

Рекомендована д.б.н., професором Л.М.Малоштан

УДК 615.33; 615.28+541.521

МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ПРИНЦИПУ СТВОРЕННЯ КОМПЛЕКСНИХ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ З УПЕРЕДЖУВАЛЬНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ ЩОДО ФОРМУВАННЯ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ

Н.І.Філімонова, В.М.Остапенко, І.Л.Дикий, В.В.Ковальов

Національний фармацевтичний університет

Теоретично обгрунтована та експериментально підтверджена перспективність створення комплексних антимікробних препаратів на основі антибіотиків та антисептиків з елімінаційно-пригнічувальними властивостями по відношенню до R-плазмід множинної лікарської стійкості. Запропоновані ефективні комбінації етакридину лактату з антибіотиками, які відповідно інгібують синтез клітинної стінки, бактеріальних білків та порушують енергетичний обмін мікробної клітини.

Визначаючи проблему сучасної інфектології становить прогресивне розповсюдження на клінічному рівні лікарськостійких варіантів між циркулюючими збудниками [6, 11, 14, 15, 20, 21]. Останнє знаходить своє закономірне негативне відображення в ефективності здійснюваної антибіотику терапії. Ще свого часу, розглядаючи актуальні аспекти проблеми антибіотикорезистентності, О.Б.Черномордик зазначив, що її знаменником служить невідповідність між теоретично обгрутованими напрямками у стратегії створення нових поколінь антимікробних препаратів та ефективною тактикою мікробів-мішеней до подолання їх інгібуючої дії за ознаками формування антибіотикорезистентності [10, 16].

Правомірність цього положення знаходить постійне підтвердження. Так, поширений досвід клінічної інфектології переконливо свідчить про те, що послідовне впровадження нових поколінь антимікробних препаратів лише на початкових етапах лікування забезпечує відповідну хімотерапевтичну ефективність. Одночасно з подовженням термінів клінічного використання простежується спочатку уповільнене, а надалі прогресивне формування лікарськостійких варіантів збудників [1, 17, 18, 19].

Аргументованим висновком з викладеного є те, що визнана стратегія у створенні антимікробних препаратів з односпрямованими механізмами дії на мікробну клітину недостатньо перспективна у вирішенні проблеми антибіотикорезистентності.

Саме тому останнім часом перспективним напрямком визнано створення комплексних препаратів на основі поєднання антимікробних компонентів з різними механізмами дії на мікробну клітину, комбінації антибіотиків з імуномодуляторами та ін. [9, 12, 13].

Не менш перспективним слід вважати розробку комплексних препаратів, що поєднують у рецептурному складі антибіотик та компонент, який запобігає мікробу-мішені формувати відповідну або множинну антибіотикорезистентність. При цьому слід враховувати, що поряд із встановленням нових механізмів антибіотикорезистентності найбільш поширеним залишається R-плазмідне набуття та передача мікробами-донорами множинної лікарської стійкості [2, 3, 8]. Сучасна номенклатура антимікробних препаратів налічує лише поодинокі представники, які у виявах притаманних фармакологічних властивостей паритетно поєднують антимікробну та елімінаційно-пригнічувальну активність по відношенню до R-плазмід множинної лікарської стійкості. Серед них типовим представником у клініці за антисептичним спектром є етакридину лактат [8].

Метою дослідження визначено обгрунтування доцільності сумісного використання етакридину лактату з синергідними за механізмом дії антибіотиками як компонента, який при виявах антимікробних властивостей запобігає R-плазмідному формуванню антибіотикорезистентності.

