

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ И АНТИОКСИДАНТОВ IN VITRO

Мирошниченко А.Г.¹, Брюханов В.М.², Бондарев А.А.¹, Перфильев В.Ю.², Немцев А.О.¹, Госсен И.Е.²

¹ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул, e-mail: ag.miro@ya.ru;

²ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Барнаул, e-mail: 1991ps@mail.ru

Проведено динамическое исследование влияния антиоксидантов (восстановленный глутатион, аскорбиновая кислота, N-ацетилцистеин, метилэтилпиридинол) в концентрациях 0,5, 1, 2 и 4 мМ на активность антибактериальных средств (гентамицин, цiproфлоксацин, цефтазидим, тетрациклин, хлорамфеникол) *in vitro* в отношении трех штаммов *Klebsiella pneumoniae* и трех штаммов *Escherichiacoli*. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией была изучена возможность взаимодействия между молекулами антибактериальных средств и антиоксидантов. Установлено, что все антиоксиданты значительно снижают активность гентамицина. Восстановленный глутатион и N-ацетилцистеин снижают активность цiproфлоксацина, цефтазида, а также тетрациклина, но практически не влияют на активность хлорамфеникола. Аскорбиновая кислота и метилэтилпиридинол увеличивают активность цефтазида и хлорамфеникола. Метилэтилпиридинол слабо увеличивает активность цiproфлоксацина, меньше – тетрациклина (только в отношении *Klebsiellapneumoniae*). Аскорбиновая кислота слабо снижает активность цiproфлоксацина в отношении *Klebsiellapneumoniae*, оказывает слабое и неоднозначное влияние на активность тетрациклина. Описанные взаимодействия носят фармакодинамический характер, поскольку анализ смесей показал отсутствие химического взаимодействия между антибактериальными средствами и антиоксидантами. Модулирующая активность антиоксидантных веществ в отношении действия антибактериальных средств может различаться в пределах одного вида микроорганизма.

Ключевые слова: антибактериальные средства, антиоксиданты, *Klebsiellapneumoniae*, *Escherichiacoli*, лекарственное взаимодействие.

INTERACTION BETWEEN SOME ANTIBACTERIAL AGENTS AND ANTIOXIDANTS IN VITRO

Miroshnichenko A.G.¹, Bryukhanov V.M.², Bondarev A.A.¹, Perfilev V.Yu.², Nemcev A.O.¹, Gossen I.E.²

¹Altai State University, Barnaul, e-mail: ag.miro@ya.ru;

²Altai State Medical University, Barnaul, e-mail: 1991ps@mail.ru

We performed a dynamic study of the effect of antioxidants (reduced glutathione, ascorbic acid, N-acetylcysteine, methylethylpyridinol) at concentrations of 0.5, 1, 2, and 4 mM on activity of antibacterial agents (gentamicin, ciprofloxacin, ceftazidime, tetracycline, chloramphenicol) *in vitro* against three strains of *Klebsiella pneumoniae* and three strains of *Escherichia coli*. HPLC coupled with tandem mass spectrometry was explored the possibility of interaction between molecules antibacterial agents and antioxidants. It was established that all antioxidants significantly reduce the activity of gentamicin. Reduced glutathione and N-acetylcysteine reduce the activity of ciprofloxacin, ceftazidime and tetracycline, but almost no influence on the activity of chloramphenicol. Ascorbic acid and methylethylpyridinol increase the activity of ceftazidime and chloramphenicol. Methylethylpyridinol slightly increases the activity of ciprofloxacin, less – tetracycline (for *Klebsiella pneumoniae* only). Ascorbic acid reduces the activity of weakly ciprofloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, has a weak and ambiguous effect on the activity of tetracycline. The described interactions are pharmacodynamic character, since the analysis of mixtures showed no chemical interaction between the antibacterial agents and antioxidants. Modulating activity of antioxidants against the action of antibacterial agents may vary within the same species of microorganism.

Keywords: antibacterial agents, antioxidants, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, drug interactions.

