

---

Научная статья/Research Article

УДК 579.62:637.075

DOI: 10.36718/1819-4036-2023-2-158-164

Игорь Владимирович Левин<sup>1</sup>, Ольга Борисовна Иванченко<sup>2</sup>✉

<sup>1,2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>1</sup>igor.lyovin93@mail.ru

<sup>2</sup>obivanchenko@yandex.ru

## СОЗДАНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА И ОЦЕНКА ЕЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ В ОТНОШЕНИИ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Динамика увеличения антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов растет ежедневно, хотя за последние несколько десятилетий новых молекул антибиотиков разработано не было. Большие убытки в связи с этим несет животноводство. Одним из решений проблемы антибиотикорезистентности бактерий может быть улучшение уже существующих антимикробных препаратов посредством инкапсулирования действующего вещества в наноконтейнеры. Цель исследования – получение липосомальной формы левофлоксацина и оценка ее эффективности в отношении *Listeria monocytogenes*. В ходе работы рассмотрены подходы к созданию липосом как структурам, доставляющим антибиотики к месту действия. Пустые липосомы получали конвекционным методом. Для уменьшения размера липосом была использована обработка в ультразвуковой бане при температуре  $20 \pm 2$  °С и частоте звука 35 кГц. Включение левофлоксацина в липосомы проведено методом активной загрузки, созданием градиента концентрации сульфата аммония. Левофлоксацин растворяли в 1 % растворе уксусной кислоты, после чего инкубировали с ранее подготовленными липосомами. Были получены липосомы левофлоксацина с концентрацией 1 мг/мл и проведена оценка эффективности липосомального левофлоксацина в сравнении с обычной формой антибиотика и липосомами, не нагруженными антибиотиком по отношению к клеткам *Listeria monocytogenes*. Для оценки эффективности антибактериального эффекта была произведена совместная инкубация бактериальной суспензии микроорганизмов *Listeria monocytogenes* 766 в LMX Broth в течение 24 ч при 37 °С. Показано, что эффективность липосомальной формы отличается от классической. Снижение жизнеспособности тест-объекта при использовании нанокapsулированного левофлоксацина составляет 27,5 % в сравнении с использованием классического левофлоксацина. Липосомы без антибиотика не проявляли антибактериального эффекта вообще.

**Ключевые слова:** антибиотики, антибиотикорезистентность, липосомы, липосомальная форма, наноконтейнеры

**Для цитирования:** Левин И.В., Иванченко О.Б. Создание липосомальной формы левофлоксацина и оценка ее эффективности в отношении *Listeria monocytogenes* // Вестник КрасГАУ. 2023. № 2. С. 158–164. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-2-158-164.

Igor Vladimirovich Levin<sup>1</sup>, Olga Borisovna Ivanchenko<sup>2</sup>✉

<sup>1,2</sup>Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

<sup>1</sup>igor.lyovin93@mail.ru

<sup>2</sup>obivanchenko@yandex.ru

## LEVOFLOXACIN LIPOSOMAL FORM CREATION AND ITS EFFECTIVENESS EVALUATION AGAINST *LISTERIA MONOCYTOGENES*

The dynamics of the increase in antibiotic-resistant strains of microorganisms is growing daily, although over the past few decades, new antibiotic molecules have not been developed. As a result, animal husbandry bears great losses. One of the solutions to the problem of antibiotic resistance in bacteria can be to improve existing antimicrobials by encapsulating the active substance in nanocontainers. The aim of the study is to obtain a liposomal form of levofloxacin and evaluate its effectiveness against *Listeria monocytogenes*. In the course of the work, approaches to the creation of liposomes as structures that deliver antibiotics to the site of action are considered. Empty liposomes were obtained by the convection method. To reduce the size of the liposomes, ultrasonic bath treatment at a temperature of  $20 \pm 2$  °C and a sound frequency of 35 kHz was used. The inclusion of levofloxacin in liposomes was carried out by the active loading method, by creating an ammonium sulfate concentration gradient. Levofloxacin was dissolved in 1 % acetic acid solution, after which it was incubated with previously prepared liposomes. Liposomes of levofloxacin with a concentration of 1 mg/ml were obtained and the effectiveness of liposomal levofloxacin was evaluated in comparison with the usual form of the antibiotic and liposomes not loaded with the antibiotic in relation to *Listeria monocytogenes* cells. To assess the effectiveness of the antibacterial effect, a bacterial suspension of *Listeria monocytogenes* 766 microorganisms was co-incubated in LMX Broth for 24 hours at 37 °C. It was shown that the effectiveness of the liposomal form differs from the classical one. The decrease in the viability of the test-object when using nanocapsulated levofloxacin is 27.5 % in comparison with the use of classical levofloxacin. Liposomes without antibiotic showed no antibacterial effect at all.

