Липосомд суурилуулсан антибиотикийн нянгийн өсөлт дарангуйлах бага тунг тодорхойлсон дүн

Э.Энхтайван[1,2], М.Одончимэг[3], Д.Энхжаргал[1], О.Баатархүү[1], Б.Ариунсанаа[1]

[1]АШУҮИС,Био-АС, Бичил амь судлал, халдварын сэргийлэлт, хяналтын тэнхим
[2]Этүгэн их сургууль,
[3]ШУА, Хими, химийн технологийн хүрээлэн
Цахим шуудан: fbm21f005@gt.mnums.edu.mn, Утас: 89033998

Түлхүүр үг:

Нанопартикал
Эмийн бодис зөөвөрлөх
Ванкомицин
MRSA

Товч утга:

Үндэслэл: Антибиотикт тэсвэртэй, нянгийн шалтгаантай халдварууд нь хүн төрөлхтний хувьд аль хэдийн ноцтойгоор тавигдаж байгаа асуудал бөгөөд 2050 он гэхэд нас баралтын бусад бүх шалтгааныг гүйцэх магадлал өндөр гэж тэмдэглэгдсэн байна. Арьсны халдварын хамгийн түгээмэл шалтгаануудын нэг бол Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) юм. Энэ нь олон эмэнд тэсвэртэй тул эмчилгээ нь улам төвөгтөө болж байгааг судлаачид онцолсон байна. Нянгийн тэсвэржилт нь хүн амын эрүүл мэнд, хүнсний аюулгүй байдал, хүрээлэн буй орчин болон эдийн засагт сөргөөр нөлөөлж байна. Эмчилгээ, оношилгоонд нанотехнологийг ашиглах үндэс 40 гаруй жилийн өмнөөс тавигдаж, улмаар нано эмчилгээ, оношилгооны хэрэглээнд ашиглах боломж улам бүр нэмэгдсээр байна. Уламжлалт эмийн эмчилгээ нь эмийг аль болох бага тунгаар физиологийн эд, эсийг сонгон үйлчилдэг бөгөөд бусад эрхтэн тогтолцоонд гаж нөлөө үзүүлж, гэмтээдэг сул талтай. Тиймээс дэлхийн олон лабораториуд липосомыг эсийн гадаргуу, биомембраны олон шинж чанарыг төлөөлүүлсэн загвар систем болгон судалгаандаа амжилттай хэрэглэж байна. **Зорилго:** Липосомд суурилуулсан антибиотикийн гадаад бүтцийг тодорхойлж, нянгийн өсөлт дарангуйлах идэвхийг судлах. **Арга, аргачлал:** Энэхүү судалгааг туршилт судалгааны эмнэлзүйн туршилтын загвараар хийж гүйцэтгэсэн. Липосомын үндсэн түүхий эд болох фосфатидилхолинийг (лецитин) өндөгний шараас ялгасан. Үечлэн ууршуулах замаар фосфолипидийн нимгэн үеийг үүсгэн, антибиотикийг хөлдөөх-гэсгээх аргыг ашиглан суурилуулсан. Липосомд суурилуулсан антибиотикийн нянгийн өсөлт дарангуйлах хамгийн бага тунг (MIC)-ийг бичил шингэрүүлгийн аргаар стандарт омог ашиглан тодорхойлсон. **Үр дүн:** Өндөгний шараас ялгаж авсан фосфатидилхолиний гарц 37.9%-тай тодорхойлогдлоо. Нимгэн үеийн хроматограммаар фосфолипид бүхий фракцийн тархалтын фактор (Rf) нь 0.39 байна. Липосомд суурилуулсан ванкомициний нянгийн эсрэг нөлөө нь *in vitro* туршилтын үр дүнгээс харахад липосомд суурилуулсан ванкомицин нь чөлөөт ванкомицинээс илүү үр дүнтэй болох нь ажиглагдлаа. **Дүгнэлт:** Өндөгний шараас ялгасан лецитиний гарц 37.9% байлаа. Электрон микроскопт липосомын үүсэлт цайвраар дүрслэгдсэн хэсгүүд, электрон нягт сийрэг байдалтай тодорхойлогдсон нь липосом үүссэн болохыг баталж байна. Липосомд суурилуулсан ванкомиицин нь MRSA-ийн халдварын эмчилгээнд үр дүнтэй болох нь тодорхойлогдлоо.