Использование антибактериальных средств привело к появлению и широкому

распространению резистентных микроорганизмов, в некоторых случаях устойчивых к нескольким классам антибактериальных препаратов [2]. Массовое распространение резистентных штаммов в популяциях условно-патогенных микроорганизмов стало важной проблемой клинической медицины в связи с их более высокими адаптационными возможностями по сравнению с возбудителями классических инфекций. Особенно проблемной является антибиотикорезистентность бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, вызывающих широкий спектр заболеваний разной локализации и тяжести течения [1, 10].

В связи с признанием универсальной роли усиления процессов свободно-радикального окисления в развитии воспаления инфекционной этиологии дополнительное назначение антиоксидантов (АО) является патогенетически оправданным. Бактериальная инфекция сопровождается повышенной генерацией активных форм кислорода, повреждающих биомолекулы и вносящих существенный вклад в развитие нарушений клеточного метаболизма, тканевой и органной дисфункции [6]. В то же время бактерицидное действие многих антибактериальных средств имеет общий механизм, связанный с генерацией ОН-радикалов и развитием окислительного стресса в бактериальных клетках [8]. В связи с этим АО могут уменьшать действие таких средств и, соответственно, снижать эффективность лечения. Нельзя исключить также и возможность прямого химического взаимодействия антибактериальных средств и АО.

Цель работы – исследование взаимодействия между некоторыми АО (восстановленный глутатион, аскорбиновая кислота, метилэтилпиридинол, N-ацетилцистеин) и антибактериальными средствами (гентамицин, ципрофлоксацин, цефтазидим, хлорамфеникол, тетрациклин) *in vitro*.

Материал и методы

Для исследований *in vitro* были использованы периодические культуры контрольных и клинических штаммов наиболее значимых представителей семейства *Enterobacteriaceae* – *Escherichia coli* (EC1 – контрольный штамм ATCC 25922; EC2 – штамм, полученный из цервикального канала больной эндометритом; EC3 – штамм, полученный из кала пациента с дисбактериозом) и *Klebsiella pneumoniae* (KP1 – контрольный штамм ATCC 13883; KP2 – штамм, полученный из мокроты больного хронической обструктивной болезнью легких; KP3 – штамм, полученный из цервикального канала пациентки при обследовании). Идентификация микроорганизмов проводилась при помощи системы «ENTEROtest 16» (Erba Lachema s.r.o., Чехия) с использованием планшетного фотометра Multiskan-Ascent (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия) и программного обеспечения «Микроб-Автомат». Всего было проанализировано 3300 проб (инкубационных смесей, содержащих указанные штаммы).

Для инкубации готовили смесь на основе минеральной питательной среды М9. Для этого готовили основной раствор, 1 л которого содержит 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). Перед использованием 50 мл раствора в асептических условиях смешивали с 175 мл дистиллированной воды, 0,5 мл 1 М раствора MgSO_4 , 5 мл 20 % раствора глюкозы, 0,025 мл 1 М раствора хлорида кальция (Sigma-Aldrich, США).

В приготовленную питательную среду в асептических условиях добавлялись АО – восстановленный глутатион (Sigma-Aldrich, США), аскорбиновая кислота (Panreac, Испания), N-ацетилцистеин (Sigma-Aldrich, США), метилэтилпиридинол (ФГУП МЭЗ, Россия) – до конечных концентраций 0,25, 0,5, 1, 2 и 4 мМ, а также антибактериальные средства – гентамицин (AppliChem, Германия), ципрофлоксацин (Sigma-Aldrich, США), цефтазидим (Sigma-Aldrich, США), хлорамфеникол (Panreac, Испания), тетрациклин (AppliChem, Германия) – до конечных сублетальных концентраций, составляющих 50 % от найденных минимальных подавляющих концентраций (МПК). Выбор антибактериальных средств проводился в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Из штаммов готовили суточные культуры инкубацией на скошенном агаре при 35 °С, которые использовали для приготовления инокулятов – бактериальных суспензий в 0,9 % растворе хлорида натрия с оптической плотностью 1,0 по Мак-Фарланду. После инокуляции бактериальной суспензии (0,5 мл суспензии + 3 мл среды) смесь, содержащую АО и антибактериальные средства в указанных концентрациях, инкубировали в воздушном термостате при 35 °С в течение 24 часов. Оценку развития штаммов оценивали путем измерения оптической плотности бактериальной суспензии с помощью аппарата Densi-lameter (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Измерения проводились каждые 2 часа в течение 12 часов, а также через 24 часа инкубации. Полученные данные сравнивали с данными контрольных смесей, не содержащих АО.

