

АНТИОКСИДАНТЫ В ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНИТА, ВЫЗВАННОГО *ESCHERICHIA COLI*

Мирошниченко А.Г., Брюханов В.М., Бутакова Л.Ю., Госсен И.Е., Перфильев В.Ю., Смирнов П.В.

ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, Барнаул, Россия (656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40), e-mail: ag@asmu.ru

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка влияния антиоксидантов (аскорбиновая кислота, метилэтилпиридинол, N-ацетилцистеин) на эффективность антибактериальных средств (гентамицин, ципрофлоксацин, цефтазидим, хлорамфеникол, тетрациклин) в условиях экспериментального перитонита, вызванного *Escherichia coli*. Эксперименты выполнены на крысах линии Вистар массой 240-275 г. Дозы препаратов устанавливались в соответствии с правилами межвидового переноса на основании терапевтических доз, применяемых у человека. Установлено, что эффективность применения антиоксидантов при перитоните, вызванном кишечной палочкой, зависит от применяемого химиотерапевтического средства. Антиоксиданты препятствуют реализации антибактериального действия гентамицина, при этом не уменьшают нефротоксическое действие антибиотика. Все изученные антиоксиданты уменьшают прооксидантный эффект хлорамфеникола и ципрофлоксацина, не влияя на их антибактериальную активность. Совместное применение антиоксидантов и тетрациклина нецелесообразно.

Ключевые слова: антиоксиданты, перитонит, химиотерапия, *Escherichia coli*

ANTIOXIDANTS IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL PERITONITIS CAUSED BY *ESCHERICHIA COLI*

Miroshnichenko A.G., Bryukhanov V.M., Butakova L.Y., Gossen I.E., Perfilyev V.Y., Smirnov P.V.

Altai state medical university, Barnaul, Russia (656038, Barnaul, Lenin prospect, 40), e-mail: ag@asmu.ru

Was conducted a comparative study of the effect of antioxidants (ascorbic acid, methylethylpyridinol, N-acetylcysteine) on the effectiveness of antibacterial agents (gentamicin, ciprofloxacin, ceftazidime, chloramphenicol, tetracycline) in experimental peritonitis caused by *Escherichia coli*. Experiments were performed on Wistar rats weighing 240-275 g. Doses were set in accordance with interspecific transfer rules based therapeutic doses used in humans. It was established that the effectiveness of antioxidants in peritonitis caused by *Escherichia coli* is dependent on the chemotherapeutic agents. Antioxidants prevent the implementation of the antibacterial action of gentamicin, it does not reduce the nephrotoxic effects of the antibiotic. All studied antioxidants reduce prooxidant effect of chloramphenicol and ciprofloxacin, without affecting their antibacterial activity. Combined use of antioxidants and tetracycline inappropriate.

Keywords: antioxidants, peritonitis, antibacterial chemotherapy, *Escherichia coli*

Введение

Кишечная палочка (*Escherichia coli*) сохраняет позиции одного из наиболее клинически значимых возбудителей ряда заболеваний человека (инфекции мочевыводящих путей, кишечные инфекции, нозокомиальная пневмония, перитонит, остеомиелит, инфекционный артрит, неонатальный менингит и другие), поэтому совершенствование лечения соответствующих больных является актуальным. Усиление процессов свободнорадикального окисления играет значимую роль в патогенезе бактериальных инфекций. При острой и хронической инфекционной патологии формируются, а затем нарастают явления эндотоксикоза и оксидативного стресса, что сопровождается усилением продукции активных форм кислорода и других радикальных частиц, активацией процессов перекисного окисления биомолекул,

нарушениями энергообеспечения клеток [14]. В связи с этим применение антиоксидантов в условиях инфекции считается патогенетически оправданным, однако нельзя не отметить тот факт, что гиперпродукция свободных радикалов фагоцитирующими клетками необходима для эффективной борьбы с микроорганизмами [9]. Кроме того, ранее нами было установлено, что некоторые антиоксиданты способны усиливать развитие культуры кишечной палочки *in vitro* и снижать ее чувствительность к антибактериальным средствам [5, 6].

