

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 576.851.48:615.277.3].001.6(045)

ВЛИЯНИЕ ДОКСОРУБИЦИНА НА АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК

О.Г. Шаповал – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава, аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии. E-mail: meduniv@sgmu.ru

Изучено влияние противоопухолевого препарата доксорубин и антибиотика из группы аминогликозидов – амикацин на адгезивную активность Escherichia coli.

Методом двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне определена антимикробная активность (МИК – минимальная ингибирующая концентрация) обоих препаратов в отношении опытных штаммов. Изучено изменение чувствительности E. coli к амикацину в присутствии S и j МИК доксорубина. После 10 пассажей в мясо-пептонном бульоне при постоянной и возрастающей концентрациях амикацина в присутствии S и j МИК доксорубина определена адгезивная активность исходных и пассажных вариантов по способности адсорбироваться на эритроцитах человека I группы, Rh (+).

Установлено, что опытные штаммы чувствительны к амикацину (МИК 1,5-6,2 мкг/мл) и не чувствительны к доксорубину (МИК 1000 мкг/мл). Субингибирующие концентрации этого цитостатика (S и j МИК) повышали чувствительность опытных штаммов к амикацину и разнонаправленно влияли на адгезивную активность пассажных вариантов.

Ключевые слова: адгезивная активность, амикацин, доксорубин, Escherichia coli.

INFLUENCE OF DOXORUBICIN ON ADHESIVE PROPERTIES OF E.COLI

O.G. Shapoval – Saratov State Medical University, Department Microbiology, Virology and Immunology, Post-graduate. E-mail: meduniv@sgmu.ru

Influence of antineoplastic drug doxorubicin and amikacin, the aminoglycoside family on adhesive activity of Escherichia coli was studied. Antimicrobial activity (minimum inhibitory concentration-MIC) of both drugs against experimental strains using serial two-fold dilution method was determined. Susceptibility of E.coli to amikacin in the presence of S and j MIC doxorubicin was studied. After 10 passages in beef-extract broth with constant and increasing doxorubicin concentrations in the presence of S and j MIC doxorubicin, the adhesive activity of initial and passage variants according to their ability to absorb human erythrocytes I(0) Rh+ was determined. It was observed that experimental strains were susceptible to amikacin (MIC 1,5-6,2 mkg/ml) but were resistant to doxorubicin (MIC 1000 mkg/ml). Subinhibitory concentrations of this cytostatic (S and j MIC) raised the sensitivity of experimental strains to amikacin and differently effected on adhesive activity of passage variants of E.coli.

Key words: adhesive activity, amikacin, doxorubicin, Escherichia coli.

Онкологические больные входят в группу высокого риска по развитию инфекционных осложнений. Это обусловлено иммуносупрессивным воздействием химиотерапевтического и лучевого методов лечения, а также тканью самой опухоли.

Этиологическая структура инфекций в онкологии представлена различными микроорганизмами [5,9]. Среди грамположительных бактерий ведущими патогенами являются микроорганизмы из семейств Staphylococcaceae (Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis), Streptococcaceae и Enterococcaceae, среди грамотрицательных бактерий

– представители семейства Enterobacteriaceae и группа «неферментирующих» бактерий, включающая различные семейства микроорганизмов, получивших характерное название в связи с отсутствием процесса брожения при утилизации углеводов [4].

Если среди возбудителей инфекций кровотока и хирургических ран лидерство сохраняется за грамположительными бактериями, то грамотрицательные бактерии часто вызывают уроинфекции и инфекции респираторного тракта [5,9].

Подавляющее большинство и грамположительных, и грамотрицательных возбудителей инфекции у он-

кологических больных относятся к условно патогенным. Развитие инфекции является следствием реализации потенциальных патогенных свойств этих возбудителей. Известно, что взаимодействии микроба-возбудителя с клетками макроорганизма начинается с адгезии. В связи с этим одними из основных факторов вирулентности грамотрицательных бактерий являются адгезины – структуры, участвующие в прикреплении возбудителя к ткани с последующим развитием колонизации и инвазии. Для грамотрицательных бактерий характерны так называемые фимбриальные адгезины (специальные белковые нитевидные выросты клеточной стенки – ворсинки), обеспечивающие более эффективную адгезию, чем афимбриальные адгезины грамположительных бактерий [8]. Процесс специфической адгезии как результат лиганд-рецепторного взаимодействия обеспечивает целый каскад клеточных реакций как со стороны самого микроба, так и со стороны клетки макроорганизма. Нарушение процессов адгезии существенно снижает патогенный потенциал возбудителя.