Исследование химического взаимодействия АО и антибактериальных средств проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией с помощью системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии 1260 Infinity (Agilent Technologies, США) с гибридным квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометром высокого разрешения Accurate Mass Q-TOF 6530 (Agilent Technologies, США). Для приготовления подвижных фаз, буферных растворов и проведения пробоподготовки использовали: ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США),

муравьиную кислоту (Sigma-Aldrich, США), воду для ВЭЖХ-МС анализа (AppliChem, Германия) и стандарты: восстановленный глутатион (Sigma-Aldrich, США), аскорбиновая кислота (Panreac, Испания), N-ацетилцистеин (Sigma-Aldrich, США), метилэтилпиридинол (ФГУП МЭЗ, Россия), гентамицин (AppliChem, Германия), ципрофлоксацин (Sigma-Aldrich, США), цефтазидим (Sigma-Aldrich, США), хлорамфеникол (Panreac, Испания), тетрациклин (AppliChem, Германия). Пробоподготовку производили по следующей схеме: индивидуальные стандарты растворяли в воде (для хлорамфеникола дополнительно использовался этиловый спирт) для ВЭЖХ-МС анализа до концентрации 0,001 М. Для анализа взаимодействия антибактериальных средств с АО готовили 0,002 М растворы стандартов антибиотиков и АО, затем смешивали их в равных объемах. Конечная концентрация стандартов в растворе составила 0,001 М. Использовали хроматографическую колонку ZORBAX EclipsePlus C18, 1,8 мкм, 2.1x50 мм (Agilent, США) при температуре 30 °С. Подвижная фаза состояла из элюента А (0,1 % муравьиной кислоты / вода для ВЭЖХ-МС анализа) и элюента В (0,1 % муравьиной кислоты / ацетонитрил). Анализ производили в градиентном режиме, линейный градиент: 40 мин. от 5 % до 95 % элюента В. Скорость потока составляла 0,2 мл/мин. Объем вводимой пробы – 2 мкл. Спектр снимали в положительной ионизации.

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

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования модуляции активности антибактериальных средств (АБС) антиоксидантами представлены в таблице. Хромато-масс-спектрометрический анализ показал, что изучаемые АО и антибактериальные вещества не реагируют друг с другом и не образуют устойчивых комплексов, что говорит о фармакодинамическом характере найденных взаимодействий. Рассмотрим их возможные механизмы.

Обращает на себя внимание выраженный антагонизм гентамицина и АО, который свидетельствует о важной роли усиления процессов пероксидации в реализации бактерицидного действия антибиотика. Отметим, что аминогликозиды – это единственный класс ингибиторов биосинтеза белка, оказывающий бактерицидное действие. Это подтверждается данными М.А. Kohansky и соавт. (2007), доказавшими ведущую роль свободнорадикального окисления в реализации указанного действия [5].

Глутатион как естественный метаболит рассматриваемых микроорганизмов обеспечивает универсальную защиту от активных форм кислорода [9]. В связи с этим

ожидаемым является снижение активности ципрофлоксацина и цефтазидима – антибиотиков с найденным прооксидантным компонентом в механизме действия [5] – под влиянием этого антиоксиданта, а также его предшественника N-ацетилцистеина.

