ВПЛИВ ГЛЮКОКОРТИКОЇДІВ НА ТОКСИГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ

І.Л.Дикий, Н.І.Філімонова

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: екзотоксини; ендотоксини; глюкокортикоїди; антимікробна активність

На основі теоретичного аналізу та експериментальних досліджень встановлена поряд з основними фармакологічними властивостями глюкокортикоїдів протизапальна, жарознижуюча та аналгетична активність, які одночасно поєднані зі здатністю до інактивуючої дії на екзо- та ендотоксини грампозитивних та грамнегативних піогенотвірних мікроорганізмів. Встановлена та обгрунтована залежність рівневого виявлення антимікробного потенціалу від вмісту у хімічній структурі глюкокортикоїдів галогенів та метильних угруповань, а його вираженість за переважністю механізмів бактерицидної та бактеріостатичної дії, спектрів та абсолютних рівнів антимікробної активності — від кратності вмісту вищезазначених компонентів у хімічному складі глюкокортикоїдів. Розшифровані механізми антитоксичної дії глюкокортикоїдів, що полягають у здатності препаратів на внутрішньоклітинному рівні гальмувати утворення ферментів патогенності, а на позаклітинному — утворювати незворотні комплекси з екзо- та ендотоксинами.

Згідно з окремими, не систематизованими даними деякі глюкокортикоїди (ГК) здатні на організменому рівні виявляти певні антитоксичні ефекти [1, 11, 14]. Однак механізми цієї фармакологічної активності залишаються не розшифрованими, а їх реакційний тропізм щодо відповідних токсичних речовин не ідентифікований. Тим не менше, майже такі обмежені за інформаційним змістом свідчення дають підставу для дослідження можливого розповсюдження визначеної дії ГК на безпосередню інактивацію мікробних токсинів і токсигенну функцію мікроорганізмів. Підставою для ствердження цього припущення може бути те, що ГК у проявах притаманної протизапальної дії поряд з іншими механізмами поєднують здатність до пригнічення синтезу білка у відповідних клітинних структурах та інгібіцію утворення медіаторів і ферментів запалення. Якщо виходити з того, що за хімічною природою істинні екзотоксини грампозитивних бактерій являють собою крупномолекулярні білки, а за фармакологічною активністю відносяться до ферментів спрямованої або узагальненої токсичної дії, то не можна виключати, що цей напрямок у проявах антитоксичного потенціалу ГК імовірно може знайти свою реалізацію не тільки на організменому, але і на мікробіологічному рівнях. Одночасно цьому повинна сприяти і наявність у ГК з певною хімічною структурою антимікробних властивостей.

Припустимо, що внаслідок суббактеріостатичної дії такі ГК можуть бути спроможними завдяки пригніченню життєздатності мікробної клітини негативно впливати на притаманний токсигенний потенціал [6, 12, 13]. Попередньо проведеними власними дослідженнями встановлено, що деякі ГК відрізняються супутньою антимікробною активністю завдяки вмісту у хімічному складі реакційно здатних радикалів та угруповань [9].

Метою дослідження визнано встановлення здатності галогента спиртовмісних ГК виявляти інактивуючу дію на екзо- та ендотоксини грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів.

Матеріали та методи

Як мікробіологічну модель у дослідженнях використано токсиноутворюючі штами-продуценти S.aureus і C.diphtheriae gravis. Між фторовмісними ГК як маркер використано флутиказону пропіонат; хлоровмісними — беклометазону дипропіонат; хлоро- та фторовмісними — галаметазон.

Вивчення наявності негативного культиваційного впливу обраних ГК на токсиноутворюючі властивості відповідних штамів-продуцентів проведено через 20 послідовних пересівів на відповідних поживних середовищах у присутності сталих субактивних концентрацій кожного з досліджуваних протизапальних препаратів [3, 4, 7].

Летальну дію порівнюваних токсинів досліджували визначенням доз, які відповідають $DLM_{80\text{-}100}$ при внутрішньоочеревинному введенні морським свинкам.