Үндэслэл: Сүүлийн хэдэн арван жилд нянгийн халдвар нь хүний эрүүл мэндэд шинэ томоохон аюул занал учруулж, улмаар дэлхий даяар өвчлөл, нас баралтыг нэмэгдүүлж байна. Ихэнх эмгэг төрүүлэгч нян антибиотикт тодорхой хэмжээгээр тэсвэртэй байдгийг судлаачид тогтоосон. Дэлхийн Эрүүл Мэндийн

Байгууллагын (ДЭМБ) мэдээлснээр антибиотикийн тэсвэржилт нь орчин үеийн эрүүл мэндийн хамгийн том эрсдэлүүдийн нэг гэж тодорхойлоод байна.[1] Нянгийн эсрэг эмчилгээ хангалтгүй байдал мөн хүн, амьтдын эмчилгээнд антибиотикийн хэрэглээ их байгаа нь антибиотикт тэсвэржилтийг нэмэгдүүлэх асуудалд ихээхэн нөлөөлсөн болохыг судлаачид тэмдэглэсэн байна.[2]

Дэлхийд хүний төрөлхтний үхлийн хоёр дахь шалтгаан нь халдварт өвчин болдог. *Staphylococcus aureus (S. aureus)* нь арьс, зөөлөн эдийн халдвар, эндокардит, остеомиелит, нянгийн үрэвсэл, үхэлд хүргэдэг уушгины үрэвсэл зэрэг олон төрлийн халдварт өвчнийг үүсгэдэг хүнд маш түгээмэл тодорхойлогддог эмгэг төрүүлэгч бичил биет юм.[3] Сүүлийн жилүүдэд нянгийн хувьсал болон антибиотикийн зохисгүй хэрэглээнээс шалтгаалан *S. aureus*-ийн эмэнд тэсвэртэй байдал аажмаар нэмэгдэж, MRSA-ийн халдварын эсрэг эмчилгээг улам хүндрүүлж байгааг цөөнгүй судлаачид онцолсон байна.[4]

Өргөн хүрээний үйлдэлтэй антибиотикт тэсвэртэй нянгууд эрс олширсон. Тухайлбал грам эерэг нянгуудаас эмэнд тэсвэртэй *Staphylococcus aureus* нь хамгийн түгээмэл, аюултай шалтгаануудын нэг болжээ.[5] Ванкомицин, линезолид, даптомицин, тигециклин, телаванцин зэрэг антибиотикуудыг ихэвчлэн арьс, зөөлөн эд, мэс заслын дараах халдварын MRSA-ийн эсрэг хэрэглэдэг байна. АНУ-д 2018 оны байдлаар жилд 11000 орчим хүн MRSA-ийн халдвараас болж нас барж байгааг мэдээлжээ.[6]

Монгол улсад 2020 оны байдлаар антибиотикийн хэрэглээ 1000 хүн ам тутамд өдөрт 40.48 нэгж тун антибиотик оногдож байгаа тодорхойлсон энэ үзүүлэлт нь өмнөх оноос 11.3 нэгж тун нэмэгдсэн байна.[7]

Дэлхий дахинд антибиотикт тэсвэртэй нянгийн халдвар нэмэгдэж байгаа тул бай молекулдаа очиж үйлчлэх эмийн идэвхтэй зөөвөрлөлтийн механизм шаардлагатай байгааг олон тооны бүтээлд дурьдсан байна.[8-11] Тиймээс липосомын үндсэн түүхий эд болох фосфолипидийг гаргаж авах аргачлалыг тодорхойлж, антибиотик суурилуулах боломжийг судлах, мөн антибиотикт тэсвэртэй байдлыг шийдвэрлэх туршилт, нотолгоонд суурилсан үр дүнг тохийж байгаа нь уг судалгааг хийх үндэслэл болсон.