Взаимодействие антибактериальных средств и антиоксидантов *in vitro*

Антиоксидант	<i>Escherichiacoli</i>			<i>Klebsiellapneumoniae</i>			АБС
	EC1	EC2	EC3	KP1	KP2	KP3	
Глутатион	A++	A++	A++	A++	A++	A++	Гентамицин
Аскорбиновая к-та	A++	A++	A++	A++	A++	A++	
Метилэтилпиридинол	A++	A++	A++	A++	A++	A++	
N-ацетилцистеин	A++	A++	A++	A++	A++	A++	
Глутатион	A++	A++	A++	A+	A++	A++	Ципро- флоксацин
Аскорбиновая к-та	0	0	0	0	A+	A++	
Метилэтилпиридинол	C	0	C	C++	C	C	
N-ацетилцистеин	A++	A++	A++	A	A++	A++	
Глутатион	A++	A++	0	A++	A+	A+	Цефтазидим
Аскорбиновая к-та	C	C	C	C	C	C	
Метилэтилпиридинол	C	C	C	C	C	C	
N-ацетилцистеин	A++	A++	A++	A++	A++	A+	
Глутатион	A	0	0	0	0	0	Хлорам- феникол
Аскорбиновая к-та	C++	C++	0	C	C	C++	
Метилэтилпиридинол	C+	C++	C+	C++	C+	C++	
N-ацетилцистеин	0	0	0	0	0	0	
Глутатион	A++	A++	A++	A++	A++	A	Тетрациклин
Аскорбиновая к-та	0	A	C	A	0	C	
Метилэтилпиридинол	0	0	0	C	C+	C+	
N-ацетилцистеин	A	A	0	0	A	0	

Примечание. Антагонизм: A++ – в течение 24 ч инкубации; A+ – в большинстве наблюдений, зависимость от концентрации АО может отсутствовать; A – эпизодическое развитие культуры выше контроля, зависимость от концентрации АО может отсутствовать; 0 – отсутствие влияния, развитие культуры не изменяется, либо имеются точечные изменения относительно контроля. Синергизм: C – эпизодическое развитие культуры ниже контроля, зависимость от концентрации АО может отсутствовать; C+ – в большинстве наблюдений, зависимость от концентрации АО может отсутствовать; C++ – в течение 24 ч инкубации.

Механизм действия тетрациклина не ассоциирован со свободнорадикальным окислением, однако тиольные антиоксиданты также проявили антагонизм во взаимодействии

с антибиотиком. Причиной этого может являться нейтрализация неспецифической прооксидантной активности, проявляемой тетрациклином в высоких концентрациях как веществом с фенольной структурой. В пользу неспецифической антиоксидантной защиты говорит также и менее выраженный эффект N-ацетилцистеина, молекула которого, в отличие от восстановленного глутатиона, содержит только одну сульфгидрильную группу.

Примечательно, что влияние аскорбиновой кислоты на активность антибактериальных средств не имеет какой-либо явной закономерности. Причиной этого является химическая нестабильность молекулы аскорбиновой кислоты в аэробных условиях, а также способность вещества выступать в качестве прооксиданта [7].

Особый интерес представляет собой выявленная активность метилэтилпиридинола. Самостоятельная антибактериальная активность этого антиоксиданта была показана нами ранее [4]. Установлено, что метилэтилпиридинол усиливает действие всех изучаемых антибактериальных средств, за исключением гентамицина, в отношении большинства штаммов, причем наиболее сильный эффект проявляется в высоких концентрациях антиоксиданта. Этот факт говорит, во-первых, об отсутствии конкуренции за фармакологическую мишень, во-вторых – о незначительном влиянии антиоксидантных свойств метилэтилпиридинола на действие прооксидантных средств. В то же время при инкубации с гентамицином метилэтилпиридинол проявил наиболее выраженную по сравнению с другими АО антагонистическую активность. В связи с этим оправданным кажется предположение, согласно которому метилэтилпиридинол имеет сходный с аминогликозидами механизм антибактериального действия, хотя и более слабый.

Использование веществ, изменяющих активность антибактериальных средств, имеет не только явное клиническое, но и эпидемиологическое значение. Применение любого антибактериального средства приводит к постепенному возрастанию частоты резистентности к нему микроорганизмов. Интервал времени от начала применения препарата до момента возникновения 100 %-ной устойчивости является временем эффективного использования антибактериального средства. Включение в химиотерапию модуляторов-синергистов, повышающих эффективность лечения, приводит к увеличению этого времени. Модуляторы-антагонисты, снижающие активность антибактериального средства, уменьшают время его эффективного использования.

Также необходимо отметить, что активность каждого антиоксиданта существенно зависит от среды и условий, в которых реализуется его действие. Действие некоторых антиоксидантов может инвертироваться при изменении их содержания. В связи с этим эффекты, проявляемые антиоксидантами, определяются, прежде всего, применяемой дозой, путем введения, биотрансформации и элиминации.