Возникновение инфекции у онкологических больных на фоне проведения противоопухолевой химиотерапии требует своевременного назначения антимикробных химиопрепаратов. Поскольку представители семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе *E. coli*, являются одними из основных возбудителей инфекций в онкологии, представляет интерес изучение влияния противоопухолевых и антимикробных препаратов на вирулентность данного вида микроорганизмов, в частности адгезивную активность.

Материалы и методы. Изучено сочетанное влияние противоопухолевого препарата доксорубицина из группы антрациклинов, широко применяемых при химиотерапии опухолей, и антибиотика из группы аминогликозидов – амикацина, эффективного при инфекциях, вызванных грамотрицательной флорой, на адгезивные свойства кишечных палочек. В опыт было взято 5 штаммов: стандартный – *E. coli* ATCC 25922 и четыре клинических, выделенные из гнойного отделяемого послеоперационных ран.

В предварительных экспериментах методом двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне при концентрации доксорубицина и амикацина от 1000 до

0,37 мкг/мл был установлен уровень антимикробной активности взятых в опыт препаратов – минимальная ингибирующая концентрация (МИК) [7]. Микробная нагрузка составляла 200 тыс. м. т. / мл по стандарту мутности ГИСК им. Т. А. Тарасевича. Контролем служил мясо-пептонный бульон без препарата. Результаты учитывали по наличию или отсутствию видимого роста после инкубации посево в термостате при $t\ 37^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов. Тем же методом был установлен уровень антимикробной активности амикацина в присутствии субингибирующих концентраций (S и j МИК) доксорубицина. Для изучения развития устойчивости к амикацину и влияния на этот процесс доксорубицина опытные штаммы пассировали в мясо-пептонном бульоне при постоянной и возрастающей концентрации амикацина в присутствии S и j МИК доксорубицина. В этих экспериментах микробная нагрузка составляла 200 тыс. м. т. / мл по стандарту мутности ГИСК им. Т. А. Тарасевича. Всего было проведено 10 пассажей.

У исходных и пассажных вариантов определяли адгезивную активность по их способности адсорбироваться на поверхности эритроцитов человека O (I) группы, Rh (+) [1, 6]. Для этого свежие эритроциты дважды отмывали физиологическим раствором хлорида натрия при 300 об./мин в течение 15 минут. Из отмытых эритроцитов в физиологическом растворе готовили взвесь концентрацией 100 млн клеток / мл. Приготовленную эритроцитную взвесь по 0,1 мл добавляли к 1 мл суточной бульонной культуры изучаемых штаммов, содержащей 3×10^8 м. т. После инкубации смеси в термостате при $t\ 37^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут из нее готовили мазки способом «толстая капля», которые высушивали при $t\ 37^{\circ}\text{C}$, фиксировали в этаноле 15 минут, окрашивали водным фуксином в течение 5 минут и просматривали с использованием масляного иммерсионного объектива (Ч90) микроскопа «Биолам». В каждом мазке подсчитывали количество эритроцитов, участвовавших в адгезии, количество микроорганизмов, адсорбировавшихся на одном эритроците (оценивали по 5 эритроцитам в 5 полях зрения). Из полученных данных рассчитывали средний показатель адгезии (СПА).

Микроорганизмы при СПА 1,01-2,0 считали низкоадгезивными, 2,01-4,0 – среднеадгезивными, более 4,0 – высокоадгезивными. Статистическую обработку проводили согласно методике оценки существенности различий между найденными в опыте величинами [2].

Результаты. Все взятые в опыт штаммы *E. coli* по значению МИК были высоко чувствительны к амикацину. МИК для штамма *E. coli* ATCC 25922 составила 1,5 мкг/мл, для четырех клинических с лабораторным шифром № 23, № 607, № 733 и № 822 – 6, 2 мкг/мл.

В присутствии j МИК доксорубицина чувствительность к амикацину изменилась лишь у двух взятых в опыт клинических штаммов. Для штамма № 23 она повысилась в 2 раза (МИК 6,2 и 3,1 мкг/мл соответственно), а для штамма № 822 – в 8 раз (МИК 6,2 и 0,75 мкг/мл).

В присутствии S МИК доксорубицина изменения чувствительности отмечены у клинических штаммов *E. coli*. У штаммов № 23 и № 607 они были невелики (в 2 раза), а у штаммов № 733 и № 822 достаточно выражены (в 8-16 раз). Чувствительность стандартного штамма *E. coli* ATCC 25922 не изменялась в присутствии как j, так и S МИК доксорубицина (табл. 1).

