

ностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: tavaza@ngs.ru.

Позднякова Ирина Анатольевна, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: irapozd1963@yandex.ru.

Степанова Екатерина Алексеевна, заведующая лабораторией оптической спектроскопии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: carpicon@mail.ru.

УДК 615.281.9

ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ В ОТНОШЕНИИ ПЕРИОДИЧЕСКИХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

А.Г. Мирошниченко, В.М. Брюханов, В.Ю. Перфильев

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Алтайский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Барнаул

E-mail: pharmacologist@ya.ru

SPECIAL ASPECTS OF STUDYING THE PHARMACOLOGICAL MODULATION OF ACTIVITY OF ANTIBACTERIAL AGENTS IN PERIODIC CULTURES OF MICROORGANISMS

A.G. Miroshnichenko, V.M. Bryukhanov, V.Yu. Perfiliev

Altai State Medical University, Barnaul

Цель: выявление особенностей изучения фармакологической модуляции активности антибактериальных средств (АБС) в отношении периодических культур микроорганизмов. Материал и методы. Исследование проведено на контрольном штамме *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Изучали динамику развития указанного штамма в минеральной питательной среде М9 в течение 24 ч в присутствии сублетальных концентраций АБС (гентамицин, цефтазидим, ципрофлоксацин), составляющих 50% от минимальной подавляющей концентрации (МПК). В качестве модулятора использовался антиоксидант метилэтилпиридинол в концентрациях 0,25–4 мМ. Результаты. Установлено, что в присутствии сублетальных концентраций гентамицина или ципрофлоксацина развития штамма подчиняется классической кривой развития периодической культуры. Метилэтилпиридинол снижает действие гентамицина и цефтазида, но усиливает антибактериальный эффект ципрофлоксацина. В смесях, содержащих гентамицин, через 24 ч после начала инкубации происходит реверсивная смена оптической плотности бактериальной суспензии. Динамика развития бактерий в смесях, содержащих цефтазидим, не описывается классической кривой роста и имеет интермиттирующий характер. Заключение. Для оценки влияния фармакологического вещества на активность АБС в отношении периодической культуры микроорганизма необходимо динамическое наблюдение за развитием инкубационных смесей. Детекция результатов по конечной точке может приводить к их ошибочной интерпретации.

Ключевые слова: лекарственное взаимодействие, периодическая культура, антибактериальная активность, *Klebsiella pneumoniae*.

Aim: The aim of the study was to identify special aspects of investigating the pharmacological modulation of the activity of antibacterial agents in periodic cultures of microorganisms. Materials and Methods. The study was conducted by using the control strain of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. We studied the growth dynamics of the strain in the M9 mineral medium for 24 hours in the presence of sublethal concentrations of antibacterial agents (gentamicin, ceftazidime, ciprofloxacin), constituting 50% of the minimum inhibitory concentration. Antioxidant methylethylpyridinol in concentrations of 0.25–4 mM was used as a modulator. Results. The study showed that, in the presence of sublethal concentrations of gentamicin or ciprofloxacin, the strain development complied with the classic growth curve for periodic culture. Methylethylpyridinol reduced the effects of gentamicin and ceftazidime, but enhanced the antibacterial effect of ciprofloxacin. In the mixtures containing gentamicin, a reversible change in the optical density of the bacterial suspension was observed 24 hours after beginning the incubation. The growth dynamics of bacteria in the mixtures containing ceftazidime was not described by classic growth curve and was intermittent. Conclusion. To assess the effects of pharmacological substances on the activity of antibacterial agents in periodic cultures of microorganisms, dynamic monitoring of the incubation mixtures is necessary. Acquisition of the results only at endpoint can lead to erroneous data interpretation.

Key words: drug interactions, periodic culture, antibacterial activity, *Klebsiella pneumoniae*.

Введение

Резистентность патогенных микроорганизмов к АБС является одной из наиболее значимых проблем медицины. Угроза формирования и распространения антибактериальной резистентности была осознана научным сообществом практически сразу же после появления первых антибиотиков, однако в течение многих лет проблема решалась за счет разработки и внедрения новых препаратов, преодолевающих известные механизмы устойчивости [4]. С учетом снижающейся скорости появления новых АБС совершенствование лечения с использованием уже существующих препаратов является необходимым. Одним из путей такого совершенствования может стать модуляция активности АБС с помощью других фармакологических веществ.