Первостепенную роль играет оценка модулирующей активности антиоксидантов *in vitro* в том диапазоне концентраций, которые могут реально создаваться при использовании препаратов у больных. Для правильного подбора препаратов, применяемых в комплексном лечении инфекционного больного, необходимо проведение таких исследований именно с тем возбудителем, который вызвал данное заболевание, так как тип взаимодействия антибактериальных средств и антиоксидантов определяется не только механизмами действия этих препаратов, но и особенностями конкретного штамма микроорганизма. Тесты *in vitro* на периодических культурах микроорганизмов должны сопровождаться динамическим наблюдением за их развитием, так как однократная оценка количества клеток по истечении периода инкубации может привести к ошибочным результатам вследствие:

1) ограниченности питательных веществ среды (вещества, ускоряющие рост бактериальной культуры, приводят к более раннему наступлению стационарной фазы и, соответственно, фазы отмирания);

2) отсутствия элиминации токсических продуктов метаболизма бактерий (интенсивное размножение стимулированных бактериальных культур сопровождается не только повышенным потреблением питательных веществ, но и повышением образования токсических продуктов жизнедеятельности);

3) нестабильности веществ-модуляторов (концентрация веществ, устойчивость которых в условиях инкубации невысока, с течением времени убывает, и, соответственно, снижается влияние таких веществ на развитие бактериальной культуры) или их преимущественного влияния на определенную фазу развития культуры.

Выводы

Изученные антиоксиданты значительно снижают активность гентамицина. Восстановленный глутатион и N-ацетилцистеин снижают активность ципрофлоксацина, цефтазидима, а также тетрациклина, но практически не влияют на активность хлорамфеникола. Аскорбиновая кислота и метилэтилпиридинол увеличивают активность цефтазидима и хлорамфеникола. Метилэтилпиридинол слабо увеличивает активность ципрофлоксацина, меньше – тетрациклина (только в отношении *Klebsiella pneumoniae*). Аскорбиновая кислота слабо снижает активность ципрофлоксацина в отношении *Klebsiella pneumoniae*, оказывает слабое и неоднозначное влияние на активность тетрациклина. Описанные взаимодействия антибактериальных средств и антиоксидантов носят фармакодинамический характер, при этом модулирующая активность АО может различаться в пределах одного вида микроорганизма.

Список литературы

1. Анганова Е.В. Антибиотикорезистентность условно-патогенных энтеробактерий, выделенных от больных острыми кишечными инфекциями [Текст] / Е.В. Анганова // Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск). – 2012. – Т. 114, № 7. – С. 98–99.
2. Антибиотикорезистентность грамотрицательных возбудителей осложнённых интраабдоминальных инфекций в России [Текст] / Р.С. Козлов, А.В. Голуб, А.В. Дехнич [и др.] // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 227–234.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия [Текст]: учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва: Высш. шк., 1990. – 352 с.
4. Мирошниченко А.Г., Брюханов В.М., Бутакова Л.Ю., Госсен И.Е., Перфильев В.Ю., Смирнов П.В. Влияние антиоксидантов на развитие чистой культуры *Escherichia coli* и ее чувствительность к гентамицину // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 5-2. – С.339-343.
5. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics [Текст] / М.А. Kohanski, D.J. Dwyer, B. Hayete [et al.] // Cell. – 2007. – Vol. 130 (7). – P. 797–810.
6. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis [Текст] / D.A. Lowes, N.R. Webster, M.P. Murphy [et al.] // British Journal of Anaesthesia. – 2013. – Vol. 110 (3). – P. 472–480.
7. Matsuoka, Y. Fluorescence probe for the convenient and sensitive detection of ascorbic acid / Y. Matsuoka, M. Yamato, K. Yamada [Текст] / J. Clin. Biochem. Nutr. – 2016. – Vol. 58 (1). – P. 16–22.
8. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. Nature biotechnology [Текст] / M.P. Brynildsen, J.A. Winkler, C.S. Spina [et al.] // Nature biotechnology. – 2013. – Vol. 31. – P. 160–165.
9. Survival of *Escherichia coli* cells on solid copper surfaces is increased by glutathione [Текст] / C. Große, G. Schleuder, C. Schmöle [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – Vol. 80(22). – P. 7071–7078.
10. Walsh T.R. The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response [Текст] / T.R. Walsh, M.A. Toleman // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67. – P. 1–3.