Результати та їх обговорення

Згідно з даними літератури поєднуючою ознакою в токсино-

І.Л.Дикий — доктор мед. наук, професор, завідувач кафедри мікробіології Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

Таблиця 1

Вплив глюкокортикоїдів на токсиноутворення S.aureus і C.diphtheriae, n=6

Глюкокортикоїд	Продуцент токсину	Показники активності токсинів, мл	
		летальна дія	дермонекротична дія
Контроль	Дифтерійна паличка	0,25±0,05	0,39±0,05
	Стафілокок	1,30±0,10	1,10±0,04
Флутиказону пропіонат	Дифтерійна паличка	0,64±0,02	0,81±0,10
	Стафілокок	2,20±0,12	1,50±0,06
Беклометазону дипропіонат	Дифтерійна паличка	0,63±0,04	0,92±0,16
	Стафілокок	2,60±0,15	1,60±0,07
Галаметазон	Дифтерійна паличка	0,66±0,06	0,99±0,11
	Стафілокок	2,70±0,17	1,70±0,12

утворенні стафілококів і дифтерійних паличок є здатність до продукування компонентів, що відповідно визначають показники летальної спроможності і дермонекротичної дії в загальній характеристиці цих токсинів. Виходячи з цього, саме ці показники були враховані при порівняльній характеристиці напруженості токсиноутворення між референтними та відповідно культивованими варіантами штамів-продуцентів S.aureus і C.diphtheria gravis. Індуковані спрямованим ГК-культивуванням зміни у виразності цих токсинів враховані на тлі порівняння лімітних об'ємів, що біологічно здатних до реалізації їх летальних та дермонекротичних ефектів. Характеризуючи зміни у виразності токсинів летальної дії, отриманих від ГК-пасованих варіантів референс-штаму C.diphtheria, слід відзначити, що здійснене культиваційне навантаження реалізувалося порівняно зі стандартною культурою узагальненим зниженням його вихідної активності у 2,6 разів. Одночасно для ГК-варіантів S.aureus показник зменшення становив 1,9 разів (табл. 1).

Аналогічна тенденція простежена і при порівнянні дермонекротичної здатності токсинів, що відповідно отримані від вихідних і пасованих культур C.diphtheriae і S.aureus. Дермонекротичні властивості токсинів від ГК-пасованих варіантів C.diphtheria у своєї виразності зменшилися у 2,3 рази, а S.aureus — у 1,4 рази відповідно (табл. 1). Таким чином, проведеними дослідженнями доведена правомірність сформульованого теоретичного посилання про інгібуючі спроможності ГК відносно токсиноутворюючої функції стафілококів і дифтерійних паличок. При цьому певну доцільність набуває аналіз досягнутого мікробіологічного ефекту.

Імовірно, що останнє пов'язано зі спрямованим інгібуючим тиском субактивних концентрацій досліджуваних гормонів на загальні біохімічні процеси "контактних" тест-мікробів. Однак при цьому слід враховувати, що обрані для дослідження ГК відрізняються вибірковими бактерицидними властивостями і пов'язаною з цим відсутністю селективної здатності. З цього виходить, що реєструємий антитоксичний ефект пов'язаний зі спрямованою мутагенністю цих ГК або з нащадково незалежними, адаптаційними змінами у вихідних показниках токсиноутворюючої функції "контактних" тест-мікробів. Вирішення цього питання набуває принципового значення для оцінки механізмів антитоксичної спроможності антимікробноспроможних ГК. Об'єктивним критерієм у визначенні цього питання можуть бути результати реверсійного культивування ГК-пасованих варіантів S.aureus і C.diphtheriae.