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка влияния антиоксидантов (аскорбиновая кислота, метилэтилпиридинол, N-ацетилцистеин) на эффективность антибактериальных средств при экспериментальном перитоните, вызванном *Escherichia coli*.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 175 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 2-3 месяцев массой 240-275 г, полученных из питомника НИИ цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Содержание крыс соответствовало требованиям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.), Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей» (Страсбург, 1986 г.). Эксперимент был разделен на 5 серий в соответствии с изучаемыми антибактериальными средствами (гентамицин, ципрофлоксацин, цефтазидим, хлорамфеникол, тетрациклин).

Таблица 1. Характеристика лекарственных средств

Вещество	Производитель	Доза, мг/кг
Аскорбиновая кислота	Panreac, Испания	80
Метилэтилпиридинол («Эмоксипин»)	ФГУП МЭЗ, Россия	80
N-ацетилцистеин	Sigma-Aldrich, США	80
Гентамицин	AppliChem, Германия	30
Ципрофлоксацин	Sigma-Aldrich, США	50
Цефтазидим	Sigma-Aldrich, США	120
Хлорамфеникол	Panreac, Испания	70
Тетрациклин	AppliChem, Германия	80

Для каждой серии из 35 животных формировались группы (1-5) по 7 особей в каждой. Всем животным внутрибрюшинно вводилась бактериальная суспензия (2,5 усл. ед. по Мак-Фарланду, 5 мл/кг), полученная из суточной чистой культуры клинического штамма *E. coli*, чувствительного ко всем изучаемым антибактериальным средствам. Через 3 часа после введения животным группы №1 (контроль) каждой серии внутрибрюшинно вводился стерильный изотонический раствор хлорида натрия, №2 – раствор антибактериального средства, №3 – последовательно раствор антибактериального средства и аскорбиновой кислоты, №4 – раствор антибактериального средства и метилэтилпиридинола, №5 – раствор антибактериального средства и N-ацетилцистеина. Дозы препаратов устанавливались в соответствии с правилами межвидового переноса на основании терапевтических доз, применяемых у человека [7].

Растворы для инъекций готовились из субстанций в асептических условиях (за исключением метилэтилпиридинола) непосредственно перед введением (табл. 1).

Через 24 часа после введения бактериальной суспензии с помощью диагностических наборов (ООО «Витал Диагностикс СПб», Россия) в качестве маркеров поражения печени определялись активность аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы, маркеров поражения почек – концентрации мочевины и креатинина. Для оценки оксидантного статуса определяли активность каталазы [2] и глутатионпероксидазы эритроцитов [4], а также плазменную концентрацию тиобарбитурат-реактивных продуктов [1] и содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах [8], в качестве маркера воспаления – концентрацию церулоплазмينا в плазме крови, проявляющего также антиоксидантные свойства [11].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни с помощью программы SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc., США), различия считали значимыми при $P < 0,05$ [3].

Результаты и их обсуждение

В таблице 2 приведены маркеры состояния печени и почек в условиях экспериментального перитонита без коррекции, а также в условиях лечения различными комбинациями антибактериальных средств и антиоксидантов. Рассматривая изменение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), следует отметить, что цефтазидим и его совместное применение с антиоксидантами статистически значимо уменьшает дисфункцию печени, возникающую при бактериальном перитоните. Тетрациклин, напротив, усиливает поражение печени, причем указанное гепатотоксическое действие не поддается коррекции антиоксидантами. Интересно отметить, что тетрациклин, а также его сочетания с аскорбиновой кислотой и ацетилцистеин приводят к статистически значимому снижению активности щелочной фосфатазы в плазме крови. Это может быть связано с присутствием эндотоксинов кишечной палочки в плазме крови, которые могут при определении *in vitro* конкурировать с биохимическим субстратом (п-фенилфосфат) за активный центр фермента. Указанное предположение подтверждается данными, согласно которым щелочная фосфатаза способна инактивировать бактериальные липополисахариды путем дефосфорилирования [13].