Для оценки влияния веществ на активность АБС необходимым является проведение исследований *in vitro*. На сегодняшний день в микробиологических лабораториях используются два способа определения чувствительности микроорганизмов к АБС – диско-диффузионный метод (ДДМ) и метод серийных разведений. ДДМ основан на регистрации диаметра зоны подавления роста вокруг бумажного диска с антибактериальным веществом и является наиболее часто используемым методом, однако не позволяет точно оценить МПК средства и имеет ряд существенных недостатков [3]. Отметим также, что изучение модуляторов АБС с использованием метода ДДМ затруднительно, так как требует добавления веществ в процессе приготовления питательной среды, в результате чего их активность может измениться. Изучение влияния различных концентраций модуляторов значительно увеличивает трудоемкость метода.

Наиболее подходящим методом, модификация которого может быть использована для исследования модуляторов активности АБС, является метод серийных разведений. Этот метод предполагает изучение активности веществ на периодическую культуру изучаемого микроорганизма.

Цель исследования: выявление особенностей изучения фармакологической модуляции активности АБС в отношении периодических культур микроорганизмов.

Материал и методы

Исследование проведено на примере контрольного штамма *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 из коллекции кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России. Для инкубации использовали минеральную питательную среду, для приготовления которой готовили основной раствор, содержащий в 1 л 64 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 г KH_2PO_4 , 2,5 г NaCl , 5,0 г NH_4Cl (Sigma-Aldrich, США). Указанный раствор стерилизовали путем автоклавирования. Перед использованием 50 мл раствора в асептических условиях смешивали с 175 мл дистиллированной воды, 0,5 мл 1 М стерильного раствора MgSO_4 (Sigma-Aldrich, США), 5 мл 20%-го стерильного раствора глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 0,025 мл 1 М стерильного раствора хлорида кальция (Sigma-Aldrich, США). Дистиллированная вода и указанные растворы стерилизовались путем автоклавирования.

Использование мясопептонного бульона и других протеинсодержащих питательных сред, традиционно применяющихся для метода серийных разведений, мы посчитали недопустимым, так как содержащиеся в них полиамины могут значительно изменять чувствительность микроорганизмов к АБС [1, 5]. С использованием описанной питательной среды для исследуемого штамма были найдены МПК гентамицина (AppliChem, Германия), ципрофлоксацина (Sigma-Aldrich, США) и цефтазидима (Sigma-Aldrich, США).

На первом этапе эксперимента мы изучали влияние метилэтилпиридинола (“Эмоксипин”, ФГУП МЭЗ, Россия) на развитие периодической культуры *Klebsiella pneumoniae*. Из штамма готовили суточную культуру инкубацией на скошенном агаре при 35 °C, которую использовали для приготовления инокулята – бактериальной суспензии в 0,9%-м растворе хлорида натрия с оптической плотностью 1,0 по Мак-Фарланду. После инокуляции бактериальной суспензии (0,5 мл суспензии + 3 мл среды) смесь, содержащую метилэтилпиридинол в концентрациях 0,25, 0,5, 1, 2 и 4 мМ, инкубировали в воздушном термостате при 35 °C в течение 24 ч. Для оценки развития штаммов использовали аппарат для определения оптической плотности бактериальных взвесей Densi-lameter (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Измерения проводились каждые 2 ч в течение 12 ч, а также через 24 ч инкубации. Полученные данные сравнивали с данными контрольных инкубационных смесей, не содержащих антиоксидант.

На втором этапе исследования проводилась оценка влияния метилэтилпиридинола на активность антибактериальных веществ *in vitro*. Для этого в инкубационные смеси, приготовленные вышеописанным способом, дополнительно вводились АБС до конечных сублетальных концентраций, составляющих 50% от МПК. Наблюдение за динамикой развития периодических культур проводили аналогично исследованию первого этапа. Данные прироста бактериальной биомассы в присутствии метилэтилпиридинола и антибактериальных веществ сравнивали с данными контрольных инкубационных смесей, в которые вместо метилэтилпиридинола добавлялся стерильный 0,9%-й раствор хлорида натрия.

