

УДК 615.28

НОВЫЙ УНИВЕРСАЛЬНЫЙ СПОСОБ ПРЕОДОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Абдалкин М.Е.

НОУ СМИ «РЕАВИЗ», Самара, e-mail: mail@reaviz.ru

Важнейшей проблемой современной медицины стало массовое распространение лекарственной устойчивости у условно-патогенных бактерий и грибов. Одним из решений этой проблемы является создание новых антимикробных лекарственных препаратов и разработка способов преодоления их лекарственной устойчивости. Автором проведены исследования по изучению лекарственной резистентности условно-патогенных микроорганизмов, направленные на оптимизацию сочетания компонентов в новом комбинированном антимикробном препарате (анилиновых красителей и антимикробных химиопрепаратов), для реализации нового универсального способа преодоления лекарственной устойчивости условно-патогенных бактерий и грибов, которые позволили сформулировать его основные положения.

Ключевые слова: лекарственная устойчивость, противомикробные препараты

NEW UNIVERSAL METHOD TO OVERCOME THE RESISTANCE OF MICROORGANISMS

Abdalkin M.E.

Samara medical Institute «REAVIZ», Samara, e-mail: mail@reaviz.ru

The major problem of modern medicine has become the mass distribution of drug resistance in conditionally pathogenic bacteria and fungi. One solution to this problem is to develop new antimicrobial drugs and develop ways to overcome their resistance. The author conducted a study on drug resistance of opportunistic pathogens to optimize combinations of components in the new combined antimicrobial (aniline dyes and antimicrobial chemotherapy), to implement a new universal method for overcoming drug resistance of opportunistic bacteria and fungi, which are allowed to formulate its basic position.

Keywords: drug resistance, antimicrobial agents

Важнейшей проблемой современной медицины стало массовое распространение лекарственной устойчивости у условно-патогенных бактерий и грибов.

Одним из решений этой проблемы является создание новых антимикробных лекарственных препаратов и разработка способов преодоления их лекарственной устойчивости.

Кроме того, современное состояние фармацевтического рынка (из-за присутствия большого количества дженериков) часто дезориентирует врача в плане выбора оптимального антибиотика, а высокая стоимость наиболее эффективных из них уменьшает спектр используемых антимикробных средств и часто обуславливает возврат к уже апробированным, ставшими «традиционными», препаратам, применение которых уже не дает ожидаемых результатов.

Выбрать идею (направление исследований) помог случай, когда по ошибке диски с антибиотиками были помещены на поверхность свежеприготовленной питательной среды Эндо с культурой полирезистентного штамма лактозонегативных эшерихий (среда была схожа по цвету с мясопептонным агаром и чашки Петри с ней не были промаркированы лаборантом). Интерес вызвали необычно большие диаметры зон задержки роста культуры: для тетрациклина – 52 мм, эритромицина (к которому штамм был ре-

зистентен) – 19 мм. Полученные данные о потенцировании действия антибиотиков в использованных условиях проведения опыта побудили нас рассмотреть компоненты питательной среды Эндо на предмет синергидного действия с препаратами тетрациклинового, пенициллинового ряда, макролидами и левомицетином (к ним большинство условно-патогенных энтеробактерий, выделенных от больных в г. Самаре, были резистентны). Таковым оказался фуксин.

Цель исследования – создание универсального способа преодоления лекарственной резистентности микробов на основе комбинированного применения антимикробных препаратов (к которым микробы резистентны) в средних терапевтических дозах и анилиновых красителей (метиленового синего, бриллиантового зеленого и фуксина) в субингибирующих концентрациях.

Материал и методы исследования

Чувствительность условно-патогенных микробов к различным вариантам комбинированных антимикробных рецептов определялась у 1062 антибиотикорезистентных штаммов диско-диффузионным методом, руководствуясь общепринятыми методиками [3; 4], инструкциями производителей бумажных дисков.

Красители (метиленовый синий, бриллиантовый зеленый, фуксин) вводили в расплавленные плот-

ные питательные среды при температуре 45–46 °С. Разведения метиленового синего и бриллиантового зеленого готовили в стерильной дистиллированной воде, начиная с 1 % растворов. Фуксин разводили в этаноле (96 %) до концентрации 1 %, последующие разведения производили стерильной дистиллированной водой и сразу же добавляли в питательную среду.

При подборе субингибирующих концентраций красителей в питательном агаре делали лунки с помощью фламбированных металлических цилиндров диаметром 10 мм. Затем дно лунок заливали той же питательной средой (слоем 1–1,5 мм) в целях предупреждения затекания раствора красителя под агаровую пластинку в чашке Петри. Измерение диаметров зон подавления роста микробов проводили штангенциркулем.