**Keywords:** antibiotics, antibiotic resistance, liposomes, liposomal form, nanocontainers

**For citation:** Levin I.V., Ivanchenko O.B. Levofloxacin liposomal form creation and its effectiveness evaluation against *Listeria monocytogenes* // Bulliten KrasSAU. 2023;(2): 158–164. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2023-2-158-164.

**Введение.** Бактериальные инфекции были и остаются одной из важнейших современных проблем, уносят жизни и причиняют огромный экономический ущерб в совершенно разных областях экономики [1–4]. Активно используемые на сегодняшний день антимикробные препараты, из-за нерационального использования и приобретения микроорганизмами резистентности к ним, уже не являются столь эффективными, а дальнейшие прогнозы ученых пугают [5, 6].

Одним из наиболее спорных направлений использования антибиотиков является животноводство. Да, безусловно, в условиях до сих пор не решенной проблемы мирового голода, дефицита белка, увеличения потребности в продукции на фоне продолжающейся эпидемии COVID-19 и тяжелых геополитических обстоятельствах невозможно говорить об отказе от антимикробных препаратов или сокращении применения их в животноводстве, однако в странах Европы на сегодняшний день реализуются направленные на это стратегии [7, 8].

Также необходимо отметить, что увеличение темпов производства неизбежно влечет за собой

и увеличение контрафактной продукции, а именно – остаточное количество антибиотиков в продукции животного происхождения [9]. В ветеринарно-санитарных правилах установлены сроки, при которых животному перестают давать антибиотики в лечебных или профилактических целях перед убоем, однако на практике нередко ветеринарные врачи, боясь экономических потерь, данные сроки не соблюдают [10]. Результатом этого является наличие в готовом продукте остаточных количеств антибиотиков и дальнейшее накопление их в организме человека [11].

Для решения данных проблем возможно использование стратегии повышения эффективности антимикробных препаратов [12]. Одним из перспективных направлений по данной теме является инкапсулирование биологически активных веществ в наноразмерные контейнеры. Из большого разнообразия наноконтейнеров, которые рассматриваются в качестве переносчиков антибиотиков, особо выделяются на текущий момент липосомы [13].

Липосомы – однослойные или многослойные липидные везикулы, содержащие в своем внут-

реннем слое водное ядро. Строение липосомы позволяет включать в ее состав различные биологически активные вещества, что открывает широкие перспективы и позволяет добиться ряда преимуществ:

- снижение для организма токсичности многих препаратов позволяет использовать препараты с низким терапевтическим индексом;
- включение в липосомы препаратов повышает их защиту от инактивирующих их агентов;
- липосомы биосовместимы с клетками организма, так как основным компонентом для их создания являются природные фосфолипиды. Они не являются токсичными для организма, легко биodeградируемы, не вызывают иммунных реакций [14].

Также необходимо отметить, что липосомы возможно модифицировать для достижения желаемых функций, например покрытие липосом оболочкой из полиэтиленгликоля позволяет повысить устойчивость и предотвратить неспецифическое всасывание, а установление на поверхности липосомы специфического лиганда дает возможность осуществления направленного транспорта к клеткам-мишеням [13–15].

**Цель исследований** – разработка и получение липосомальной формы левофлоксацина и оценка ее эффективности в отношении *Listeria monocytogenes*.

**Задачи:** создание липосом и липосомальной формы левофлоксацина; исследование эффек-

тивности липосомальной формы левофлоксацина в отношении *Listeria monocytogenes*.

**Материалы и методы.** Для создания липосомальной формы левофлоксацина в исследовании использовались следующие материалы: соевый лецитин (Lecigran M, Россия), холестерин (PanReac Applichem, США), левофлоксацин (Millipore, Sigma-Aldrich, Supelco, США), сульфат аммония (Merk, Германия), хлороформ ХЧ (Компонент-реактив, Россия), физиологический раствор, уксусная кислота (PanReac Applichem, США).