Для расчетов использовались компьютерные программы Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, США) и SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., США) для Windows. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни, различия показателей считали значимыми при $p \leq 0,05$ [2].

Результаты и обсуждение

Исследование влияния метилэтилпиридинола на развитие периодической культуры штамма продемонстрировало его бактериостатические свойства, закономерно усиливающиеся с увеличением концентрации антиоксиданта в инкубационной среде (рис. 1). При этом отмечаются единичные проявления пробактериальных свойств метилэтилпиридинола в низких концентрациях в первые 4 ч эксперимента. Выявленные бактериостатические свойства антиоксиданта вызвали интерес с точки зрения его возможного синергизма с АБС средствами.

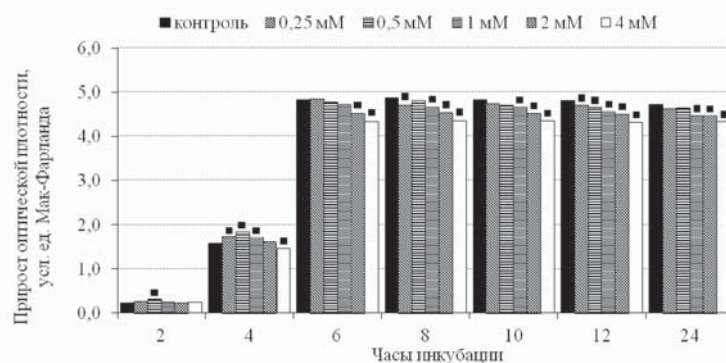


Рис. 1. Влияние метилэтилпиридинола на развитие периодической культуры *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (■ – статистически значимое различие по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$)

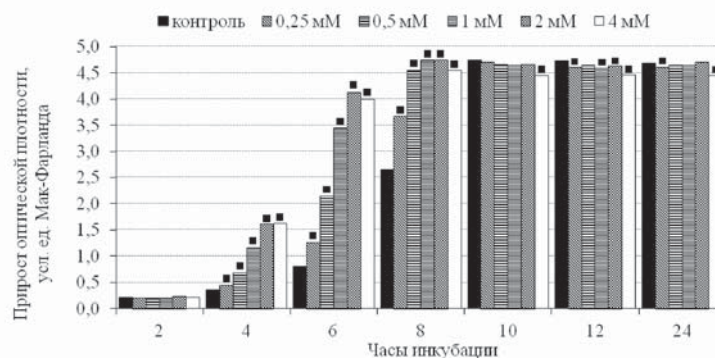


Рис. 2. Влияние метилэтилпиридинола на развитие периодической культуры *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 в присутствии 0,5 мг/л гентамицина (■ – статистически значимое различие по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$)

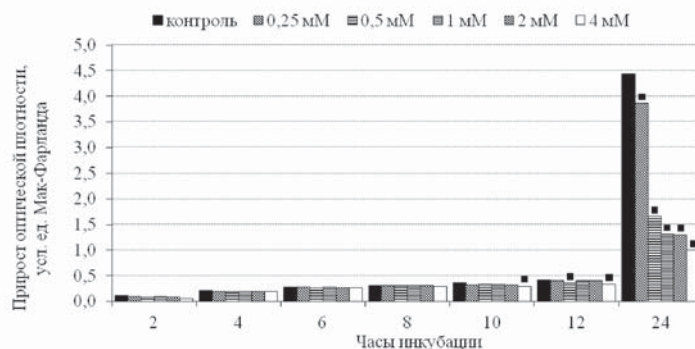


Рис. 3. Влияние метилэтилпиридинола на развитие периодической культуры *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 в присутствии 0,125 мг/л ципрофлоксацина (■ – статистически значимое различие по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$)

Вопреки ожиданиям, нарастание концентрации антиоксиданта вызывает прямопропорциональную потерю чувствительности бактериальной культуры к гентамицину, впервые фиксируемую через 4 ч после начала инку-

бации (рис. 2). Это может свидетельствовать, с одной стороны, о ключевой роли усиления процессов свободнорадикального окисления в реализации антибактериального действия гентамицина [7], с другой, – о возможной конкуренции метилэтилпиринола и гентамицина за мишень. Обращает на себя внимание динамика развития культуры. Если в течение первых 8 ч наблюдений описанный антагонизм исследуемых веществ является очевидным, то измерение оптической плотности через 12 и 24 ч за счет реверсивного изменения формирует противоположную картину.

