

БИОАНАГААХ

Липосомд суурилуулсан антибиотикийн бичил биетний эсрэг идэвхийг тодорхойлсон дүн

Энхтайван Э.^{1,3}, Энхмаа О.¹, Ням-Очир Э.¹, Баясгалан Б.², Одончимэг М.⁴, Лодойданзан А.⁵,
Өнөрсайхан С.⁶, Энхжаргал Д.², Баатархүү О.¹, Ариунсанаа Б.¹

¹АШУУИС, ²Эмзүйн сургууль, ³Этүгэн их сургууль, ⁴ШУА-хими, Химийн технологийн хүрээлэн,
⁵Судалгааны хээрийн төв лаборатори, ШУТИС, ⁶НЭМҮТ
Цахим шуудан: fbm21f005@gt.mnums.edu.mn

Abstract

Result of antimicrobial activity of antibiotic encapsulated in liposomes

Enkhtaivan E.^{1,3}, Enkhmaa O.¹, Nyam-Ochir E.¹, Bayasgalan B.², Odonchimeg M.⁴, Lodoidanzan A.⁵,
Unursaikhan S.⁶, Enkhjargal D.², Baatarkhuu O.¹, Ariunsanaa B.¹

¹MNUMS, ²School of pharmacy, ³Etugen University
⁴Mongolian Academy of Science, Institute of Chemistry and Chemical Technology,
⁵Field research center MUST and Nagoya University joint,
⁶National Center for Public Health
e-mail: fbm21f005@gt.mnums.edu.mn

Introduction

The treatment of antibiotic-resistant bacterial infections has become a pressing problem for humanity worldwide, and antibiotic-resistant bacterial infections are likely to be the leading cause of death by 2050. Due to the mutation of infectious disease-causing bacteria and the emergence of bacterial resistance due to the improper use of antibiotics, the time and cost of infectious disease treatment increases, and in some cases, it leads to an increase in mortality, so it is the focus of the health sector in every country, regardless of the income level of the population. In addition, bacterial resistance has a negative impact on public health, food safety, the environment, and the economy.

As of 2015, Mongolia ranks among the countries with the highest consumption of antibiotics in the world, with 64.41 units of antibiotics prescribed per 1,000 people per day. Bacteria resistant to broad-spectrum antibiotics have increased dramatically, and among Gram-positive bacteria, drug-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become one of the most common and dangerous causes

Purpose

Determine the external structure of liposome-encapsulated antibiotics and evaluate their antibacterial activity.

Materials and Methods

We conducted this study using an experimental research design. Phospholipids were isolated by intermittent evaporation, antibiotic encapsulation by freeze-thaw method, and antibiotic sensitivity was determined using standard strains by disc diffusion and micro dilution method.

Research ethics

Permission to submit the survey was granted by the Ethics Review Committee of the MNUMS. The survey was granted in accordance with the rules and regulations.

Results

In liposome-encapsulated antibiotic sensitivity assays, azithromycin and clarithromycin did not form sacred circles, whereas doxycycline hyclate was sensitive by forming a 16 mm circle. Doxycycline hyclate encapsulated in liposomes formed a 16 mm circle with sensitive results, whereas blank

liposomes were inactive. When the rabbits were infected with a standard strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, the infected area was purulent 24 hours later. A cream containing antibiotics was started at this time. A deep wound was recovered after 12 days after the pus was removed. Nevertheless, after 24 days, the wound on the rabbit's infected part healed and the hair on the scraped part grew back.

Conclusion

According to the dilution method, liposome-encapsulated doxycycline hyclate inhibited bacterial growth at 2-fold lower doses than pure doxycycline hyclate. In experimental animal models, liposome-based antibiotic ointment has shown antibacterial activity.

Key words: phospholipids, liposomes, nanotechnology, antibiotic, MRSA

Pp. 3-8, Tables 2, Figures 1, References 18

Үндэслэл

Дэлхийн хүн төрөлхтөний өмнө антибиотикт тэсвэртэй нянгийн халдварын эмчилгээ нь тулгамдсан асуудал болсон бөгөөд 2050 он гэхэд антибиотикт тэсвэртэй нянгийн халдвараас шалтгаалсан нас баралт тэргүүлэх шалтгааны нэг болно гэж мэдээлсэн байна [1].