Матеріали та методи

При дослідженні синергідної сумісності етакридину лактату з антибіотиками за виявами антимікробних властивостей враховано безперечно доведене положення про те, що взаємопотенціюючі співвідношення між порівнюваними антимікробними препаратами пов'язані з неспівпадаємістю механізмів їх дії на мікробну клітину. За притаманними механізмами бактерицидної дії етакридину лактат відноситься до антисептиків, які за рахунок хімічної спорідненості з нуклеопр-

Таблиця 1

Синергійна сумісність за антимікробними властивостями між етакридину лактатом та антибіотиками з різними механізмами дії, n=6

Антибіотик, механізм дії	Серія	Мінімальна інгібуюча концентрація, мкг/мл			
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Бензилпеніцилін, інгібітор клітинної стінки	контроль	8,5±1,2	6,3±0,4	12,7±1,3	14,6±1,3
	дослід ^x	3,2±0,4	1,8±0,2	6,9±0,8	7,3±1,0
	синергізм	2,7	3,5	1,8	2,0
Грамїцидин, інгібітор клітинної мембрани	контроль	11,8±1,2	14,3±1,6	21,8±2,3	23,4±1,8
	дослід ^x	10,2±1,4	12,6±1,3	18,6±1,5	22,6±1,4
	синергізм	0	0	0	0
Стрептоміцин, інгібітор енергетич- ного обміну мік- робної клітини	контроль	15,3±1,3	12,8±1,2	16,8±1,2	30,4±1,6
	дослід ^x	9,2±0,8	7,2±0,9	11,4±0,7	22,7±1,2
	синергізм	1,7	1,8	1,5	1,3
Канаміцин, інгібітор синтезу бактеріальних білків	контроль	11,2±0,8	14,5±1,3	20,5±1,4	27,3±1,6
	дослід ^x	5,3±0,4	8,0±0,6	12,8±1	2
	синергізм	2,1	1,8	1,6	1,4
Рифампіцин, бло- катор ДНК та РНК полімерази	контроль	18,6±1,2	30,5±3,6	44,6±3,5	>500
	дослід ^x	16,4±1,3	28,7±1,5	43,2±2,6	>500
	синергізм	0	0	0	0

Примітка: дослід^x — комбінація діючої концентрації антибіотика з субактивною дозою етакридину лактату.

теїдами незворотно блокують синтез і функцію цитоплазматичної мембрани мікробної клітини [4]. З урахуванням викладеного на синергійну сумісність з етакридину лактатом як маркери антибіотиків різних механізмів дії використані: бензилпеніцилін (блокує синтез клітинної стінки), грамїцидин (інгібує синтез цитоплазматичної мембрани), стрептоміцину сульфат (інгібує енергетику мікробної клітини шляхом відповідного впливу на цикл трикарбонових кислот Кребса), канаміцин (інгібує синтез цитоплазматичних білків), рифампіцин (гальмує залежну від ДНК та РНК полімеразу) [6].

Наявність синергійної сумісності між етакридину лактатом та обраними антибіотиками досліджена за методикою, яка передбачає сумісне співставлення у поживному середовищі їх діючих та субактивних концентрацій [7].

Запобігаючий вплив етакридину лактату на селективний потенціал досліджуваних антибіотиків досліджений за методикою Г.Н.Першина в умовах 25-кратного послідовного культивування тест-мікробів в умовах постійного суміщення у рідкому поживному середовищі субактивних концентрацій досліджуваного антисептика та відповідного антибіотика [11].

Як мікробіологічна модель був використаний набір референс-штамів, включаючи: *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 F1.

Результати та їх обговорення

Результати проведених досліджень у вигляді узагальнених даних, наведених у табл. 1, принци-