С позиции антагонизма к АБС, обладающим прооксидантным действием, особый интерес представляет собой также и взаимодействие метилэтилпиридинола и ципрофлоксацина. Известно, что последний, как и гентамицин, в своем бактерицидном действии имеет значительный пероксидационный компонент, связанный с дестабилизацией железо-серных кластеров у бактерий [6]. Как и в случае с гентамицином, логично было бы ожидать снижение активности ципрофлоксацина под влиянием антиоксиданта. Однако результаты наблюдения за динамикой развития штамма указывают на усиление действия АБС в присутствии метилэтилпиридинола. При этом измерение оптической плотности бактериальной биомассы через 24 ч после начала эксперимента сохраняет описанный профиль влияния антиоксиданта, впервые фиксируемый к 10-му часу инкубации (рис. 3).

В инкубационных смесях, содержащих цефтазидим, наблюдается необычная динамика развития штамма, отличная от классических периодов роста периодических бактериальных культур (рис. 4). Цефтазидим вследствие особенностей механизма действует преимущественно в период активного размножения бактерий, т.е. в лог-фазу. Поскольку метилэтилпиридинол оказывает бактериостатическое действие, лог-фаза в соответствующих пробах угнетена, что создает картину усиления действия антибиотика. Далее происходит резкая смена эффекта, которая может объясняться сочетанием двух факторов: бактериостатического влияния антиоксиданта на бактерии, за счет которого затруднено действие цефтазидима, и потерей активности антибиотика с течением времени [8], в результате чего микроорганизмы, находящиеся в состоянии бактериостаза, позднее получают возможность беззатратного размножения. В результате на 4-м ч и через сутки после начала инкубации создается картина усиления действия цефтазидима, с 8-го по 12-й ч – антагонизма антиоксиданта и антибиотика.

Полученные результаты продемонстрировали, что исследования активности веществ на периодических бактериальных культурах должны сопровождаться непрерывным наблюдением за их ростом вплоть до стабилизации стационарной фазы. Это обусловлено несколькими причинами:

1. Ограниченностью питательной среды, связанной с определенным запасом питательных веществ, необходимых для построения биомолекул вновь образуемых бактериальных клеток.

Вещества, ускоряющие рост бактериальной культуры, приводят к более раннему наступлению стационарной фазы и, соответственно, фазы отмирания. Естественно, что измерение количества клеток после окончания стационарной фазы в таком случае покажет ложно более низкий результат по сравнению с контрольной культурой, не подвергшейся воздействию вещества-стимулятора (рис. 5).

2. Отсутствием элиминации токсических продуктов метаболизма бактерий.

Интенсивное размножение стимулированных бактериальных культур сопровождается не только повышенным потреблением питательных веществ, но и повышением образования токсических продуктов жизнедеятельности. Это также способствует более раннему наступлению фазы отмирания и получению ложных результатов (рис. 5).

3. Нестабильностью веществ-модуляторов.

Концентрация веществ, устойчивость которых в условиях инкубации невысока, с течением времени убывает, и, соответственно, снижается влияние таких веществ на развитие бактериальной культуры. Если время инкубации превышает время устойчивости вещества в заданных условиях, вывод о его влиянии на развитие бактериальной культуры, сделанный на основании однократной оценки по окончании эксперимента, будет некорректным. Примером такого вещества является цефтазидим, в присутствии которого динамика роста бактериальной культуры может приобретать специфический характер.

4. Преимущественным влиянием вещества на размножающиеся бактерии.

Модуляцию активности АБС, действующих на интенсивно делящиеся бактерии, можно установить только в период лог-фазы развития культуры, наступающей обычно через 2–4 ч после начала инкубации. Поэтому в интерпретации результатов и установления типа модулирующего влияния бактериостатических агентов, таких как метилэтилпиридинол, на активность цефтазидима возникают определенные трудности. Исходя из традиционного подхода оценки развития культуры по результатам суточной инкубации, следовало бы сделать вывод о том, что метилэтилпиридинол прямо пропорционально своей концентрации снижает активность цефтазидима. Од-