Антибиотикийн зохисгүй хэрэглээнээс хамаарч, халдварт өвчнийг үүсгэгч нян мутацилагдан, цаашид нянгийн тэсвэржилт үүссэнээр, тухайн өвчний эмчилгээнд зарцуулах хугацаа болон өртгийг ихэсгэн, зарим тохиолдолд нас баралтыг нэмэгдүүлэхэд хүргэж байгаа тул хүн амын орлогын түвшингээс үл хамааран улс орон бүрийн эрүүл мэндийн салбарын анхаарлын төвд байна. Түүнчлэн, нянгийн тэсвэржилт нь хүн амын эрүүл мэнд, хүнсний аюулгүй байдал, хүрээлэн буй орчин болон эдийн засагт сөргөөр нөлөөлж байна [2-4].

Монгол улсын 1000 хүн ам тутамд 64.41 нэгж тун антибиотик хэрэглэгдэж байна (2015) гэсэн үзүүлэлтээр, дэлхийд антибиотикийн хэрэглээгээр хамгийн өндөр улсын тоонд орж байна [5]. Өргөн хүрээний үйлдэлтэй антибиотикт тэсвэртэй нянууд олширсон бөгөөд, тухайлбал грам эерэг нянуудаас антибиотикт тэсвэртэй *Staphylococcus aureus* (MRSA) нь хамгийн түгээмэл, аюултай шалтгааны нэг болжээ. 2018 оны байдлаар, АНУ-д жилд 11000 орчим хүн MRSA-ийн халдвараас болж нас барсан [6]. Иймд антибиотикийн тэсвэржилтийг бууруулах, ижил төстэй эмчилгээ бий болгох хэрэгцээ шаардлага тулгарч байна.

Липосомыг эсийн гадаргуу, биомембраны олон шинж чанарыг төлөөлүүлсэн загвар систем болгон дэлхийн олон лабораториуд судалгаандаа амжилттай хэрэглэж байна.⁷ Энэ санааг 1965 онд английн судлаач Алейка

Бендхем (Bangyam A.D.) анх нийтэлсэн нийтлэлээс хойш липосомыг эм зөөвөрлөгч, дамжуулагч бодис болгон ашиглах судлаачдын сонирхол хурдацтай нэмэгдэж, эдгээр нь эмнэлгийн нөхцөлд хэрэглэхээр батлагдсан хамгийн алдартай нано-хэмжээст (NP) эм дамжуулах тогтолцоо болжээ [8]. Учир нь, нэгдүгээрт үйлдвэрлэлийн арга нь хялбар, хоёрдугаарт үйлчлэгч бодисын гидрофоб чанар, цэнэг, хэмжээ болон бусад физик-химийн шинж чанараас үл хамааран төрөл бүрийн эм, молекулыг бүрхэх чадвар, гуравдугаарт биологийн нийцтэй байдал зэрэгтэй холбоотой [9]. АНУ-ын Хүнс-Эмийн агентлагаас 1995 онд Doxil®-ийг (хорт хавдрын эсрэг доксорубин эмийн липосомын нэгдэл) зөвшөөрснөөс хойш липосомын эм дамжуулах тогтолцоог эмнэлзүйн хэрэглээнд зөвшөөрсөн байна [10].

Нянгийн тэсвэржилтийг бууруулах нь анагаахын шинжлэх ухааны тулгамдсан асуудлуудын нэг болсон тул сүүлийн үед липосомын болон бусад нанохэмжээст бүтцийг ашиглан антибиотик болон эмийн бодисыг зөөвөрлөн бай эсэд хүргэх туршилт судалгаа олноор хийгдэж байна [11]. Иймээс бид антибиотикийг липосомд суурилуулан нянгийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлох судалгааны ажлыг хийх үндэслэл болсон.

Зорилго

Липосомд суурилуулсан антибиотикийн гадаад бүтцийг тодорхойлж, нянгийн дарангуйлах идэвхийг үнэлэх.