Зорилго: Липосомд суурилуулсан антибиотикийн гадаад бүтцийг тодорхойлж, нянгийн өсөлт дарангуйлах идэвхийг тодорхойлох.

Арга, аргачлал: Бид энэхүү судалгааг туршилт судалгааны эмнэлзүйн туршилтын загвараар ШУА-ны Хими, химийн технологийн хүрээлэнгийн лаборатори, АШУҮИС-ийн бичил амь судлалын лабораторийг түшиглэн хийж гүйцэтгэсэн.

Өндөгний шараас фосфолипидийг ялган, нимгэн үеийн болон хийн хроматограммын аргаар фосфолипидийг тодорхойлсон. Үечлэн ууршуулах аргаар липосомын нимгэн үе үүсгэсний дараа, хөлдөөн-гэсгээх аргаар антибиотикийг липосомд суурилуулж электрон микроскопоор гадаад бүтцийг тодорхойлсон. Липосомд суурилуулсан антибиотикт мэдрэг чанарыг бичил шингэрүүлэгийн аргаар *Staphylococcus aureus* болон MRSA-ийн стандартыг омог ашиглан нянгийн өсөлт дарангуйлах бага тунг тодорхойллоо.

Судалгаанд нийт 56 дээжийг тус бүр 10^1-10^6 хүртэл шингэрүүлэг хийж эерэг, сөрөг хяналтын хамт туршилтад хамруулсан. Туршилтын үр дүнг Clinical and Laboratory Standard Institute-M100-S27 (CLSI M100-S27) удирдамжийн шалгуур үзүүлэлттэй харьцуулж тогтоолоо.

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

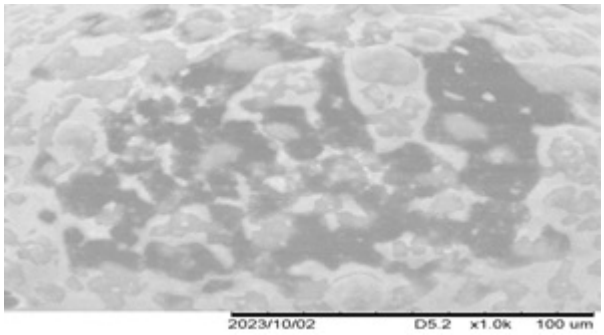
Судалгааны статистик боловсруулалтыг IBM SSPS-22.0 программаар боловсруулж бүлэг хоорондын ялгааг ANOVA тестийг ашиглан тооцсон. Бүлэг хоорондын ялгааг $p \leq 0.05$ үед статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай гэж үзэв.

Үр дүн: Өндөгний шараас 37.9% фосфолипидийг ялган цэвэршүүлсэн. Нимгэн үеийн хроматограммаар фосфолипид бүхий фракцийн тархалтын фактор (Rf) нь 0.39 байна. Хийн хроматограммаар ялгасан фосфолипидэд өөх тосны хүчлийг тодорхойлоход ханасан болон ханаагүй нийт 21 тосны хүчил тодорхойлогдсон. Ханасан тосны хүчил (SFA) нь 59.3% -ийг эзэлсэн бол нэг ханаагүй бүлэг агуулсан тосны хүчил (MUFA) 15.5%, олон ханаагүй тосны хүчил (PUFA) 25.2% хүртэл байгаа нь тодорхойлогдлоо. (Хүснэгт 1)

Хүснэгт 1. Фосфолипидийн найрлага дахь тосны хүчлийн хувь

Cmpd нэр	Бүс	Бүсийн %	Эзлэх %
$C_{4:0}$	4025	0.822	5.8
$C_{6:0}$	7654	1.5632	2.2
$C_{8:0}$	4349	0.8882	3.6
$C_{10:0}$	1621	0.3311	5.0
$C_{11:0}$	1856	0.3790	5.0
$C_{14:0}$	1929	0.3941	4.4
$C_{14:1}$	3783	0.7726	3.7
$C_{15:0}$	3102	0.6334	3.8
$C_{15:1}$	1115	0.2278	1.5
$C_{16:0}$	131946	26.948	2.9
$C_{17:0}$	1530	0.3126	14.9
$C_{17:1}$	1665	0.3400	2.1
$C_{18:0}$	101192	20.6669	7.1
$C_{18:1\ cis}/C_{18:1\ tra}$	57630	11.7700	14.9
$C_{18:2\ cis\ 9.12}/C_{18}$	2787	0.5691	2.1
$C_{18:3(6)}$	2265	0.4625	7.1
$C_{18:3(3)}$	1505	0.3074	7.2
$C_{20:0}$	4292	0.8765	6.6
Нийт SFA (%)			59.3
Нийт MUFA (%)			15.5
Нийт PUFA (%)			25.2