Поражение почек, выражающееся в повышении плазменных концентраций мочевины и креатинина, вызывает введение гентамицина и тетрациклина. Нефротоксическое действие не уменьшается сочетанием с антиоксидантами, что свидетельствует о незначительном вкладе процессов свободнорадикального окисления в патогенез поражения почек указанными антибиотиками. Однако многими авторами нефротоксичность гентамицина связывается с усилением пероксидации в почках за счет повышения генерации активных форм кислорода, снижения активности антиоксидантных ферментов и концентрации глутатиона [10].

Введение гентамицина значительно повышает активность каталазы и концентрацию внутриклеточного глутатиона, но при этом концентрация тиобарбитурат-реактивных продуктов плазмы (ТБРП) не уменьшается (табл. 3). Это может говорить о том, что гентамицин за счет своих антибактериальных свойств уменьшает интенсивность процессов пероксидации, вызванных инфекцией, однако собственное прооксидантное действие не позволяет значительно уменьшить концентрацию продуктов перекисного окисления липидов. Совместное применение антиоксидантов с гентамицином принципиально не изменяет картину маркеров пероксидации. Ципрофлоксацин препятствует истощению внутриклеточного глутатиона. Аналогичный эффект наблюдается и при сочетании его с аскорбиновой кислотой, однако применение этой комбинации не уменьшает концентрацию ТБРП. Использование антиоксидантов в условиях химиотерапии ципрофлоксацином приводит к повышению активности антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы (ГПО).

Закономерное угнетение процессов пероксидации наблюдается после введения цефтазидима как в виде монотерапии, так и в комбинации с антиоксидантами. Снижение активности каталазы относительно контроля можно расценивать как результат отсутствия компенсаторной активации фермента в ответ на повышение концентрации активных форм кислорода. Аскорбиновая кислота, метилэтилпиридинол и ацетилцистеин оказывают антиоксидантное действие при совместном применении с хлорамфениколом, выражающееся в значимом снижении концентрации ТБРП. Тетрациклин во всех группах, напротив, повышает концентрацию ТБРП вне зависимости от присутствия антиоксидантов, что, вероятнее всего, связано с замедлением элиминации продуктов ПОЛ вследствие почечной и печеночной дисфункции.

Таблица 2. Маркеры поражения печени и почек в условиях экспериментального перитонита