Зорилт

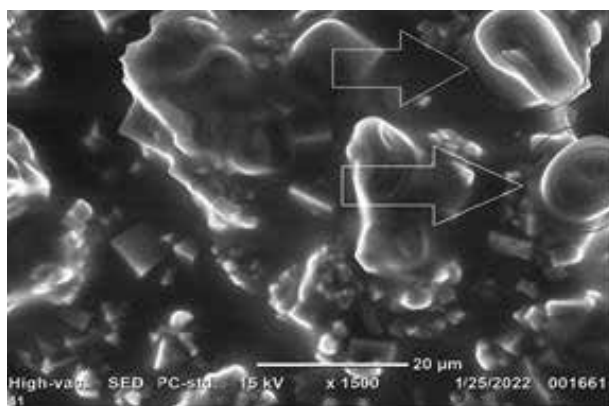
1. Өндөгний шараас фосфолипидийг ялган, антибиотикийг суурилуулан, гадаад бүтцийг тодорхойлох

2. Липосомд суурилсан антибиотикийн мэдрэг чанар, нянгийн дарангуйлах хамгийн бага тунг харьцуулах
3. Туршилтын амьтны арьсны эмгэг загварт липосомд суурилсан антибиотиктой тосон түрхцийн идэвхийг үнэлэх

Материал, арга зүй

Бид энэхүү судалгааг туршилт судалгааны загвараар, ШУА-ны Хими, химийн технологийн хүрээлэнгийн лаборатори, АШУҮИС-ийн эмийн технологийн лаборатори, бичил амьсудлалын лаборатори болон НЭМҮТ-ийн туршилтын амьтны лабораторийг түшиглэн хийж гүйцэтгэсэн.

Өндөгний шараас фосфолипидийг ялган, үечлэн ууршуулах аргаар липосомын нимгэн үе үүсгэсэний дараа, хөлдөөн гэсгээх аргаар антибиотикийг липосомд суурилуулав. Липосомд суурилуулсан антибиотикт мэдрэг чанарыг Кирби-Баурын болон бичил шингэрүүлэгийн аргаар *Staphylococcus aureus* болон MRSA-ийн стандарт омог ашиглан тодорхойллоо.



Метициллин тэсвэртэй *Staphylococcus aureus*-ийн стандарт омгоос (108 зэрэгт булингар) 2 мл-г авч туршилтын амьтан туулайн хэвлийн арьсанд тарьж, идээт үрэвслийг үүсгэсэн. Арьсны идээт үрэвслийг 48 цаг ажиглаад липосомд суурилуулсан доксоциклин хиклаттай тосон түрхцийг түрхэн, эдгэрэлтийн явцыг тодорхой үечлэлтэйгээр үнэлсэн бөгөөд нийт 24 хоногийн хугацаанд ажигласан. Судалгааны үр дүнгийн боловсруулалтад төвийн, хэлбэлзэлийн болон давтамжийн үзүүлэлтүүдийг тооцож, бүлэг хоорондын ялгааг ANOVA тестийг ашигласан. Ач холбогдолын түвшинг ($p < 0.05$) үнэн гэж үзлээ.

Судалгааны ёс зүй

АШУҮИС-ийн Ёс зүйн хяналтын хорооноос судалгаа явуулах зөвшөөрлийг авч судалгааны ёс зүйн дүрэм, журмын дагуу хийж гүйцэтгэсэн.

Үр дүн

Өндөгний шараас 31.2% фосфолипидийг ялгаж цэвэршүүлсэн. Цэвэр фосфолипидийн нимгэн үе үүсгэж, антибиотикийг нэмж, хөлдөөн хуурайшуулах аргаар антибиотикийг суурилуулсан липосомыг үүсгэсэн.

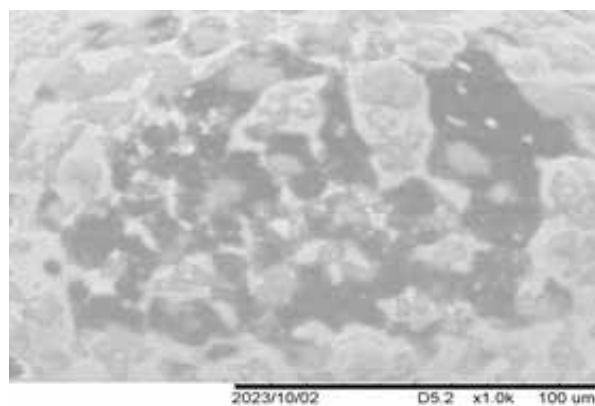


Figure 1. Appearance of liposomes in an electron microscope

Дээрх электрон микроскопын үр дүнгийн зурагнаас цайвраар дүрслэгдсэн хэсгүүд электрон нягт сийрэг байдлаар илэрхийлэгдэн липосом үүссэнийг баталж байна.