У результаті 20-кратного реверсійного культивування відповідно пасованих варіантів обраних тест-мікробів на поживних середовищах у відсутності ГК не виявлено зворотного відновлення їх токсиноутворюючої функції до показників вихідних мікробних культур. Як бачимо, досліджені ГК відрізняються мутагенними властивостями і здатні частково зменшувати вихідні рівні токсиноутворення дифтерійної палички і стафілококів. Не виключено, що останнє може бути поширеним і по відношенню до інших токсиноутворюючих мікроорганізмів. Це обгрунтовує доцільність використання ГК у комплексній фармакотерапії токсикоінфекцій. Розглядаючи хімічну залежність мутагенних ефектів від особливостей структури досліджуваних ГК, можна припустити, що вони спрямовано пов'язані з мутагенним потенціалом хлору, фтору або їх сполученням. Так, у структурі флутиказону пропіонату вміщується 3 атоми фтору, у бекламетазону дипропіонату — 1 атом хлору в поєднанні з метильним угрупованням, у галаметазону — поєднання атома хлору з 2 атомами фтору. При цьому слід враховувати, що для хлору і фтору доведені мутагенні властивості. Одночасно встановлення антимікробної здатності у цих ГК є своєрідним свідченням того, що при субактивному селективному тиску цих препаратів досягається мутагенний вплив гормонів на токсиноутворюючу функцію "контактних" мікроорганізмів.

У наступній серії експериментів досліджена наявність реак-

Таблиця 2

Дезінтоксикаційна здатність глюкокортикоїдів, n=50

Глюкокортикоїд	Кількість тварин у групі	Вижило	Загинуло	Груповий показник мишо/днів	Лікувально-профілактичний ефект (%)
Контроль	10	2	8	1,2	-
Метилпреднізолон	10	6	4	2,3	60
Флутиказону пропіонат	10	7	3	2,6	70
Беклометазону дипропіонат	10	6	4	2,6	60
Галаметазон	10	7	3	2,6	70

Примітка: термін клінічного спостереження за тваринами досліджуваних груп — 3 доби

ційної здатності у спрямовано обраних ГК до безпосередньої взаємодії з очищеними комерційними зразками дифтерійного та стафілококового анатоксинів. Обгрунтованою підставою для цього були використані відомі свідчення про те, що переважна більшість лікарських засобів, включаючи і ГК, внаслідок притаманних їм фармакокінетичних властивостей при циркуляції по системі кровообігу взаємодіє з вміщеними у крові протеїнами, глобулінами, альбумінами і ферментами. Останнє враховується при визначенні їх терапевтично діючих концентрацій. Токсини грампозитивних бактерій за особливостями хімічного походження відносяться до крупномолекулярних білків, а за біологічними властивостями — до ферментів субстратно спрямованої дії. З врахуванням цього логічним висновком з викладеного є припущення про можливість комплексоутворення між бактерійними токсинами і ГК.

Методично дослід виконано шляхом дозованого додавання розчинів ГК до анатоксинів з візуальним спостереженням утворення осаду, деконтамінації і постановки реакції преципітації з відповідними імуноглобулінами. У контролі до анатоксинів додано відповідну кількість розчину NaCl.

Проведеними дослідженнями встановлено, що додавання розчинів флутиказону пропіонату, беклометазону дипропіонату або галаметазону супроводжується утворенням і дозозалежним накопиченням специфічного осаду, який свідчить про реакційну взаємодію між ГК з відповідними компонентами анатоксинів та їх частковим виснаженням. Останнє знайшло своє підтвердження при порівняльній постановці кількісного варіанту реакції преципітації між вихідними та виснаженими ГК дифтерійним або стафілококовим преципітиногенами і відповідними імуноглобулінами. У контрольній постановці реакції преципітації титр антитіл до дифтерійного анатоксину сягав значень 1:512, а при використанні відповідно до визначеного преципітиногену — 1:128. Одночасно при постановці реакції преципітації з використанням контрольного і виснаженого стафілококового анатоксину, антистафілококового імуноглобуліну порівнювані показники відповідно становили 1:256 і 1:128. Таким чином, за результатами проведених досліджень доведено, що використані ГК спроможні до безпосередньої реакційної взаємодії з дифтерійним і стафілококовим анатоксинами.