Үечлэн ууршуулж фосфолипидийн давхаргыг үүсгэн липосомыг гарган авсны дараа электрон микроскопт липосомын үүссэн байдлыг тодорхойлоход цайвраар дүрслэгдсэн хэсгүүд электрон нягт сийрэг байдлаар илэрхийлэгдэн липосом үүссэн болох нь батлагдлаа. (Зураг 1)



Зураг 1. Липосомын электрон микроскопт тодорхойлогдсон байдал

Бид бичил шингэрүүлэлтийн аргаар чөлөөт ванкомицин болон липосомоор бүрхэгдсэн ванкомицины нянгийн өсөлт дарангуйлах хамгийн бага тунг тодорхойлсон үр дүнд чөлөөт ванкомицин нь *S. aureus,* MRSA-д 10^1 шингэрүүлэгт 50 хувь өсөлт дарангуйлсан буюу статистик ач холбогдол бүхий ялгаагүй байна. Липосомд суурилуулсан ванкомицин *S. aureus,* MRSA-д 10^1, 10^2 шингэрүүлэгт 100% өсөлт дарангуйлсан буюу тус 2 бүлэгт статистик ач холбогдол бүхий ялгаагүй байна. Харин 10^3 шингэрүүлэгт *S. aureus* бол 100%, MRSA бол 70% өсөлт дарангуйлж байна. (Хүснэгт 2)

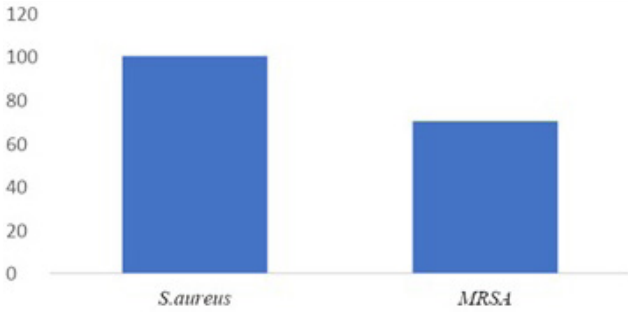
Хүснэгт 2. Антибиотик суурилуулсан липосомын нянгийн өсөлт дарангуйлах бага тун

шингэрүүлэг	Липосомтой ванкомицин**		Ванкомицин**	
	S. aureus	MRSA	*S. aureus*	MRSA
10^1	100%*	100%*	50%*	50%*
10^2	100%*	100%*	0	0
10^3	100%**	70%**	0	0
10^4	70%**	10%**	0	0
10^5	30%	0	0	0
10^6	0	0	0	0

**p≤0.05

*p≥0.05

Өсөлт дарангуйлах бага тун нь 10^1 шингэрүүлэгийн үед липосомтой ванкомицин нь чөлөөт ванкомицинээс 2 дахин бага тунгаар өсөлт дарангуйлж байгаа нь тодорхойлогдлоо. Липосомтой ванкомицинийн *S. aureus,* MRSA-н эсрэг өсөлт дарангуйлах бага тунг тооцоход 10^1, 10^2 шингэрүүлэгт ялгаагүй тунгаар, 10^3 шингэрүүлэгийн үед *S. aureus*-г MRSA-аас 1.4 дахин илүү дарангуйлж p=0.02 байна. (Зураг 2)



Зураг 2. Липосомтой ванкомицин 10^3 шингэрүүлэгийн үед *S. aureus,* MRSA -н өсөлт дарангуйлсан дүн