Липосомд суурилуулсан антибиотикуудын мэдрэг чанарыг тодорхойлоход азитромицин болон кларитромицин нь тэсвэртэй, харин доксицикин хиклат нь мэдрэг (16 мм) байсан тул липосомд суурилуулсан доксициклин хиклатыг цаашид туршилтад ашигласан.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) (mcg/ml) for free and liposomal formulations

Nº	Antibiotic	<i>S.aureus</i>	MRSA
1	Doxycycline /mcg/ml/	8	32
2	Liposomal doxycycline /mcg/ml/	4*	16*

*Significant differences were observed between groups ($p \leq 0.05$)

Staphylococcus aureus ATCC 29213 стандарт омогт доксициклин хиклатын өсөлт дарангуйлах бага тун 8 мкг/мл байсан бол доксициклин хиклат агуулсан липосом 4 мкг/мл байна. Харин MRSA ATCC 2758 стандарт омогт доксициклин хиклатын өсөлт дарангуйлах бага тун 32 мкг/мл байсан бол липосомд суурилуулсан доксициклин хиклат 16 мкг/мл байна.

Доксициклин хиклат агуулсан липосомын *Staphylococcus aureus* болон метициллин тэсвэртэй *Staphylococcus aureus*-ийн өсөлт дарангуйлах тунг тодорхойлоход энгийн доксициклин хиклатаас 2 дахин бага тунгаар үйлчилж байна.

Table 2. The healing status of the wound

No	Time	Wound	Tanned state	Skin condition	Growth of hair
1	12	Wound formed and oozed blood	-	-	-
2	24	Bloodshed	Tanned	-	-
3	48	Wound has grown	Deeply tanned		
Healing status					
1	12 days	Wound established	Tanned has cleared	Skin has started to heal	-
2	24 days	Wound closed	Puss ran out	Skin has healed	hair has started growing

Туулайнд метициллин тэсвэртэй *Staphylococcus aureus*-ын стандарт омгоор халдварлуулснаас хойш 24 цагийн дараа халдварласан хэсэг улайн цус хурж, идээлсэн байв. Харин 48 цагийн дараагаар харахад гүн идээлж, шарх үүссэн нь ажиглагдсан. Энэ үед липосомд суурилуулсан антибиотиктой тосыг түрхэж эхэлсэн. Ажиглалтаар 12 хоногийн дараа идээ арилж, шарханд тав тогтсон. Харин 24 хоногийн дараа туулайны халдварлуулсан хэсгийн шарх анж, хуссан хэсгийн үс эргэн ургасан.

Тосон түрхцийг түрхэж эхэлснээс хойш шарх томроогүй ба намжмал хэлбэрт шилжиж эдгэрэлтийн процесс эхэлсэн. Ажиглалтын явцад хүндрэл огт өгөөгүй бөгөөд 12 хоногоос туулайны биеийн үйл ажиллагаа эргэн хэвийн байдалдаа орсон.

Хэлцэмж

Namita Singh нарын судалгаагаар, пролипосомын тухай ойлголтыг түүний бүрэлдэхүүн хэсгүүд, бэлтгэх арга, шинж чанар, хэрэглээний талаар тайлбарласнаас гадна, липосомжуулсан бүтэц нь эмийн бодисыг зөөвөрлөх боломжтойг харьцуулсан байна [12].

Malekar SA нарын 2015 оны судалгаанд липосомын давхарга өөр өөр байдаг талаар дурдсан. Липосомын тогтвортой байдалд суурилуулах гэж буй эмийн бодисын хэмжээ чухал ач холбогдолтой болох нь харагдаж байна [13].

Cui H, Li W нарын 2016 оны судалгаагаар липосомын хэрэглээ нь нянгийн эсрэг биофильмийн үйл ажиллагааг ихээхэн хэмжээгээр нэмэгдүүлэх ба MRSA халдварын [14] эсрэг липосомд антибиотик суурилуулан хэрэглэхэд үр дүнтэй болох нь батлагдсан.