Группа	АЛТ, мкмоль/(с×л)	ЩФ, нмоль/(с×л)	Мочевина, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л
Серия «Гентамицин»				
1	1,13(0,85;1,48)	1758,2(1609,4;1920,5)	2,48(2,23;2,67)	66,34(60,71;70,28)
2	1,22(0,77;1,29)	1517,7(1287,1;1713,8)	5,08(4,14;7,03)*	76,36(75,29;94,45)*
3	1,21(1,02;1,36)	1665,0(1124,8;1744,6)	4,26(3,62;4,65)*	80,36(72,85;88,25)*
4	1,26(1,08;1,59)	1625,9(1238,2;1903,9)	5,13(4,06;6,47)*	89,88(77,80;109,97)*
5	1,28(0,96;1,40)	1517,7(1378,0;1638,7)	4,89(3,74;5,21)*	93,88(81,99;106,2)*
Серия «Ципрофлоксацин»				
1	1,93(1,84;2,53)	1457,6(1438,1;1865,6)	1,56(1,41;2,08)	46,82(45,19;49,32)
2	1,87(1,83;1,90)	1463,6(1396,8;1529,8)	1,78(1,55;2,08)	51,82(48,88;54,51)
3	1,77(1,62;2,09)	1304,3(1279,6;1589,1)	1,93(1,72;2,03)	50,82(49,70;53,14)
4	1,80(1,74;1,99)	1457,6(1292,3;1559,8)	1,78(1,64;1,89)	51,32(48,63;53,01)
5	1,77(1,67;1,96)	1319,4(1249,5;1820,5)	1,62(1,57;1,80)	50,32(50,07;53,20)
Серия «Цефтазидим»				
1	1,32(1,27;1,64)	1193,1(1103,0;1722,1)	1,84(1,74;1,91)	54,83(44,19;54,83)
2	1,23(1,17;1,29)*	1301,3(1178,9;1762,7)	1,77(1,76;1,86)	50,57(42,06;58,02)
3	1,10(0,85;1,25)*	1301,3(1153,3;1532,0)	1,73(1,71;1,97)	50,57(40,11;54,83)
4	1,11(0,96;1,22)*	1295,3(1215,7;1369,7)	1,66(1,65;1,71)	46,32(42,06;56,96)
5	1,11(0,87;1,18)*	1310,4(1206,7;1382,5)	1,72(1,63;2,30)	48,32(42,94;51,82)
Серия «Хлорамфеникол»				
1	1,91(1,87;2,18)	1692,0(1666,5;1801,0)	2,05(2,00;2,13)	48,82(46,75;54,89)
2	2,08(1,99;2,15)	1767,2(1728,1;1820,5)	2,02(1,34;2,14)	56,08(46,57;60,40)
3	2,15(1,88;2,20)	1752,2(1678,5;1837,8)	2,18(2,09;2,35)	54,83(52,20;55,20)
4	1,97(1,81;2,04)	1496,7(1487,7;1577,8)*	2,02(1,99;2,03)	48,32(47,19;53,08)
5	1,98(1,92;2,10)	1628,9(1523,7;1707,1)	2,02(1,95;2,12)	53,58(48,88;56,71)
Серия «Тетрациклин»				
1	1,35(1,07;1,61)	1887,4(1678,5;2134,6)	1,98(1,91;2,23)	60,34(54,83;63,59)
2	1,99(1,83;2,02)*	1568,8(1261,5;1585,4)*	8,67(7,72;10,03)*	82,36(75,92;106,59)*
3	2,47(2,03;2,56)*	1391,5(1273,5;1550,0)*	9,10(8,16;10,67)*	79,11(72,54;85,37)*
4	1,95(1,83;2,30)*	1487,7(1398,3;1660,5)	8,92(7,93;9,49)*	82,37(81,49;95,07)*
5	2,07(1,89;2,28)*	1505,7(1181,9;1671,0)*	8,47(7,96;9,77)*	88,38(79,80;94,26)*

* – значимое различие с контрольной группой серии (p<0,05)

Введение антибактериальных средств значительно снижает концентрацию церулоплазмينا в плазме крови, что свидетельствует об уменьшении воспалительной реакции и может считаться проявлением их основного действия (рис. 1). Совместное введение со всеми антиоксидантами препятствует проявлению указанного эффекта гентамицином. Необходимо также отметить, что снижение концентрации церулоплазмينا наблюдается и при введении комбинации цефтазидима и антиоксидантов, однако в случае ацетилцистеина и метилэтилпиридинола носит статистически незначимый характер.