Как указывалось выше, у исходных и пассажных вариантов изучавшихся штаммов определяли адгезивную активность. Полученные результаты приведены в табл. 2. Из нее видно, что согласно значениям СПА исходно высокой адгезивной активностью обладал штамм № 607 (СПА 5,0), остальные штаммы имели среднюю адгезивную активность (СПА штамма *E. coli* ATCC 25922 3,52, № 23 – 3,32, № 733 – 2,56, № 822 – 2,28). Контрольные варианты трех клинических штаммов существенно отличались от исходных по значению СПА: для штамма № 23 он снизился до 1,72, для штамма № 607 – до 3,52, для штамма № 822 – до 1,84, однако последнее снижение статистически недостоверно. Для штамма № 733 величина СПА повысилась до 3,48. Таким образом, пассажи штаммов *E. coli* на питательной среде ведут к изменению их адгезивной активности чаще в сторону снижения.

Это свидетельствует о нестабильности данного признака.

При пассажах с возрастающей концентрацией амикацина адгезивная активность по сравнению с контролем достоверно возросла у трех штаммов: *E. coli* ATCC 25922 (СПА 4,72), № 23 (СПА 4,16) и № 822 (СПА 3,16). Для двух штаммов – № 607 и № 733 указанный показатель остался без существенных изменений. Для упомянутых выше трех штаммов та же закономерность отмечена и при пассажах с постоянной концентрацией амикацина. У двух других штаммов отмеченные различия в величине СПА не достоверны.

Пассажи при возрастающей концентрации амикацина в присутствии S МИК доксорубицина у всех опытных штаммов не повлияли на адгезивную активность по сравнению с вариантами, пассированными в этих условиях без цитостатика. Имеющиеся различия несущественны. В то же время при пассажах с возрастающей концентрацией амикацина в присутствии j МИК доксорубицина по сравнению с вариантами, пассированными на среде только с амикацином, у двух штаммов – *E. coli* ATCC 25922 и № 607 величина СПА снизилась с 4,72 до 3,52 и с 3,96 до 2,48 соответственно.

При пассажах с постоянной концентрацией амикацина в присутствии S МИК доксорубицина величина СПА стандартного штамма *E. coli* ATCC 25922 снизилась с 5,52 до 4,44, а у штамма № 822 произошло ее повышение с 2,8 до 5,68. У трех штаммов № 23, № 607 и № 733 СПА существенно не изменился. Пассажи на средах с постоянной концентрацией амикацина в присутствии j МИК доксорубицина привели к повышению адгезивной активности штаммов № 23, № 607 и № 822 до значений СПА 4,12, 4,76 и 3,84 соответственно при величине этих показателей у вариантов, полученных при пассажах с постоянной концентрацией 3,04, 3,24 и 2,8 соответственно.

Таким образом, в этих экспериментах показана нестабильность признака адгезии у *E. coli*. Доксорубицин в дозах S и j МИК оказывает разнонаправленное действие на экспрессию генов, ответственных за этот признак.

Высокий уровень антимикробной активности амикацина (МИК от 1,5 до 6,2 мкг/мл) в отношении опытных штаммов *E. coli* был ожидаем. Именно этим обосновывается высокая эффективность применения новых аминогликозидов в лечении инфекций, вызванных грамотрицательной микрофлорой.

Отсутствие антимикробной активности доксорубицина в отношении опытных штаммов *E. coli* было несколько неожиданно. Очевидно, это обусловлено его плохим проникновением внутрь микробных клеток. Наличие большого количества липидов в клеточной стенке грамотрицательных бактерий способствует быстрому связыванию препарата ввиду его высокой биодоступности. Это ведет к его депонированию в периплазматическом пространстве микробной клетки без проникновения в достаточном количестве в цитоплазму. Однако нами установлен синергидный эффект сочетанного действия амикацина и доксорубицина во взятых концентрациях в отношении опытных штаммов *E. coli*, поэтому отмеченные изменения адгезивной активности штаммов *E. coli* в присутствии S и j МИК доксорубицина при пассажах как с возрастающей, так и с постоянной концентрациями антибиотика могут быть обусловлены проникновением части противоопухолевого препарата через клеточную стенку в микробную клетку вместе с амикацином, играющим роль «проводника». Итогом этого может быть ДНК-тропное действие доксорубицина, в том числе и на структуры, входящие в «острова патогенности», ответственные за синтез адгезинов, и, как следствие, изменение синтеза соответствующих белков. Отсутствие общих закономерностей влияния доксорубицина на этот процесс (усиление или ослабление адгезивной активности) обусловлено, очевидно, индивидуальными особенностями каждого опытного штамма и нестабильностью соответствующих генов. Это подтверждают и литературные данные о противоречивом влиянии ДНК-тропных соединений на генетический аппарат бактерий, в том числе и реализацию генетической информации патогенных локусов [3].