Для планирования эксперимента по выбору оптимального соотношения антимикробного препарата и анилинового красителя использовали метод оптимизации процесса по схеме ортогональных латинских прямоугольников: 2 фактора на трех уровнях [1].

Результаты исследования и их обсуждение

Исследования планировалось провести в два этапа:

– на первом предстояло выбрать ориентировочные минимальные подавляющие концентрации анилиновых красителей для математического планирования последующих экспериментов;

– на втором установить оптимальные концентрации красителей с помощью метода ортогональных латинских прямоугольников.

1-й этап

При проведении экспериментов было также установлено, что различные штаммы одного и того же вида бактерий имеют различия в минимальных подавляющих концентрациях (мпк) анилиновых красителей, поэтому в табл. 1 приведены минимальные и максимальные величины.

Таблица 1

Значения мпк анилиновых красителей в отношении бактерий и грибов, %

Исследованные микробы	Минимальные и максимальные значения мпк анилиновых красителей (концентрация раствора)		
	фуксин основной	метиленовый синий	бриллиантовый зеленый
Энтеробактерии (spp.) (<i>n</i> = 5)	0,00500-0,01000	0,00250-0,00500	0,00250-0,00500
Золотистый стафилококк (<i>n</i> = 5)	0,00250	0,00250-0,00500	0,00125-0,00250
Эпидермальный стафилококк (<i>n</i> = 7)	0,00125-0,00500	0,00250-0,00500	0,00125-0,00250
Коринебактерии (spp.) (<i>n</i> = 5)	0,00125-0,00250	0,00125-0,00250	0,00063-0,00125
Клебсиеллы (spp.) (<i>n</i> = 5)	0,00250-0,01000	0,00250-0,01000	0,00125-0,00500
Грибы <i>Candida albicans</i> (<i>n</i> = 12)	0,00250-0,01000	0,00125-0,00250	0,00125-0,00500

Как видно из табл. 1, для большинства исследованных микроорганизмов межштаммовые различия в мпк анилиновых красителей незначительны (не более, чем в 2 раза). Обращает на себя внимание необходимость использования для подавления роста этих микробов и энтеробактеров более высоких концентраций фуксина и бриллиантового зеленого, чем в отношении стафилококков и коринебактерий.

Учитывая, что при математическом планировании экспериментов будет использовано несколько уровней концентраций анилиновых красителей, представленные в табл. 1 данные указывают на целесообразность выбора в качестве «средних» величин следующих значений: для бриллиантового зеленого – 0,00063 %; для метиленового синего и фуксина – 0,00125 %.

2-й этап

Для антибиотиков и других антимикробных лекарственных средств в качестве уровней их концентрации в жидкой питательной среде выбрали следующие значения:

– минимальные, соответствующие средним терапевтическим дозам (к ним микроб чувствителен);

– средние, соответствующие максимальным терапевтическим дозам (к ним микроб промежуточно чувствителен);

– максимальные (при них микроб считается резистентным).

При проведении экспериментов с использованием плотной питательной среды в качестве среднего уровня содержания антимикробных препаратов были приняты 20 мг (соответствует таковому в стандартных бумажных дисках). Минимальные и максимальные отличались от среднего в 2 раза.

Результирующим признаком выбрали величины зон подавления роста полирезистентных клинических изолятов бактерий (золотистого и эпидермального стафилококка, коринебактерий, клебсиеллы, энтеробактера) и грибов *Candida albicans* на плотной питательной среде, мм, при использовании бумажных дисков с различным содержанием антимикробного препарата, либо количество колониеобразующих еди-

ниц (КОЕ) в 1 мл жидкой питательной среды через 1 сутки культивирования.

Полученные результаты в табл. 2–4 показывают, что увеличение содержания антимикробных препаратов приводило к повышению ингибирования роста различных микроорганизмов (исключение составляло только действие левомицетина в жидкой питательной среде). В плотной питательной среде такое же явление на-

блюдалось в действии на бактерии анилиновых красителей, сочетавшихся с цефазолином, тетрациклином и фурагином. А у красителей закономерности «доза – эффект» не наблюдалось. Это было дополнительным доказательством, что выбранные концентрации данных веществ действительно были субингибирующими и самостоятельного антимикробного действия не проявляли.