Таблица 3. Маркеры пероксидации в условиях экспериментального перитонита

Группа	КАТ, % на мг Нб	ВГ, мкмоль/г Нб	ГПО, мкмоль/(мин×л)	ТБРП, мкМ
Серия «Гентамицин»				
1	0,030(0,026;0,043)	0,56(0,49;0,61)	18,11(17,37;20,80)	4,88(3,26;5,11)
2	0,049(0,045;0,054)*	0,78(0,68;0,79)*	19,62(17,61;22,31)	4,65(3,63;5,88)
3	0,041(0,037;0,047)	0,74(0,56;0,82)	17,15(13,48;21,54)	4,26(3,73;4,61)
4	0,036(0,029;0,060)	0,70(0,63;0,77)*	18,84(16,72;20,80)	3,76(3,44;4,41)
5	0,046(0,043;0,060)*	0,70(0,55;0,73)	19,32(17,28;22,36)	3,64(3,22;4,24)
Серия «Ципрофлоксацин»				
1	0,042(0,033;0,051)	0,55(0,52;0,65)	13,31(12,92;16,99)	4,69(4,52;4,92)
2	0,038(0,035;0,044)	0,73(0,65;0,76)*	14,69(12,26;17,07)	3,95(3,59;4,49)*
3	0,039(0,028;0,048)	0,72(0,63;0,82)*	18,90(16,07;19,74)*	4,65(4,53;4,68)
4	0,042(0,030;0,050)	0,63(0,50;0,88)	19,39(17,55;20,41)*	3,64(3,39;4,42)*
5	0,038(0,029;0,055)	0,62(0,54;0,67)	19,23(17,78;21,12)*	4,11(3,75;4,31)*
Серия «Цефтазидим»				
1	0,048(0,035;0,051)	0,52(0,38;0,58)	16,77(14,48;17,72)	4,38(3,89;4,60)
2	0,027(0,019;0,038)*	0,67(0,56;0,76)*	19,07(18,11;22,71)*	2,79(2,34;3,71)*
3	0,029(0,026;0,032)*	0,67(0,62;0,74)*	20,09(19,73;22,26)*	2,87(2,51;3,30)*
4	0,031(0,021;0,033)*	0,68(0,64;0,72)*	21,57(19,71;22,11)*	3,29(3,23;3,58)*
5	0,031(0,029;0,035)*	0,68(0,67;0,71)*	21,48(18,63;22,91)*	2,91(2,27;3,49)*
Серия «Хлорамфеникол»				
1	0,045(0,033;0,052)	0,63(0,26;0,81)	17,51(12,63;19,14)	3,99(3,93;4,55)
2	0,039(0,038;0,044)	0,84(0,71;1,03)	15,48(12,71;19,01)	3,95(3,76;4,02)
3	0,040(0,037;0,053)	0,47(0,28;0,86)	17,58(16,35;17,93)	3,41(3,30;3,73)*
4	0,038(0,035;0,040)	0,66(0,53;0,74)	17,19(15,30;23,16)	3,53(3,46;3,94)*
5	0,033(0,028;0,037)	0,79(0,55;0,99)	18,89(13,27;19,72)	3,49(3,43;3,59)*
Серия «Тетрациклин»				
1	0,044(0,039;0,048)	0,50(0,44;0,57)	18,10(16,14;21,13)	5,00(4,29;5,20)
2	0,034(0,033;0,040)*	0,45(0,35;0,59)	15,32(14,94;16,11)	6,05(5,45;6,30)*
3	0,036(0,032;0,049)	0,53(0,51;0,56)	15,15(13,95;15,94)	5,89(5,50;6,68)*
4	0,046(0,041;0,047)	0,53(0,45;0,66)	16,47(12,73;18,90)	5,97(5,80;7,08)*
5	0,043(0,043;0,045)	0,49(0,46;0,57)	15,98(13,88;17,19)	6,05(5,45;6,30)*

* – значимое различие с контрольной группой серии ($p < 0,05$)

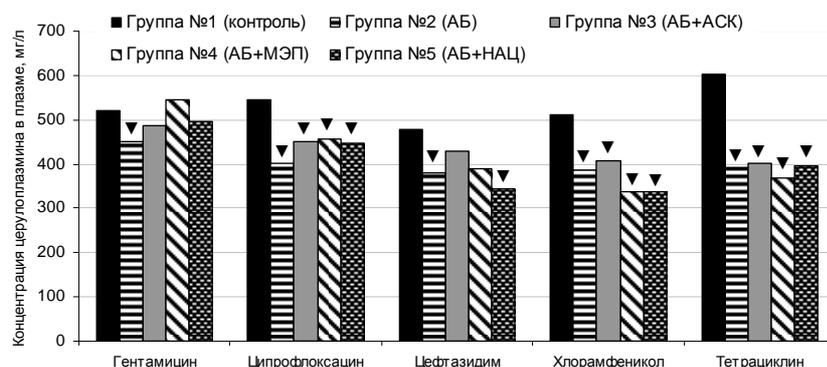


Рис. 1. Концентрация церулоплазмينا в плазме при экспериментальном перитоните (▼ – значимое различие с контрольной группой серии, $p < 0,05$)