Получение липосом с включенным антибиотиком проходило в несколько стадий. На первой стадии получали пустые липосомы конвекционным методом. Лецитин и холестерин с соотношении 7:3 помещали в круглодонную колбу и растворяли в хлороформе. Далее колбу помещали в роторный испаритель RV10 digital V (IKA, Германия) и отгоняли хлороформ под вакуумом при температуре 37 °С и скорости вращения 90 об/мин, до полного удаления хлороформа в колбе. Образовавшуюся липидную пленку регидратировали 0,3 М раствором сульфата аммония до концентрации липидов 1 мг/мл, в результате была получена суспензия липосом различного размера и строения (рис. 1). Для отделения не включившегося в липосомы сульфата аммония использовался метод диализного мешка.

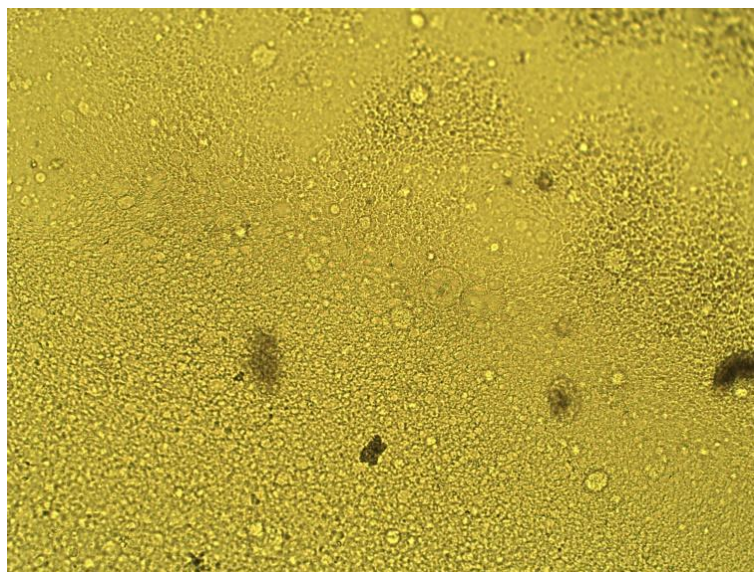


Рис. 1. Полученная суспензия «пустых» липосом разного размера и строения ( $\times 10$ )

Включение левофлоксацина в липосомы было проведено методом активной загрузки, созданием градиента концентрации сульфата аммония. Левофлоксацин растворяли в 1 % р-ре уксусной кислоты, после чего инкубировали с ранее подготовленными липосомами в течение 20 мин при температуре 50 °С на водяной бане ПЭ-4312 (Экохим, Россия) [16].

Количественная оценка микроорганизмов проводилась с помощью автоматического анализатора Тетро (bioMérieux, Франция) и коммерческого набора для оценки общей микрофлоры Тетро АС (bioMérieux, Франция). Исследования проводились в 5-кратной повторности. Рассчитывали среднее арифметическое значение, среднее квадратичное отклонение результатов и доверительный интервал при вероятности  $\alpha = 0,95$ .

**Результаты и их обсуждение.** Одним из наиболее важных свойств липосом является их размер [17]. Для уменьшения размера липосом была использована обработка в ультразвуковой бане Elmasonic S 150 (ELMA, Швейцария) при температуре  $20 \pm 2$  °С и частоте звука 35 кГц. Как известно, увеличение дисперсности липосом сопровождается увеличением оптической плотности. Время воздействия ультразвука определяли экспериментально. Замеры оптической плотности проводили на спектрофотометре UNICO 2800 (UNICO, США) при длине волны 640 нм и толщине слоя 10 мм. Обработку ультразвуком проводили до тех пор, пока оптическая плотность суспензии не переставала изменяться, что свидетельствует о достижении максимально возможной дисперсности системы при используемых технологических параметрах, результаты представлены на рисунке 2.