Експериментальний доказ гальмуючого впливу ГК на токсиноутворюючу функцію мікроорганізмів та їх здатності до реакційного сполучення з продукованими токсинами не вичерпує усіх аспектів антитоксичного потенціалу цих протизапальних препаратів. У літературі наведені окремі дані, що свідчать про здатність ГК, наприклад, метилпреднізолону попереджувати розвиток ендотоксичного шоку з летальним кінцем у кролів при внутрішньосудинному введенні їм смертельної дози ендотоксину кишкової палички. При цьому автори, спираючись на особливості патогенезу ендотоксичного шоку, доводять, що захисний ефект метилпреднізолону полягає у здатності на організменому рівні до відновлення індукованих дією ендотоксину лейкопенічних змін у лейкоформулі крові та пригнічення гіалуронідазної активності гранулоцитів [2]. Однак поодиноке посилання на притаманність метилпреднізолону захисних властивостей у попередженні розвитку ендотоксичного шоку не може бути автоматично поширеним до всієї номенклатури ГК. Для обгрунтування цього посилання потрібно більш широке і вагоме експериментальне підтвердження. Саме це і стало метою наступного фрагменту дослідження.

Для отримання ешерихіального ендотоксину було використано мікробну масу добової агарової культури патогенного штаму E.coli K-127. Ендотоксин вилучено за методикою Буавена [5, 10]. Досліди проведені на білих мишах масою 18-20 г. Ендотоксичний шок відтворено шляхом внутрішньоочеревинного введення білим мишам випробуваного ендотоксину в об'ємах, що відповідають DLM_{80-100}. Для випробування на дезінтоксикаційну здатність обрані метилпреднізолон, флутиказону пропіонат, беклометазону дипропіонат та галаметазон. Попереджуюче внутрішньосудинне введення досліджуваних ГК проведено шляхом 3-кратного щодобового введення у дозах, які відповідають співвідношенню мг/кг [8]. Виходячи з цього, разова доза/миша для кожного з випробуваних ГК становила 0,08 мг.

Результати проведених досліджень наведені у табл. 2 і підтверджують вихідне положення про дезінтоксикаційну спроможність ГК.

За показником виживаємості досліджені ГК усереднено виявили захисний ефект на рівні 65% попередження розвитку ендотоксичного шоку у лікованих тварин. Пов'язуючи виявлену антитоксичну здатність ГК з відповідним впливом на кількісну характеристику лейкоформули і гіалуронідазну здатність, правомірно дійти висновку про те, що цей фармакологічний ефект є складовою у загальних проявах протизапальних властивостей зазначених препаратів. Останнє однак не виключає, що одночасно зі спрямованим впливом на лейкоцити ГК можуть безпосередньо взаємодіяти з ендотоксином кишкової палички.

Узагальнюючи результати викладених досліджень, слід, перш за все, зазначити, що ГК у характеристиці фармакологічних властивостей поряд з виявленням протизапальної, жарознижуючої та аналгетичної активності супутньо притаманна здатність до проявів антимікробної і антитоксичної здатності. При цьому наявність виявлення антимікробного потенціалу залежить від вмісту у хімічній структурі ГК галогенів та метильних угруповань, а його вираженість за переважністю механізмів бактерицидної або бактеріостатичної дії, спектрів та абсолютних рівнів антимікробної активності — від кратності вмісту вищезазначених компонентів у хімічному складі ГК. Поряд з цим досліджені ГК виявилися спроможними до комплексного виявлення антитоксичних ефектів, що сукупно поєднують здатність на мікробіологічному рівні пригнічувати токсиноутворення збудників і комплексоутворення з продукованими токсинами, а на організменому рівні — попереджувати розвиток ендотоксичного шоку завдяки відповідному впливу на лейкоцити та їх екскреторні функції.

ВИСНОВКИ

1. На основі теоретичного обґрунтування і експериментального підтвердження принципово доведені перспективні для клінічного врахування додаткові антимікробні та антитоксичні властивості, притаманні глюкокортикоїдам як ефективним протизапальним лікарським препаратам.

2. Доведена здатність флутиказону пропіонату, беклометазону дипропіонату і галаметазону до інактивуючої дії щодо екзотоксинів летальної і дермонекротичної дії стафілокока і дифтерійної палички. Припущено, що механізми антитоксичної дії досліджуваних глюкокортикоїдів паритетно пов'язані на внутрішньоклітинному рівні з пригніченням продукування ферментів патогенності, а на позаклітинному — безпосередньою комплексоутворюючою взаємодією між мікробними токсинами і глюкокортикоїдами.