Хэлцэмж: Липосом нь эсийн ханийн бүтэцтэй төсөөтэй липидийн 2 давхаргаас тогтдог ба липосом дотор суурилуулсан антибиотикийг нянгийн эсийн эргэн тойронд эсвэл эс дотор зөөвөрлөн чөлөөлөх боломжийг олгодог, үүний үр дүнд антибиотик нь илүү урт хугацаанд өндөр концентрациар нянгийн эсэд үйлчилдгийг тогтоосон байна.[12]

Б.Ариунсанаа (1999) нар хөлдөөн-гэсгээх аргачлалын дагуу фосфолипидийг гаргаж авахад гарц 32% байгааг тогтоосон. Харин бид судалгаандаа тус хөлдөөн гэсгээх аргачлалын дагуу фосфолипидийг ялгахад 37.9% буюу үр дүн ойролцоо байна.[13]

Abdelkader H (2012) нарын липосомд антибиотик суурилуулан зөөвөрлөсөн судалгааны үр дүн бидний судалгааны үр дүнтэй дүйж байна.[14]

Surewaard B. (2016) нар, Liu Y (2019) нарын судалгааны үр дүнгээр антибиотикийг липосомд суурилуулсан хэлбэр нь чөлөөт антибиотикоос бага тунгаар үйлчилж байгааг тодорхойлсон нь бидний судалгааны үр дүнтэй нийцэж байна.[15,16]

Липосом нь эмийн бодисыг хамгаалан зорилтот эсүүдэд тогтвортой, идэвхийг алдагдуулгүй хүргэдэг болохыг олон судлаачид тэмдэглэсэн байна. Ихэнх судалгаанууд нь липосомын үндсэн түүхий эд болох лецитинийг худалдан авч ашигласан. Харин бид Монгол улсад худалдаалагдаж буй өндөгний шараас лецитинийг ялгаж, цэвэршүүлсэн нь бусад судалгаанаас онцлог, ялгаатай байлаа.

Дүгнэлт: Өндөгний шараас ялгасан лецитиний гарц 37.9% байлаа. Электрон микроскопт липосомын үүсэлт цайвраар дүрслэгдсэн хэсгүүд, электрон нягт сийрэг байдалтай тодорхойлогдсон нь липосом үүссэн болохыг баталж байна. Липосомд суурилуулсан ванкомиицин нь MRSA-ийн халдварын эмчилгээнд үр дүнтэй болох нь тодорхойлогдлоо.

Ном зүй:

1. *Rodríguez-Rojas, A.; Rodríguez-Beltrán, J.; Couce, A.; Blázquez, J. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. Int. J. Med. Microbiol. 2013, 303, 293−297.*
2. *Rahman, M. M., Alam Tumpa, M. A., Zehravi, M., Sarker, M. T., Yamin, M., et al.. (2022). An Overview of Antimicrobial Stewardship Optimization: The Use of Antibiotics in Humans and Animals to Prevent Resistance. Antibiotics (Basel, Switzerland), 11(5), 667. https://doi.org/10.3390/antibiotics11050667*
3. *Humphreys, H. (2012). Staphylococcus aureus: the enduring pathogen in surgery. Surgeon 10, 357–360. doi: 10.1016/j.*