Hajiahmadi F нарын 2019 оны судалгаанд бактерийн эсрэг антибиотик нь өндөр үр нөлөөтэй, хоруу чанарыг бага болгох нь эмнэлзүйн хэрэглээнд чухал тул липосомд антибиотикийг суурилуулсан байна. Липосомоор антибиотикийг зөөвөрлөх боломжтой бөгөөд эмчилгээний үр дүнтэй байдлыг нотолсон байна [15].

Menka Drost нарын судалгаагаар уламжлалт эмчилгээнд бактерийн эсэргүүцэл нэмэгдэж, эмийн зохисгүй хэрэглээ болоод тунг ихэсгэх зэрэг сөрөг нөлөө ихтэй байгаа тул липосомоор антибиотик зөөвөрлөх нь онцгой ач холбогдолтой юм гэж дүгнэсэн [16].

Thapa RK нарын судалгаагаар CMP-Van-Lipo агуулсан коллаген дээр суурилсан [бэлдмэл MRSA-н халдвартай шархыг эмчлэхэд үр дүнтэй байгааг онцолсон бөгөөд липосомын хяналттай ялгаруулалт нь бактерийн эсрэг үр нөлөө in vitro болон in vivo туршилтаар баталсан байна [17].

Ching-Yun Hsu нарын 2017 онд хэвлүүлсэн судалгаагаар липосом нь хяналтын уусмал болон бусад липосомтой харьцуулахад, MRSA-ийн эсрэг үйлдэлтэй байсан бөгөөд хөхтөн

амьтдын арьсны эсэд элдэв хор хөнөөлгүй байгааг тодорхойлсон байна [18].

Манай судалгааны үр дүнд доксициклин хиклатын бактерийн эсрэг үйлчлэл чөлөөт хэлбэрээс липосомд суурилуулан туршихад эерэг (16мм) үр дүнтэй болсоныг харуулж байна. Бичил шингэрүүлэгийн аргаар нянгийн өсөлт дарангуйлах бага тунг тодорхойлоход энгийн доксициклин хиклатаас 2 дахин бага тунгаар үйлчилж байна. Мөн туршилтын амьтан буюу туулайнд арьсны эмгэг загвар үүсгэн, тосон түрхлэгийг 12 хоногийн турш түрхэж туршилтыг явуулахад идээ багасан тав тогтож эхэлсэн бол 20 хоногт шарх эдгэж, эргэн үс ургасан үр дүн гарсан. Ийнхүү бидний судалгааны үр дүнд, липосом нь тухайн агуулж буй эмийн үйлчлэгч бодисыг бай эсэд задралгүйгээр тогтвортой хүргэж байгааг нотолж байгаа нь дээрх судалгааны үр дүнгүүдтэй нийцэж байна.

Дүгнэлт:

1. Фосфолипидийг өндөгний шараас ялгаж авахад, гарц 31.2% байна. Хөлдөөн гэсгээх аргаар антибиотик суурилуулсан липосомыг үүсгэн, шинж чанарыг электрон микроскопоор тогтоов.
2. Доксициклин хиклат агуулсан липосом нь *Staphylococcus aureus* болон метициллинд тэсвэртэй *Staphylococcus aureus*-ийн өсөлтийг дарангуйлах бага тунг тодорхойлоход энгийн доксициклин хиклатаас 2 дахин бага тунгаар үйлчилж байгаа нь эмчилгээний үр дүнтэй болохыг харууллаа.
3. Тосон түрхцийг түрхэж эхэлснээс хойш арьсны шарх томроогүй ба үрэвсэл намжмал хэлбэрт шилжин, эдгэрэлтийн процесс эхэлж, 22 хоногийн дараа шарх анхж, хуссан хэсгийн үс эргэн ургасан. Липосомд суурилсан доксициклин хиклат MRSA-н эсрэг үр дүнтэй болох нь нотлогдлоо.

Ном зүй

1. ДЭМБ-ын нянгийн тэсвэржилтийн тандалт судалгааны тайлан 2014.
2. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015.
3. Wang H, Zhang X, Liu Y, Liu J. Stabilization of Liposomes by Perfluorinated Compounds. *ACS omega*. Nov 30 2018;3(11):15353-15360.
4. P. Trucillo, R. Campardelli, E. Reverchon, Supercritical CO₂ assisted liposomes

formation: Optimization of the lipidic layer for an efficient hydrophilic drug loading, *Journal of CO₂ Utilization*, Volume 18, 2017, Pages 181-188, ISSN 2212-9820, <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.02.001>.