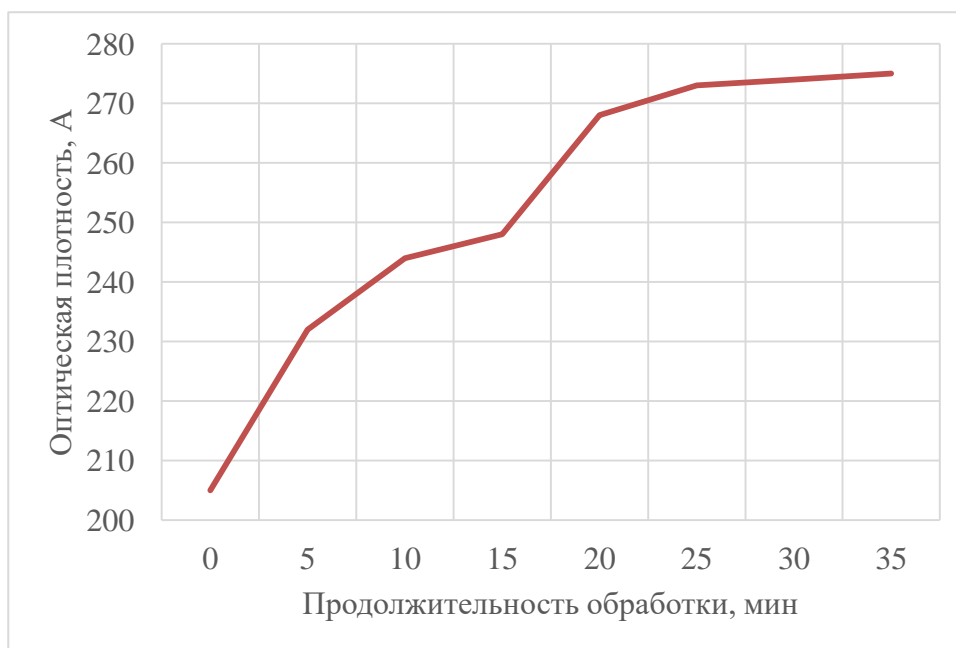


Рис. 2. Зависимость оптической плотности (А) от продолжительности ультразвуковой обработки

Для определения количества левофлоксацина, которое возможно включить в липосомы при используемом соотношении липидов, был проведен ряд опытов с различной концентрацией антибиотика.

После инкубации 1 мл опытной суспензии фильтровали через нейлоновые фильтрующие насадки с диаметром пор 0,2 мкм Millipore (Merk, Германия). Фильтрат исследовали на наличие

антибиотиков группы хинолонов методом мультиплексного иммунно-ферментного анализа на полуавтоматическом анализаторе Randox Envestigator (Randox, Великобритания).

При концентрации 1 мг/мл наблюдается наличие антибиотиков хинолоновой группы, что свидетельствует о максимально возможном пределе включения левофлоксацина в липосомы.

Для оценки эффективности антибактериального эффекта была произведена совместная инкубация бактериальной суспензии микроорганизмов *Listeria monocytogenes* 766 в LMX Broth (bioMérieux, Франция) в течение 24 ч при 37 °С. Исходное количество микроорганизмов в суспензии составляло  $10^5$  КОЕ/мл, с классической формой антибиотика, полученной липосомальной суспензией с антибиотиком и липосомальной суспензией без антибиотика. Поскольку минимальная подавляющая концентрация лево-

флоксацина в отношении *Listeria monocytogenes* составляет 1–2 мг/л, липосомальная суспензия с антибиотиком была разведена до концентрации 2 мкг/мл [18]. Полученные результаты представлены в таблице. Контрольный образец представляет собой питательную среду без добавлений, поскольку минимальный предел обнаружения прибора составляет 100 КОЕ/мл, то есть значение менее 100 интерпретируется как стерильный образец.

**Количественная оценка микроорганизмов *Listeria monocytogenes* после инкубации с классической формой антибиотика, липосомальной формой антибиотика и пустыми липосомами, КОЕ/мл**

Показатель	Значение
Липосомальная суспензия с левофлоксацином	$3,72 \cdot 10^6 \pm 0,78 \cdot 10^6$
Классический левофлоксацин	$5,1 \cdot 10^6 \pm 0,78 \cdot 10^6$
«Пустые» липосомы	Более $1,0 \cdot 10^8 \pm 0,78 \cdot 10^6$
Суспензия микроорганизмов без добавления левофлоксацина	Более $1,0 \cdot 10^8 \pm 0,78 \cdot 10^8$
Контроль	Менее 100

**Заключение.** В ходе работы были получены липосомы левофлоксацина с концентрацией 1 мг/мл и проведена лабораторная оценка эффективности липосомального левофлоксацина в сравнении с обычной формой антибиотика и липосомами, не нагруженными антибиотиком. По результатам исследования можно заключить, что по эффективности липосомальная форма значительно отличается от классической. Зафиксировано снижение числа жизнеспособных клеток на 27,5 %. Кроме этого, как показывают данные литературы, одним из главных преимуществ липосомальной формы лекарств является долгая элиминация из организма, следовательно, для более информативной и корректной оценки эффективности необходимо провести дальнейшие исследования с использованием макроорганизмов. Липосомы без антибиотика не проявляли антибактериального эффекта.