пово підтвердили здатність субактивних концентрацій етакридину лактату на основі синергійного суміщення посилювати вихідні рівні активності антибіотиків. При цьому наявність та вираженість рівнів посилення антибактеріальної активності досліджуваних антибіотиків виявилися принципово залежними від особливостей механізмів їх дії на мікробну клітину. Встановлено, що за абсолютними рівнями потенціуючого посилення вихідної активності етакридину лактат, блокуючи синтез та порушуючи функцію клітинної мембрани, пріоритетно сумісний з бензилпеніциліном-маркером антибіотиків, які специфічно пригнічують синтез клітинної стінки, при усередненому синергійному ефекті за притаманним спектром антибактеріальної активності досліджуваного антибіотика по відношенню до *S. aureus* у 2,7 разів, *B. subtilis* у 3,5 разів, *E. coli* у 1,8 разів та *P. aeruginosa* відповідно у 2 рази (табл. 1). Далі за усередненим посиленням у 1,75 разів вихідної активності канаміцину як інгібітора синтезу бактеріальних білків субактивні концентрації етакридину лактату сприяли зниженню мінімальної інгібуючої концентрації досліджуваного антибіотика по відношенню до *S. aureus* у 2,2 разів, *B. subtilis* у 1,8 разів, *E. coli* у 1,6 разів, *P. aeruginosa* у 1,4 рази (табл. 1). Із стрептоміцину сульфатом як маркером антибіотиків, механізм дії яких заснований на пригніченні енергетичного обміну бактеріальної клітини, потенціуючий вплив відповідних концентрацій етакридину лактату при усередненому синергійному ефекті на рівні 1,5 виявився у зростанні вихідної активності досліджуваного анти-

Таблиця 2
Інгібуючий вплив етакридину лактату на селективні властивості антибіотиків, n=6

Тест-мікроб	Варіанти тест-мікроба	Мінімальна інгібуюча концентрація, мкг/мл		
		Бензилпеніцилін	Стрептоміцин	Канаміцин
S. aureus	Вихідний	8,5±1,2	15,3±1,3	11,2±0,8
	Пасований з антибіотиком	28,9±3,3 ^x	64,3±4,5 ^x	40,3±2,6 ^x
	Пасований з антибіотиком та етакридину лактатом	10,3±1,6	14,8±2,2	10,6±1,4
B. subtilis	Вихідний	6,3±0,4	12,8±1,2	14,5±1,3
	Пасований з антибіотиком	24,0±2,6 ^x	44,8±3,4 ^x	40,5±3,2 ^x
	Пасований з антибіотиком та етакридину лактатом	7,5±1,3	11,5±1,6	18,2±2,6
E. coli	Вихідний	12,7±1,3	16,8±1,2	20,5±1,4
	Пасований з антибіотиком	46,7±2,8 ^x	40,5±3,5 ^x	102,5±7,8 ^x
	Пасований з антибіотиком та етакридину лактатом	10,4±0,7	18,2±1,6	22,3±1,2
P. aeruginosa	Вихідний	14,6±1,3	30,5±1,6	27,3±1,6
	Пасований з антибіотиком	75,9±7,6 ^x	145,5±10,6 ^x	150,2±11,3 ^x
	Пасований з антибіотиком та етакридину лактатом	16,5±4,2	36,3±3,5	30,7±4,2

Примітка: ^x — достовірні відхилення по відношенню до вихідного показника.

біотика по відношенню до S. aureus у 1,7 разів, B. subtilis у 1,8 разів, E. coli у 1,5 разів та P. aeruginosa відповідно у 1,3 рази (табл. 1). На протилежність викладеному проведені дослідження не виявили синергійної сумісності етакридину лактату з маркером антибіотиків, механізм антибактеріальної дії яких полягає в інгібіції синтезу та порушенні функцій клітинної мембрани (граміцидин) та представників інгібіторів ДНК та РНК полімерази (рифампіцин).

Таким чином, за результатами проведених досліджень встановлено, що за синергійністю виявів антибактеріальної активності етакридину лактат перспективний для використання у комплексних сполуках з антибіотиками, механізм дії яких на мікробну клітину відповідно полягає в інгібіції синтезу та функції клітинної стінки, бактеріальних білків або у блокуванні енергетичних процесів бактеріальної клітини.

