці інтенсивної терапії / М.В. Бондар, В.П. Вьюницький // Клин. антибиотикотерапия. - 2004. - №1 (27). - С. 18 - 27. 4. Исследование пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта у человека в норме и при патологии / А.А. Воробьев, Ю.В. Несвежинский, Е.М. Липницкий [и др.] // Вестн. Рос. АМН. - 2004. - №2. - С. 43 - 47. 5. Hegyi P. L-arginine induced experimental pancreatitis / P. Hegyi, J. Pakonczad, R. Sari [et al.] // World J. Gastroenterology. - 2004. - V. 10. - P. 2003 - 2009. 6. Shmith J. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions / J. Shmith, E. Wood, M. Dornisch // Pharm. Res. - 2004. - V. 21. - P. 43 - 49. 7. Патент України на корисну модель № 80401, МПК А61В 17/00 Спосіб селективної деконтамінації кишечника / О.В. Ротар, В.І. Ротар, Р.В. Ротар, патентовласники О.В. Ротар, В.І. Ротар, Р.В. Ротар Заявлено 11.12.2012; опубл. 27.05.2013. Бюл. № 10. Sonaje K. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan-poly(g-glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery / K. Sonaje, Y. J. Chen, Y.L. Chen [et al.] // Biomaterials. - 2010. - V. 31. - P. 3384 - 3394.

СЕЛЕКТИВНАЯ ДЕКОНТАМИНАЦИЯ НАНОКАПСУЛИРОВАННОЙ ФОРМОЙ АНТИБИОТИКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

А.В. Ротарь, В.И. Ротарь

Резюме. Введение раствора нанокapsулированной формы ципрофлоксацина в просвет кишечника белым крысам с острым экспериментальным панкреатитом в дозе 3 мг/кг эффективно предупреждает колонизацию слизистой оболочки тонкой кишки патогенными и условно-патогенными-энтеробактериями.

Ключевые слова: ципрофлоксацин, нанокapsулированная форма, острый панкреатит.

SELECTIVE DIGESTIVE DECONTAMINATION WITH NANOCAPSULATED FORMS OF ANTIBIOTICS DURING ACUTE PANCREATITIS

O.V. Rotar, V.I. Rotar

Abstract. Enteral administration of nanoencapsulated form of 3 mg/kg ciprofloxacin to white rats with experimental acute pancreatitis effectively prevented colonisation of mucosal surface of small intestine with pathogenic and conditionally pathogenic enterobacteria.

Key words: ciprofloxacin, nanocapsulated forms, acute pancreatitis.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2014. - Vol.13, №1 (47).-P.112-116.

Надійшла до редакції 4.03.2014

Рецензент - професор Сидорчук І.Й.

© О.В. Ротар, В.І. Ротар 2014