Таблица 2

Результаты эксперимента с бактериями по схеме ортогонального латинского прямоугольника 2×3 в плотной питательной среде, мм

Факторы	Уровни факторов	Эффекты уровней факторов при подавлении бактерий					
		Klebsiella pneumoniae (БрЗ)		Enterobacter agglomerans (БрЗ)		Staphylococcus epidermidis (МС)	
		цефазолин	ципрофлоксацин	цефазолин	тетрациклин	ципрофлоксацин	фурагин
Антимикробный препарат	I	+6,3	+5,6	+10,6	+3,6	+4,9	+5,6
	II	-0,4	+0,6	-1,0	-0,8	-1,1	-0,1
	III	-5,7	-6,1	-2,4	-2,8	-3,7	-5,4
Краситель	I	+1,6	+0,2	+0,6	+2,2	-1,4	+0,3
	II	-0,7	+2,9	+1,6	+0,6	-0,3	-0,1
	III	-0,7	-3,1	-2,4	-2,8	+1,2	-0,2

Примечания:

1. Количество повторностей опыта – 3.
2. БрЗ – бриллиантовый зеленый, МС – метиленовый синий.

Таблица 3

Результаты эксперимента с бактериями по схеме ортогонального латинского прямоугольника 2×3 в жидкой питательной среде, в колониеобразующих единицах

Факторы	Уровни факторов	Эффекты уровней факторов при подавлении бактерий								
		Corynebacterium urealyticum			Staphylococcus aureus			Staphylococcus epidermidis		
		Гентамицин + МС	Эритромицин + Ф	Эритромицин + БрЗ	Гентамицин + МС	Гентамицин + БрЗ	Ципрофлоксацин + БрЗ	Левомецетин + МС	Левомецетин + БрЗ	Фурагин + МС
Антимикробный препарат	I	-205	-165	-22	-10	-7	-87	+46	+6	-23
	II	-89	+24	-17	-10	-7	+6	-30	+9	+7
	III	+294	+142	+39	+20	+14	+81	-17	-15	+16
Краситель	I	-34	-146	-4	+9	+8	+72	+30	+20	-53
	II	+4	+18	-4	-5	-5	+40	-14	-47	+32
	III	+31	+129	+8	-4	-3	-112	-16	+26	+21

Примечания:

1. Количество повторностей опыта – 3.
2. БрЗ – бриллиантовый зеленый, МС – метиленовый синий, Ф – фуксин.

Таблица 4

Результаты эксперимента с грибами *Candida albicans* по схеме ортогонального латинского прямоугольника 2×3 в плотной питательной среде, мм

Факторы	Уровни факторов	Эффекты уровней факторов при подавлении грибов, резистентных к антимикотикам		
		флуконазол	итраконазол	кетоназол
Антимикробный препарат	I	+4,6	+5,3	+6,6
	II	+1,3	+0,9	+1,6
	III	-6,0	-6,1	-7,9
Метиленовый синий	I	-0,7	+0,2	-0,9
	II	+1,6	-0,4	-0,2
	III	-1,0	+0,3	+1,1

Примечание. Количество повторностей опыта – 3.

Основываясь на полученных данных, было принято решение – применять в последующих исследованиях анилиновые красители в максимальных (из испытанных) субингибирующих концентрациях (местно) и минимальных (парентерально и per os): метиленовый синий – 0,0025% (местно) и 0,00063% (парентерально и per os); бриллиантовый зеленый – 0,00125% (местно); фуксин основной – 0,0025% (местно).

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан новый способ преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам с различным механизмом действия путем их комбинированного применения с анилиновыми красителями. При этом один компонент (вспомогательный, т.е. анилиновый краситель, применяемый в субингибирующей концентрации) обеспечивает эффективность другого (основного, к которому резистентен микроорганизм). Отмечается синергидное взаимодействие компонентов комбинированного препарата [2].

Нами сформулированы основные положения разработанного способа преодоления лекарственной устойчивости бактерий и грибов:

1. Потенцирование действия антимикробных препаратов, к которым устойчивы микробы, путем их совместного применения с анилиновыми красителями.

2. Использование красителей в субингибирующих концентрациях, при которых от-

сутствует их самостоятельное антимикробное действие.

3. Универсальность, заключающаяся в возможности преодоления резистентности различных микроорганизмов (бактерий, грибов) к препаратам разных групп (антибиотикам, фторхинолонам, нитрофуранам, антимикотикам).

Список литературы

1. Бирюков В.В. Планирование экспериментов при оптимизации процессов по схемам ортогональных латинских прямоугольников // Химико-фармацевтический журнал. – 1968. – № 1. – С. 12–21.
2. Дьяков С.И., Чижов Н.П., Сидоренко С.В. Современные антибиотики и противовирусные препараты в экспериментальной химиотерапии бактериальных и вирусных инфекций. – Минск: Беларусь, 1988. – 191 с.
3. Методические указания по изучению противомикробной активности фармакологических веществ. – М.: МЗ РФ, 1999. – 19 с.
4. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания 4.2.1890–04. – М.: МЗ РФ, 2004. – 34 с.

Рецензенты:

Кулагин О.Л., д.м.н., профессор, профессор кафедры фармакологии ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Самара;

Жестков А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 10.08.2011.