5. Монгол улсын антибиотикийн хэрэглээний тандалт судалгааны тайлан 2015 он.
6. Gupta, T. T., Karki, S. B., Fournier, R., and Ayan, H. (2018). Mathematical modelling of the effects of plasma treatment on the diffusivity of biofilm. *Appl. Sci.* 8:1729. doi:10.3390/app8101729
7. Abd El-Fattah, A. I., Fathy, M. M., Ali, Z. Y., El-Garawany, A. E.-R. A., and Mohamed, E. K. (2017). Enhanced Therapeutic Benefit of Quercetin-Loaded Phytosome Nanoparticles in Ovariectomized Rats. *Chemico-Biological Interactions* 271, 30–38. doi: 10.1016/j.cbi.2017.04.026
8. Mostafa Jarahian., Nasrin Beheshtkhoo., Pooria Nakhaei., Ria Margiana., Dmitry O. Bokov., Walid Kamal Abdelbasset., Mohammad Amin JadidiKouhbanani., Rajender S. Varma., Farooq Marofi. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters with Emphasis on Cholesterol. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:705886, September 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.705886
9. Abd El-Fattah, A. I., Fathy, M. M., Ali, Z. Y., El-Garawany, A. E.-R. A., and Mohamed, E. K. (2017). Enhanced Therapeutic Benefit of Quercetin-Loaded Phytosome Nanoparticles in Ovariectomized Rats. *Chemico-Biological Interactions* 271, 30–38. doi: 10.1016/j.cbi.2017.04.026
10. Yechezkel (Chezy) Barenholz, Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *Journal of Controlled Release*, Volume 160, Issue 2, 2012, Pages 117-134, ISSN 0168-3659, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
11. Бор Л. Антибиотикийн хэрэглээ ба нянгийн тэсвэржилтийн судалгаа, 2019 он.
12. Namita Singh, Poonam Kushwaha, Usama Ahmad, Mohammad Abdullah., Proliposomes: An Approach for the Development of Stable Liposome. *Ars Pharm.* 2019; 60(4): 231-240
13. Malekar, S.A., Sarode, A.L., Bach, A.C. et al. Radio Frequency-Activated Nanoliposomes for Controlled Combination Drug Delivery. *AAPS*

- PharmSciTech 16, 1335–1343 (2015). <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0323-z>
14. Haiying Cui, Wei Li, Changzhu Li, Saritporn Vittayapadung & Lin Lin (2016) Liposome containing cinnamonoil with antibacterial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm, Biofouling, 32:2, 215-225, DOI: 10.1080/08927014.2015.1134516
 15. Hajjahmadi F, Alikhani MY, Shariatifar H, Arabestani MR, Ahmadvand D. The bactericidal effect of liposomal vancomycin as a topical combating system against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin wound infection in mice. Med J Islam Repub Iran. 2019 Dec 26;33:153. doi: 10.34171/mjiri.33.153. PMID: 32280659; PMCID: PMC7137850.
 16. Drost, M., Diamanti, E., Fuhrmann, K., Goes, A., Shams, A., Haupenthal, J., Koch, M., Hirsch, A. K. H., & Fuhrmann, G. (2021). Bacteroidetes Liposomes Improve Antibiotic Activity of a Novel Energy-Coupling Factor Transporter Inhibitor. Pharmaceutics, 14(1), 4. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010004>
 17. Thapa RK, Kiick KL, Sullivan MO. Encapsulation of collagen mimetic peptide-tethered vancomycin liposomes in collagen-based scaffolds for infection control in wounds. Acta Biomater. 2020 Feb;103:115-128. doi: 10.1016/j.actbio.2019.12.014. Epub 2019 Dec 13. PMID: 31843720; PMCID: PMC7044801.
 18. Ching-Yun Hsu, Shih-Chun Yang, Calvin T Sung, Yi-Han Weng & Jia-You Fang (2017) Anti-MRSA malleable liposomes carrying chloramphenicol for ameliorating hair follicle targeting, International Journal of Nanomedicine, 12:, 8227-8238, DOI: 10.2147/IJN.S147226

*Танилцаж нийтлэх санал өгсөн:
Анагаах ухааны доктор Д.Алтанцэцэг*