Выводы:

1. Доксорубицин обладает низкой антимикробной активностью в отношении *E. coli*.

2. Доксорубицин в субингибирующих концентрациях (S и j МИК) вызывает повышение чувствительности *E. coli* к амикацину. Это позволит умеренно снижать дозы антибиотика при лечении инфекций, вызванных данным видом микроорганизмов, у онкологических больных, получающих химиотерапию препаратами антрациклинового ряда.

3. Доксорубицин в субингибирующих концентрациях (S и j МИК) оказывает разнонаправленное влияние на адгезивные свойства *E. coli*. Это может способствовать формированию штаммов с измененной вирулентностью, что следует учитывать в клинической практике

Таблица 1

Сочетанное действие амикацина и доксорубицина на опытные штаммы *E. coli*

Штамм	МИК амикацина, мкг/мл	МИК амикацина (мкг/мл) в присутствии доксорубицина	
		½ МИК	¼ МИК
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,5	1,5	1,5
<i>E. coli</i> № 23	6,2	3,1	3,1
<i>E. coli</i> № 607	6,2	3,1	6,2
<i>E. coli</i> № 733	6,2	0,75	6,2
<i>E. coli</i> № 822	6,2	0,37	0,75

Значения СПА пассажных вариантов кишечных палочек

Условия пассажира	СПА после пассажиров				
	E. coli ATCC 25922	№ 23	№ 607	№ 733	№ 822
Исх	3,52	3,32	5,0	2,56	2,28
К	3,32	1,72 ^x	3,52 ^x	3,48 ^x	1,84
Амп	5,52 ^{xx}	3,04 ^{xx}	3,24	3,2	2,8 ^{xx}
Амв	4,72 ^{xx}	4,16 ^{xx}	3,96	3,36	3,16 ^{xx}
Амп+Д1/2	4,44	3,56	3,8	2,92	5,68 ^{xxx}
Амп+Д1/4	4,12 ^{xxx}	4,12 ^{xxx}	4,76 ^{xxx}	3,72	3,84 ^{xxx}
Амв+Д1/2	4,4	4,52	3,24	3,4	3,76
Амв+Д1/4	3,52 ^{xxx}	4,96	2,48 ^{xxx}	3,52	3,6
Д1/2	3,64	4,76 ^{xx}	4,28	2,92	2,56

Примечание. Амп – постоянная концентрация амикацина; Амв – возрастающая концентрация амикацина; Д1/2 – доксорубин в концентрации S МИК; Д1/4 – доксорубин в концентрации j. МИК, К – контроль (пересевы на среде без амикацина и доксорубина); ^x – различия контрольного и исходного варианта существенны, ^{xx} – различия группы и контроля существенны, ^{xxx} – различия группы и вариантов Амп и Амв существенны.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Адгезивные свойства лактобактерий и эшерихий в различных отделах желудочно-кишечного тракта человека в норме и патологии / Е.А.Богданова, Ю.В. Несвижский, А.А. Воробьев, М.В. Брюхова // Вестник РАМН. – 2006. – №1. – С. 35-38.
2. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.
3. Воропаева, С.Д. Изучение внехромосомных факторов лекарственной устойчивости у клинических штаммов стафилококков / С.Д. Воропаева // Антибиотики. – 1972. – № 2. – С. 128-132.
4. Зубков, М.Н. Неферментирующие бактерии: классификация, общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas* spp. и сходных микроорганизмов / М.Н. Зубков // Инфекции и антимикробная химиотерапия. – 2003. – №1. – С. 24-30.
5. Меропенем в лечении тяжелых инфекций у онкологических больных / Н.В. Дмитриева, И.Н. Петухова, Н.С. Багирова и др. // Сопроводительная терапия в онкологии. – 2005. – №4. – С. 8-13.
6. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилис, Т. А. Брилене, Х.П. Ленцнер, А.А. Ленцнер // Лабораторное дело. – 1986. – №4. – С.210-212.
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам // МУК 4.2.1890 – 04. М.: Изд. отдел Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ, 2004.– 91 с.
8. Сидоренко, С.В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом / С.В. Сидоренко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – №4. – С. 301-315.
9. Таксономическая структура возбудителей инфекции в онкологической клинике / Н. В. Дмитриева, А. З. Смоленская, И. Н. Петухова и др. // Современная онкология. – 2001. – №3. – С. 93-96.