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что эффективность применения антиоксидантов при перитоните, вызванном кишечной палочкой, зависит от применяемого химиотерапевтического средства. Антиоксиданты препятствуют реализации антибактериального действия гентамицина, при этом не уменьшают нефротоксическое действие антибиотика. Все изученные антиоксиданты уменьшают прооксидантный эффект хлорамфеникола и ципрофлоксацина, не влияя на их антибактериальную активность. Совместное применение антиоксидантов и тетрациклина нецелесообразно.

Список литературы

1. Гаврилов В.Б. Определение ТБК-реагирующих продуктов в тканях / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, М.Л. Мажуль // *Вопр. мед. химии.* – 1987. – Т. 33. - № 1. – С. 117-123.
2. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк // *Лаб. дело.* – 1988. - №1. – С. 16-19.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
4. Минаева Л.В. Экспериментальная оценка роли изменения системы глутатиона в реализации побочных цитотоксических эффектов повторного введения циклофосфана : дисс. канд. мед. наук : 14.00.20, 03.00.04 / Л.В. Минаева. – СПб., 2007. – 178 с.
5. Мирошниченко А.Г. Антиоксидантная модуляция чувствительности *Escherichia coli* к ципрофлоксацину / А.Г. Мирошниченко, В.М. Брюханов, Л.Ю. Бутакова, И.Е. Госсен, В.Ю. Перфильев, П.В. Смирнов // *Фундаментальные исследования.* – 2013. -№ 7 (часть 3). – С. 584-588.
6. Мирошниченко А.Г. Влияние антиоксидантов на развитие чистой культуры *Escherichia coli* и ее чувствительность к гентамицину / А.Г. Мирошниченко, В.М. Брюханов, Л.Ю. Бутакова, И.Е. Госсен, В.Ю. Перфильев, П.В. Смирнов // *Фундаментальные исследования.* – 2013. - № 5 (часть 2). – С. 339–343.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
8. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – Vol. 82. - № 1. – P. 70-77.
9. Fanton J.C. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reactions / J.C. Fanton, P.A. Ward // *Am. J. Pathol.* – 1982. – Vol. 107. – P. 397-418.

10. Kang C. Protective Effects of *Houttuynia cordata* Thunb. on Gentamicin-induced Oxidative Stress and Nephrotoxicity in Rats / C. Kang, H. Lee, D. Hah, J.H. Heo, C.H. Kim, E. Kim, J.S. Kim // *Toxicol. Res.* – 2013. – Vol. 29(1). – P. 61-67.
11. Ravin H.A. An improved colorimetric enzymatic assay for caeruloplasmin. // *J. Lab. Clin. Med.* 1961. – V. 58. – P. 161.
12. Reilly P.M. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites / P.M. Reilly, W. Schiller, G.B. Bulkley // *Am. J. Surg.* – 1991. – Vol. 161. – P. 488-503.
13. Tuin, A. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver / A. Tuin, A. Huizinga-Van der Vlag, A.M. van Loenen-Weemaes, D.K. Meijer, K. Poelstra // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2006. – Vol. 290(2). – P. 377-385.
14. Wink D.A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response / D.A. Wink, H.B. Hines, R.Y.S. Cheng, C.H. Switzer, W. Flores-Santana, M.P. Vitek, L.A. Ridnour, C.A. Colton // *J. Leukoc. Biol.* – 2011. – Vol. 89(6). – P. 873-891.

Рецензенты:

Смирнов И.В., д.м.н., зав. кафедрой фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России, г. Барнаул.

Галактионова Л.П., д.б.н., профессор кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России, г. Барнаул.