Згідно із сформульованою метою роботи наступна серія запланованих досліджень була підпорядкована обґрунтуванню отриманих сполук етакридину лактату з антибіотиками за ознаками селективного упередження можливості формування антибіотикорезистентності у збудників гнійно-запальних захворювань. При цьому, враховуючи вище викладені результати досліджень, були виключені граміцидин та рифампіцин як представники антибіотиків, що за механізмами дії на мікробну клітину не виявили синергійної сумісності з етакридину лактатом.

За умовами використаної методики здатність етакридину лактату гальмувати притаманні антибіотикам побічні властивості щодо формування лікарської стійкості досліджена шляхом 25-крат-

ного послідовного культивування тест-мікробів у присутності сполук субактивних концентрацій досліджуваних препаратів у поживному середовищі. Селективне культивування референтних культур S. aureus, B. subtilis, E. coli, P. aeruginosa відповідно здійснено по відношенню до бензилпеніциліну, стрептоміцину сульфату, канаміцину. При оцінці результатів у паралельному співставленні враховані показники вихідної чутливості тест-мікробів до використаних антибіотиків, її зміни під селективним впливом антибіотиків та їх сполук з етакридину лактатом.

Результати проведених досліджень представлені у табл. 2, за даними якої принципово підтверджена селективна здатність кожного з використаних антибіотиків до формування резистентних варіантів при спрямованому культивуванні резистентних культур. При цьому селективні варіанти S. aureus відповідно збільшили стійкість до бензилпеніциліну у 3,4 рази, до стрептоміцину сульфату — у 4,3 рази та до канаміцину — у 3,6 рази. У свою чергу, при спрямованому культивуванні B. subtilis показники набуття стійкості відповідно становили 3,8; 3,5 та 2,8 рази; E. coli — 3,6; 4,2 та 5 разів, а P. aeruginosa — відповідно 5,2; 4,8 та 5,5 разів.

Одночасно встановлено, що у присутності субактивних концентрацій етакридину лактату використані антибіотики втратили вихідний потенціал селективної здатності щодо індуктивного формування у пасованих мікроорганізмів відповідної антибіотикорезистентності (табл. 2).

Розглядаючи правомірність обумовленого етакридину лактатом антиселективного ефекту, слід вважати, що останній пов'язаний з особливостями-

ми механізму дії досліджуваного антибіотика на мікробну клітину. У його основу покладена здатність до хімічного незворотного комплексування препарату з бактеріальними нуклеопротейдами. Припустимо, що на рівні субактивних концентрацій етакридину лактат переважно комплексується з позахромосомними нуклеопротейдами, тобто визначаючими компонентами хімічної структури R-плазмиди. Закономірним наслідком цього служить антиселективний вплив етакридину лактату на формування у мікроорганізмів антибіотикорезистентності.

ВИСНОВКИ

1. На експериментально-теоретичному рівні обґрунтована перспективність створення комплексних антимікробних препаратів на основі ан-

тибіотиків та етакридину лактату як компонента з антисептичними та елімінаційно-пригнічувальними властивостями по відношенню до R-плазмид множинної лікарської стійкості бактерій.

2. Розшифровані параметри синергійної сумісності між етакридину лактатом та антибіотиками за механізмом дії на мікробну клітину. Показано, що етакридину лактат суттєво підвищує активність антибіотиків, які відповідно інгібують синтез клітинної стінки, бактеріальних білків та блокують енергетичний обмін мікробної клітини.