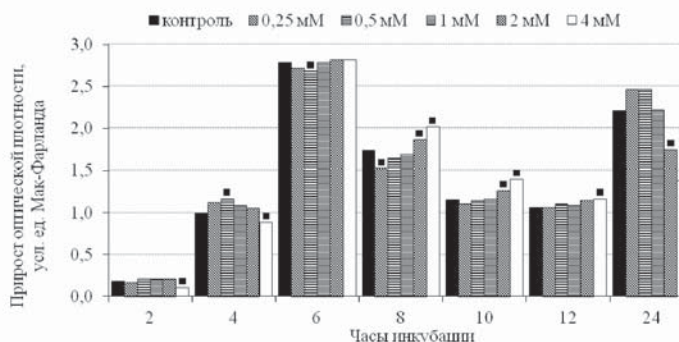


Рис. 4. Влияние метилэтилпиридинола на развитие периодической культуры *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 в присутствии 4 мг/л цефтазидима (% – статистически значимое различие по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$)

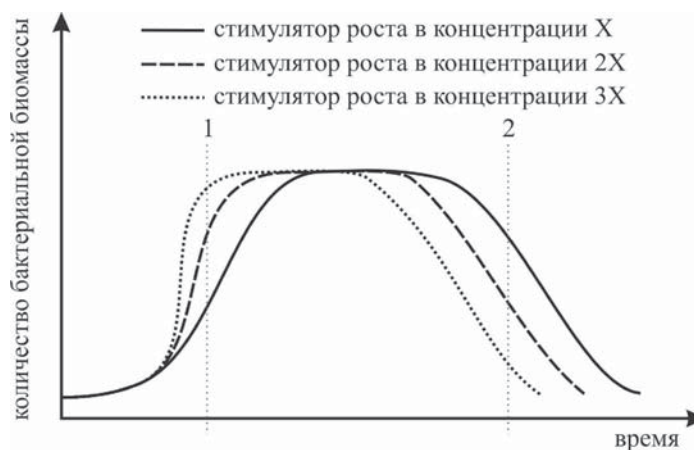


Рис. 5. Ошибки интерпретации при воздействии стимулятора роста периодической бактериальной культуры: 1 – точка фиксации стимуляции роста; 2 – возможная точка фиксации (ошибочная)

нако при динамическом анализе становится ясно, что указанный антиоксидант оказывает противоположное влияние.

Таким образом, для оценки влияния фармакологического вещества на активность АБС в отношении периодической культуры микроорганизма необходимо динамическое наблюдение за развитием инкубационных смесей. Детекция результатов по конечной точке может приводить к их ошибочной интерпретации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Лизиндекарбоксилазная активность как фактор резистентности *Escherichia coli* к фторхинолонам // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 5. – С. 636–640.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 1990 – 352 с.
3. Решедько Г.К., Стецюк О.У. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным

- методом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3, № 4. – С. 348–354.
4. Стратегия и тактика рационального применения антимикробных средств в амбулаторной практике: Российские практические рекомендации / под ред. С.В. Яковлева, С.В. Сидоренко, В.В. Рафальского, Т.В. Спичак. – М. : Издательство Престо, 2014. – 121 с.
 5. Ткаченко А.Г., Шумков М.С., Ахова А.В. Адаптивные функции полиаминов *E. coli* при сублетальных воздействиях антибиотиков // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 1. – С. 32–41.
 6. Goswami M., Mangoli S.H., Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – Vol. 50. – P. 949–954.
 7. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Wierzbowski J. et al. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death // Cell. – 2008. – Vol. 135. – P. 679–690.
 8. Servais H., Tulkens P.M. Stability and compatibility of ceftazidime administered by continuous infusion to in-tensive care patients // Antimicrob. Agents and Chemother. – 2001. – Vol. 45, No. 9. – P. 2643–2647.

Поступила 08.04.2016

Сведения об авторах

Мирошниченко Александр Геннадьевич, канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России.

Адрес: 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.

E-mail: pharmacologist@ya.ru.

Брюханов Валерий Михайлович, докт. мед. наук, профессор кафедры фармакологии ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России.

Адрес: 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.

E-mail: bvm@agmu.ru.

Перфильев Вячеслав Юрьевич, преподаватель кафедры фармакологии ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России.

Адрес: 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.

E-mail: 1991ps@mail.ru.