**Список источников**

1. Видовой состав и оценка производственных потерь при субклинических маститах коров в хозяйствах Костанайской области (Казахстан) / Г.Д. Чужебаева [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2021. № 11. С. 116–122.

- Disability weights for the Global Burden of Disease 2013 study / J.A. Salomon [et al.] // Lancet Glob Health. 2015. № 1. P. 712–723.
- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: государственный доклад / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. М., 2021. 256 с.
- Мухеева М.А., Мухеева И.В. Динамика рейтинга экономического ущерба от инфекционных болезней как критерий эффективности эпидемиологического контроля // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2020. № 2. С. 174–181.
- Намазова-Баранова Л.С., Баранов А.А. Антибиотикорезистентность в современном мире // Педиатрическая фармакология. 2017. № 14 (5). С. 341–354.
- Оценка риска появления резистентности к антибиотикам условно-патогенной и патогенной микрофлоры, выделяемой из продуктов животного происхождения / А.М. Меньдыбаева [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2022. № 2. С. 147–156. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-2-147-156.

7. Щепеткина С.В. Антибиотики в птицеводстве: запретить нельзя нормировать // Эффективное животноводство. 2019. № 4 (152). С. 80–84.
8. Ветвицкая А. Мифы и реальность замены антибиотиков в птицеводстве // Эффективное животноводство. 2020. № 7 (164). С. 52–57.
9. Батаева Д.С., Зайко Е.В. Риски, связанные с наличием в мясе и в продуктах убоя животных остаточных количеств антимикробных препаратов // Теория и практика переработки мяса. 2016. № 3. С. 4–12.
10. Детекция патогенных микроорганизмов рода *LISTERIA* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени / Е.В. Соколова [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2020. № 12. С. 117–125.
11. Заугольников М.А., Вистовская В.П. Изучение контаминации животноводческой продукции остаточными количествами антибиотиков // Acta Biologica Sibirica. 2016. № 3. С. 9–20.
12. Эффективность применения липосомальных форм антибиотиков при лечении некоторых инфекционных заболеваний в эксперименте / Г.К. Исмаилова [и др.] // Вестник ВолГМУ. 2007. № 1 (21). С. 69–72.
13. Липосомы как система таргетной доставки лекарственных средств (обзор) / В.С. Горбик [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. 2021. № 1. С. 33–41.
14. Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. 2006. № 1. С. 54–61.
15. Пат. 2014112220. Российская Федерация МПК А61К 39/39. Пегглированные липосомы для доставки кодирующей иммуноген РНК / Джилл Эндрю, Верма Аюш; заявитель и патентообладатель Новартис А.Г. № 2014112220/10; заявл. 31.08.2012; опубл. 07.03.2013, Бюл. № 28.
16. Создание и изучение свойств липосомальной формы левофлоксацина / Г.М. Сорокумова [и др.] // Тонкие химические технологии. 2013. № 8 (5). С. 72–76.
17. Характеристика и оценка стабильности липосомальных препаратов / М.В. Дмитриева [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 3. С. 36–44.
18. Падейская Е.Н. Фармакокинетика левофлоксацина как основа режима дозирования и оптимизации схем лечения // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2005. № 2. С. 58–71.