3. На прикладі ендотоксину кишкової палички показано, що досліджувані глюкокортикоїди за визначеними механізмами здатні також до реєстрованої антитоксичної дії. Останнє перспективне для клінічного застосування глюкокортикоїдів при виникненні і лікуванні ендотоксичних шоків.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бойченко М.Н. Исследование функционирования лактозного оперона E. coli K-12 под влиянием неспецифических регуляторов. //Бюлл. эксперим. биол. и медицины. — 1978. — С. 744-746.*
2. *Владимиров Ю.А., Сергеев П.В., Сейфулла Р.Д., Руднев Ю.Н. //Молекулярная биол. — 1973. — Т. 7, вып. 2. — С. 247-253.*
3. *Дикий И.Л., Сидорчук И.И., Холупяк И.Ю. и др. Микробиология. Руководство к практическим занятиям: Учеб. пособ. для студ. высш. учеб. завед. — Х.: НФаУ; Золотые страницы, 2002. — 444 с.*
4. *Зуева В.С., Павлов Е.П., Линевич Ю.П. //Антибиотики. — 1971. — Т. 16. — С. 990-994.*
5. *Кондракова О.А., Ешина А.С., Дмитриева Н.Ф. и др. //Антибиотики и химиотерапия. — 1998. — Т. 43, №7. — С. 26-30.*
6. *Левицкая Ю.С. К определению бактериальных свойств гормональных препаратов на некоторых патогенных и непатогенных бактерий //Матер. II-го объед. съезда гигиенистов, эпидемиол., микробиол. и инфекционистов Казахстана. — Микробиология и вирусология. — Алма-ата, 1975. — Т. IV. — С. 66-67.*
7. *Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии. — М., Медицина, 1971. — 539 с.*
8. *Сигидин Я.А., Шварц Г.Я., Арзамасцев А.П., Либерман С.С. Лекарственная терапия воспалительного процесса: экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов. — М.: Медицина, 1988. — 240 с.*
9. *Філімонова Н.І. //Вісник Вінницького державного медичного університету. — 2002. — №1. — С. 46-47.*
10. *Assad F.M. //Egypt. J. Chim. — 1982 (1983). — Vol. 25, №3. — P. 293-300.*

11. Baulieu E.E. Neurosteroids: metabolism and activities. Progress in the Management of the Menopause / Ed. Barry G.Wren. — New York, 1996. — P. 286-301.

12. Biotechnologes: challenges and promises / Albert Sasson. — 2-nd Ed. — Unesco, 1987. — 411 p.

13. Dannenberg A.M //Inflammation. — 1979. — Vol. 3. — P. 329.

14. Jansen N.J.G., Oeveren W.Van, Hating B.H., Wildevuur Ch.R.H. //Inflammation. — 1991. — Vol. 15, №2. — P. 91-101.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (057) 706-30-67.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 12.03.2007 р.

Інформаційне повідомлення відділу фармакологічного нагляду ДП "Державний фармакологічний центр" МОЗ України

Про підозрювану побічну дію препарату, діючою речовиною якого є **ацетилцистеїн** (Засоби, які застосовуються при кашлі та застуді. Муколітичні засоби. Код АТС R05C B01)

Хворій О. (34 роки) з діагнозом гострий бронхіт було призначено препарат, діючою речовиною якого є ацетилцистеїн (перорально по 200 мг 3 рази на добу). Через 4 доби від початку лікування препаратом, діючою речовиною якого є ацетилцистеїн, у хворої виникли нудота, біль в епігастрії, діарея, головний біль, слабкість. Препарат, діючою речовиною якого є ацетилцистеїн, було відмінено, для корекції стану призначено фенкарол. Після вжитих заходів зазначені явища минули без наслідків.

Алергологічний анамнез не обтяжений. Будь-які незвичайні реакції на ліки або хімічні речовини в минулому невідомі.

Інформація надійшла від Дніпропетровського регіонального відділення ДП "Державний фармакологічний центр" МОЗ України (МП №1 м. Дніпропетровська).