surge.2012.05.003
4. Yunlei, Song Guanghui, Sun Meiling, Wang Juan, Wang Yi Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus Frontiers in Cellular and Infection Microbiology VOLUME=10, YEAR=2020, DOI=10.3389/fcimb.2020.00107, ISSN=2235-2988
5. Gupta, T. T., Karki, S. B., Fournier, R., and Ayan, H. (2018). Mathematical modeling of the effects of plasma treatment on the diffusivity of biofilm. Appl. Sci. 8:1729. doi:10.3390/app8101729
6. Эрүүл мэндийн хөгжлийн төв. Эмийн ашиглалтын байдлын тандалт, судалгааны газрын үйл ажиллагааны 2022 оны тайлан [2022]. http://mmra.gov.mn/
7. Бор Л. Антибиотикийн хэрэглээ ба нянгийн тэсвэржилтийн судалгаа, 2019 он.
8. Velavan P, Karuppusamy C, Venkatesan P. Nanoparticles as Drug Delivery Systems, 2015.
9. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad O.C. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. Advanced drug delivery reviews. 2014. 66. 2-25.
10. Mostafa Mabrouk, Diganta B, Zeinab A, Salem and Hanan H. Beherei. Nanomaterials for Biomedical Applications: Production, Characterization, Recent Trends and Difficulties 2021.
11. Burgess. R. Understanding nanomedicine: an introductory textbook. CRC Press.pp: 2012. 235-237.
12. Abhinay, Sharma., Deepak, Kumar, Arya., et al. 2012. Nano-technology for targeted drug delivery to combat antibiotic resistance. Expert Opinion on Drug Delivery 2012. https://doi.org/10.1517/17425247.2012.717927
13. Byambaa Ariunsanaa. The use of liposomes with immobilized antigens of the plague pathogen to assess their protective effect and in the production of hyperimmune sera, dissertation for the degree of candidate of medical sciences [dissertation]. Russian: Institute at Stavropol; 1999.
14. Abdelkader, H., & Alany, R. G. 2012. Controlled and continuous release ocular drug delivery systems: pros and cons. Current drug delivery 2012. https://doi.org/10.2174/156720112801323125
15. Surewaard, B. G., Deniset, J. F., Zemp, F. J., Amrein, M., Otto, M., Conly, J., Omri, A., Yates, R. M., & Kubes, P. 2016. Identification and treatment of the Staphylococcus aureus reservoir in vivo. The Journal of experimental medicine 2016. https://doi.org/10.1084/jem.20160334
16. Liu, Y., Shi, L., Su, L., van der Mei, H. C., Jutte, P. C., Ren, Y., & Busscher, H. J. 2019. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. Chemical Society Reviews 2019. https://doi.org/10.1039/C7CS00807D

Determination of the minimum inhibition concentration of antibiotics encapsulated in liposomes

Enkhtaivan E[1,2], Odonchimeg M[3], Enkhjargal D[1], Baatarkhuu O[1], Ariunsanaa B[1]

[1]MNUMS
[2 3]Etugen University
[3]Academy of Science, Institute of Chemistry and Chemical Technology
E-mail: fbm21f005@gt.mnums.edu.mn, Tel: +976-89033998

Background: Antibiotic-resistant bacterial infections are already a serious problem for humanity and are predicted to overtake all other causes of death by 2050. One of the most common causes of skin infections is Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The researchers pointed out that it is resistant to many drugs, making treatment even more difficult. Antimicrobial resistance has a negative impact on public health, food security, the environment, and the economy. The basis for using nanotechnology in treatment and diagnosis was laid more than 40 years ago, and the potential for use in nanotherapy and diagnosis continues to increase. Conventional drug treatment uses the smallest possible dose of drugs to selectively act on physiological tissues and cells, and has the disadvantage of causing side effects and damage to other organ systems. Therefore, many laboratories around the world are successfully using liposomes in their research as a model system representing many properties of cell surfaces and biomembranes.
Aim: To determine the external structure of liposome-encapsulated antibiotics and investigate their activity in inhibiting bacterial growth.
Materials and Methods: This study was conducted using an experimental research clinical trial design. Phosphatidylcholine (lecithin), the main raw material of liposomes, was isolated from egg yolk. Thin layers of phospholipids were formed by serial evaporation, and antibiotics were immobilized using a freeze-thaw method. The minimal bacterial growth inhibitory dose (MIC) of liposome-encapsulated antibiotics was determined by microdilution using standard strains.
Results: Egg yolk phosphatidylcholine yield was 37.9%. The distribution factor (Rf) of the fraction with phospholipids by thin-phase chromatogram is 0.39. Liposome-encapsulated vancomycin displayed higher antimicrobial activity in vitro than free vancomycin.
Conclusion: Egg yolk possesses 37.9% lecithin by weight. A light-colored area and sparse electron density were observed in the electron microscope, confirming the formation of liposomes. Liposome-encapsulated vancomycin has been shown to be effective in the treatment of MRSA infections.

Keywords: Nanoparticle, Drug delivery systems, Phospholipids, Vancomycin, MRSA