3. У сполученні з етакридину лактатом синергійно сумісні за антимікробними властивостями антибіотики втрачають притаманну їм здатність до формування у мікроорганізмів R-плазмидної лікарської стійкості.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бриан Л.Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам. — М., 1984. — 123 с.
2. Евдокимова О.В., Смирнов И.В., Артемьева Н.А., Рожкова Е.А. // Антибиотики и химиотерапия. — 1997. — №7. — С. 8-11.
3. Зайцева Е.А., Шубин Ф.Н., Беседнова Н.Н. // Антибиотики и химиотерапия. — 1996. — №6. — С. 34-38.
4. Красильников А.П. Справочник по антисептике. — Мн: Выш. школа, 1995. — 367 с.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. — Х.: Торсинг, 1997. — Т. 1. — 560 с.; Т. 2. — 592 с.
6. Мусина Л.Т., Семиша Н.А., Гладкова К.К. // Антибиотики и химиотерапия. — 1995. — №2. — С. 22-25.
7. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия. — М.: Медицина, 1982. — 272 с.
8. Палий Г.К., Кочет Т.О., Палий А.Г и др. Антисептики в профилактике и лечении инфекций. — К.: Здоров'я, 1997. — 201 с.
9. Пинегин Б.В. // Антибиотики и химиотерапия. — 2000. — №12. — С. 3-8.
10. Vaguero F. Origin and genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Intern. Clinic. Pract. Ser.* — 1993. — P. 13-16.
11. Donta S.T., Cross A., Sodoff A., Fedurri P. // *Clin. Infect. Dis.* — 1993. — Vol. 17, № 3. — P. 564.
12. Dunn D.L. // *World J. Surg.* — Vol. 2, №2. — P. 233-240.
13. Ferrara A. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 1997. — Vol. 17, №7. — P. 535-537.
14. Hasegawa M., Kovayashi I., Saika T., Nishidi M. // *J. Jap. Assoc. Infect. Dis.* — 1996. — Vol. 70, №6. — P. 606-612.
15. Henry N. // *Amer. J. Med.* — 1987. — Vol. 82, №4A. — P. 73-75.
16. *Manual of clinical microbiology / Ed. in chief Patrick R. Murray.* — Washington: ASM Press, 1998. — 1480 p.
17. Naumojski L., Quinn J.P., Miyashiro D. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 1992. — Vol. 36. — P. 1919-1996.
18. Pedreau-Remington F. // *Chemother. Infect. Dis.* — 1996. — P. 162-164.
19. Richer M., Le Bel M. Quinolone antimicrobial agents. — 2-nd Ed. — Hooper D.C., Wolfson J S. Eds. — Washington, 1993. — P. 225-244.
20. Shanson D.C. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and laboratory problems resulting from outbreaks. In: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Intern. Clinic. Pract. Ser.* — 1993. — P. 17-20.
21. Tomanovic B. // *Vojnosanit Pred.* — 1993. — Vol. 50, №1. — P. 39-42.

УДК 615.33; 615.28+541.521

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИНЦИПА СОЗДАНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПРЕДУПРЕЖДАЮЩИХ ФОРМИРОВАНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Н.И.Филимонова, В.Н.Остапенко, И.Л.Дикий, В.В.Ковалёв
Теоретически обоснованная и экспериментально подтвержденная перспектива создания комплексных антимикробных препаратов на основе антибиотиков и антисептиков с элиминационноподавляющими способностями по отношению к R-плазмидам множественной лекарственной устойчивости. Предложены эффективные комбинации етакридина лактата с антибиотиками, которые соответственно ингибируют синтез клеточной стенки бактериальных белков и нарушают энергетический обмен микробной клетки.

UDC 615.33; 615.28+541.521

MICROBIOLOGICAL SUBSTANTIATION OF THE PRINCIPLE FOR CREATING COMPLEX ANTIMICROBIAL MEDICATIONS WITH PREVENTIVE PROPERTIES IN ANTI-BIOTICS RESISTANCE FORMATION

N.I.Filimonova, V.M.Ostapenko, I.L.Dikiy, V.V.Kovalyov
The perspectiveness for creation complex antimicrobial medications on the basis of antibiotics and antiseptics with eliminative-suppressive properties in relation to R-plasmid multiple medicinal resistance has been theoretically substantiated and experimentally confirmed. The effective combinations of etacridine lactate with antibiotics have been proposed, they inhibit the synthesis of the cell wall and bacterial proteins respectively and disturb the energy exchange of the microbial cell.