## References

1. Vidovoj sostav i ocenka proizvodstvennyh poter' pri subklinicheskikh mastitah korov v hozyajstvah Kostanajskoj oblasti (Kazahstan) / G.D. Chuzhebaeva [i dr.] // Vestnik KrasGAU. 2021. № 11. S. 116–122.
2. Disability weights for the Global Burden of Disease 2013 study / J.A. Salomon [et al.] // Lancet Glob Health. 2015. № 1. P. 712–723.
3. O sostoyanii sanitarno-`epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossijskoj Federacii v 2020 godu: gosudarstvennyj doklad / Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitelej i blagopoluchiya cheloveka. M., 2021. 256 s.
4. Miheeva M.A., Miheeva I.V. Dinamika rejtinga `ekonomicheskogo uscherba ot infekcionnyh boleznej kak kriterij `effektivnosti `epidemiologicheskogo kontrolya // Zhurnal mikrobiologii, `epidemiologii i immunobiologii. 2020. № 2. S. 174–181.
5. Namazova-Baranova L.S., Baranov A.A. Antibiotikorezistentnost' v sovremennom mire // Pediatricheskaya farmakologiya. 2017. № 14 (5). S. 341–354.
6. Ocenka riska poyavleniya rezistentnosti k antibiotikam uslovno-patogennoj i patogennoj mikroflory, vydelyaemoj iz produktov zhivotnogo proishozhdeniya / A.M. Mendybaeva [i dr.] // Vestnik KrasGAU. 2022. № 2. S. 147–156. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-2-147-156.
7. Schepetkina S.V. Antibiotiki v pticevodstve: zapretit' nel'zya normirovat' // `Effektivnoe zhivotnovodstvo. 2019. № 4 (152). S. 80–84.
8. Vetvickaya A. Mify i real'nost' zameny antibiotikov v pticevodstve // `Effektivnoe zhivotnovodstvo. 2020. № 7 (164). S. 52–57.
9. Bataeva D.S., Zajko E.V. Riski, svyazannye s nalichiem v myase i v produktah uboya zhivotnyh ostatochnyh kolichestv antimikrobnym

- preparatov // Teoriya i praktika pererabotki myasa. 2016. № 3. S. 4–12.
10. Detekciya patogennyh mikroorganizmov roda *LISTERIA* metodom polimeraznoj cepnoj reakcii v real'nom vremeni / E.V. Sokolova [i dr.] // Vestnik KrasGAU. 2020. № 12. S. 117–125.
  11. Zaugol'nikova M.A., Vistovskaya V.P. Izucheniye kontaminacii zhivotnovodcheskoj produkcii ostatochnymi kolichestvami antibiotikov // Acta Biologica Sibirica. 2016. № 3. S. 9–20.
  12. 'Effektivnost' primeneniya liposomal'nyh form antibiotikov pri lechenii nekotoryh infekcionnyh zabolevanij v `eksperimente / G.K. Ismailova [i dr.] // Vestnik VolGМУ. 2007. № 1 (21). S. 69–72.
  13. Liposomy kak sistema targetnoj dostavki lekarstvennyh sredstv (obzor) / V.S. Gorbik [i dr.] // Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal. 2021. № 1. S. 33–41.
  14. Tolcheva E.V., Oborotova N.A. Liposomy kak transportnoe sredstvo dlya dostavki biologicheski aktivnyh molekul // Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal. 2006. № 1. S. 54–61.
  15. Pat. 2014112220. Rossijskaya Federaciya MPK A61K 39/39. Pegtirovannye liposomy dlya dostavki kodiruyushej immunogen RNK / Dzhill `Endryu, Verma Ayush; zayavitel' i patentoobladatel' Novartis A.G. № 2014112220/10; zayavl. 31.08.2012; opubl. 07.03.2013, Byul. № 28.
  16. Sozdanie i izucheniye svojstv liposomal'noj formy levofloksacina / G.M. Sorokoumova [i dr.] // Tonkie himicheskie tehnologii. 2013. № 8 (5). C. 72–76.
  17. Harakteristika i ocenka stabil'nosti liposomal'nyh preparatov / M.V. Dmitrieva [i dr.] // Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv. 2018. № 3. S. 36–44.
  18. Padejskaya E.N. Farmakokinetika levofloksacina kak osnova rezhima dozirovaniya i optimizacii shem lecheniya // Farmakokinetika i farmakodinamika. 2005. № 2. S. 58–71.

Статья принята к публикации 22.11.2022 / The article accepted for publication 22.11.2022.

Информация об авторах:

**Игорь Владимирович Левин**<sup>1</sup>, магистрант высшей школы биотехнологии и пищевых производств  
**Ольга Борисовна Иванченко**<sup>2</sup>, доцент высшей школы биотехнологии и пищевых производств,  
кандидат биологических наук, доцент

Information about the authors:

**Igor Vladimirovich Levin**<sup>1</sup>, Master Student at the Higher School of Biotechnology and Food Production  
**Olga Borisovna Ivanchenko**<sup>2</sup>, Associate Professor at the Higher School of Biotechnology and Food Production, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor

