

УДК: 615.281

**ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕОЛІЗУ НА
ПІДВИЩЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ДО
АНТИБІОТИКІВ ШТАМІВ
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Гридіна¹ Т.Л., Федчук¹ А.С., Лозицький¹ В.П.,
Мудрик¹ Л.М., Шитикова¹ Л.І., Сочесло¹ Л.В.,
Волянський² А.Ю., Мироненко² Л.Г.,
Грузевський³ О.А., Кольцова³ І.Г.

¹ДУ «Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечникова» МОЗ України, Одеса, вул. Церковна, 2/4; тел.048-731-7883, e-mail: tatvanagridina@mail.ru

²ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова АМН України», Харків-61057, вул. Пушкінська, 14-16,

³Одеський Національний Медичний Університет, Одеса, пров.Валіховський, 2

На цей час в світі зростає кількість і набувають широкого розповсюдження антибіотикорезистентні штами мікроорганізмів. 11 вересня 2001 року ВООЗ була розроблена Глобальна стратегія щодо попередження формування резистентності до антибіотиків у мікроорганізмів [1]. Суттєве значення має проблема поширення інфекцій, викликаних штамами *Staphylococcus aureus*, стійкими до антибіотиків. Резистентність штамів поширюється не тільки на традиційні антибіотики, але й спостерігається набуття стійкості до нових груп антибіотиків. Пошук нових потенційних мішеней для протимікробних препаратів у збудника, виявлення нових сполук з протистафілококковою активністю є перспективним шляхом упередження формування резистентності [2]. Іншим шляхом підвищення чутливості збудника може бути комбіноване застосування антибіотиків з препаратами іншої природи.

Метою цього дослідження було вивчення застосування в комплексі з антибіотиками інгібіторів протеолізу для підвищення протимікробного ефекту.

Матеріали і методи

В роботі був використаний штам *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 з колекції Музею мікроорганізмів ДУ «Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечникова» МОЗ України (м.Одеса), який характеризується генетичною стабільністю та чутливістю до антибіотиків і використовується для контролю якості при визначенні чутливості мікроорганізмів до препаратів [3]. Крім того, були використані виділені від хворих штами *Staphylococcus aureus* 2781, *Staphylococcus aureus* Кунда з колекції Музею мікроорганізмів ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України" (м. Харків).

Відповідно до поставленої мети були використані інгібітори протеолізу Е-Амінокапронова кис-

лота (АКК) та Пара-амінобензойна кислота (Амбен). Для визначення антибіотикочутливості мікроорганізмів використали диско-дифузійний метод із застосуванням комерційних дисків з антибіотиками (Hi-Media, Індія) на середовищі Мюлера-Хінтона (Hi-Media, Індія) у модифікації Keurby-Bayer та метод серійних розведень у рідкому середовищі за існуючими нормативними документами [3, 4].

Для визначення сумісної дії антибіотиків та інгібіторів протеолізу диско-дифузійним методом в агар додавали амбен до концентрації 1% або АКК до концентрації 15,0%, 10,0% та 5,0%. У досліджах використані такі антибіотики: пеніцилін (6 мкг/мл), оксацилін (10 мкг/мл), канаміцин (30 мкг/мл), гентаміцин (10 мкг/мл), нетилміцин (30 мкг/мл), амікацин (30 мкг/мл), норфлуксацин (10 мкг/мл), офлуксацин (5 мкг/мл), ципрофлоксацин (5 мкг/мл), тетрациклін (30 мкг/мл), доксициклін (30 мкг/мл), кларитроміцин (15 мкг/мл), лінкоміцин (15 мкг/мл), рифампіцин (5 мкг/мл). Мікробні суспензії з визначеною концентрацією мікробних клітин готували з використанням приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія) за шкалою McFarland. Результати реєстрували після інкубації при 37°C на протязі 18-20 годин.

На рідкому середовищі визначення зміни чутливості досліджуваних штамів до антибіотиків в присутності інгібіторів протеолізу проводили методом серійних розведень у бульйоні Мюлера-Хінтона [5].

На першому етапі проведення досліджень визначали мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) антибіотику та інгібітору протеолізу окремо. На другому – визначали пригнічувальну дію антибіотику і інгібітору протеолізу у тих же концентраціях при їх сумісному використанні. Для цього готували розведення антибіотиків та інгібіторів протеолізу у бульйоні. До 1,0 мл кожного розведення антибіотику додавали 1,0 мл розведення інгібітору та 0,1 мл добової культури мікроорганізмів у концентрації 10⁹ мікробних клітин/мл. При проведенні досліджень ставили три контролю: антибіотику, інгібітору та дослідного штаму. Облік результатів проводили через 18-20 годин інкубації при 37°C за допомогою приладу Densi-La-Meter.

Досліди проводили у 3-5 повтореннях. Результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel 2007. Статистичну вірогідність впливу АКК на ріст досліджуваних штамів було проаналізовано за допомогою t-критерію Стьюдента [6].

Результати та обговорення

Отримані результати щодо впливу Амбену та АКК у різних концентраціях на чутливість досліджуваного штаму *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 до антибіотиків на твердому поживному середовищі наведені у Таблиці.

Виявлено, що додавання амінокапронової кислоти у кінцевій концентрації 5%, 10%, 15% до твердого поживного середовища при вирощуванні

S.aureus ATCC 25923 призводило до підвищення дії антибіотиків. Зона гальмування росту була більшою навколо дисків, що містили пеніцилін, оксацилін, офлоксацин, ципрофлоксацин, тетрациклін. Додавання Амбену до поживного середовища у кінцевій концентрації 1% при вирощуванні штаму *S.aureus* ATCC 25923 не призводило до посилення дії досліджуваних антибіотиків.

В результаті досліджень, проведених на рідкому поживному середовищі, було виявлено, що Амбен у концентраціях 1%, 0,5% та 0,25% не приг-

нічував росту *S.aureus* ATCC 25923. Тому його вплив на дію антибіотиків на ріст мікроорганізмів досліджували лише у концентрації 1%. Додавання амбену посилювало дію канаміцину (у кінцевій концентрації 0,5, 0,25, 0,125, 0,062 та 0,031 мкг/мл), пригнічуючи ріст *S. aureus* на рідкому середовищі. Дія пеніциліну, доксицикліну, стрептоміцину, гентаміцину, рифампіцину при додаванні до поживного середовища амбену була на рівні контролів відповідних антибіотиків.

Таблиця. Визначення впливу інгібіторів протеолізу на зміну чутливості до антибіотиків штаму *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 на твердому поживному середовищі

№	Антибіотики	Контроль без АКК (мм)	АКК (%)			Контроль без Амбену	1 % Амбен (мм)
			5	10	15		
1	Пеніцилін (6 мкг/мл)	28	32	32	32	40	40
2	Оксацилін (10 мкг/мл)	20	31	26	29	35	32
3	Канаміцин (30 мкг/мл)	26	24	21	23	22	19
4	Гентаміцин (10 мкг/мл)	23	22	21	22	24	26
5	Нетилміцин (30 мкг/мл)	28	24	24	23	28	28
6	Амікацин (30 мкг/мл)	24	23	22	22	26	18
7	Норфлоксацин (10 мкг/мл)	28	28	22	22	30	22
8	Офлоксацин (5 мкг/мл)	18	26	24	23	33	26
9	Ципрофлоксацин (5 мкг/мл)	20	22	22	19	30	28
10	Тетрациклін (30 мкг/мл)	25	27	27	27	34	30
11	Доксициклін (30 мкг/мл)	30	30	23	25	29	28
12	Кларитроміцин (15 мкг/мл)	31	25	23	25	24	22
13	Лінкоміцин (15 мкг/мл)	25	27	25	20	30	32
14	Рифампіцин (5 мкг/мл)	35	28	26	27	35	35

Амінокапронова кислота у кінцевій концентрації 15%, 10%, 7,5% повністю пригнічувала ріст *S.aureus* ATCC 25923 на рідкому поживному середовищі ($p < 0,5$). У кінцевій концентрації АКК 5% спостерігалось пригнічення росту в середньому на 1,0 одиницю оптичної щільності (ООЩ) за шкалою McFarland, а додавання до поживного середовища АКК у кінцевій концентрації 2,5%, 1,25%, 0,63% спричиняла зменшення росту мікроорганізмів в середньому на 1,0-0,3 ООЩ.

Амікацин у концентраціях 0,5 та 0,25 мкг/мл повністю запобігав росту штаму *S.aureus* ATCC 25923, а у концентрації 0,125 мкг/мл пригнічував ріст мікроорганізмів на 1,5 ООЩ ($p < 0,5$). При сумісному застосуванні амікацину у цих же концентраціях і АКК (у концентраціях 5%, 2,5%, 1,25%, 0,65%) спостерігалось більше пригнічення росту культури *S.aureus* ATCC 25923, ніж при окремому застосуванні кожного з препаратів, що свідчить про ефект потенціювання дії ($p < 0,5$). Штам *S.aureus* Кунда виділений від хворого і є мультирезистентним. Тому ефективні дози амікацину для цього штаму були вищими, ніж для штаму *S.aureus* ATCC 25923. В дозах 7,5 і 5 мкг/мл сам амікацин майже не пригнічував ріст штаму *S.aureus* Кунда. При спіль-

ном застосуванні 5% АКК з амікацином у концентрації 10 мкг/мл спостерігався ефект потенціювання ($p < 0,5$). Для штаму *S.aureus* 2781 діючі дози амікацину були нижчими, ніж для двох інших штамів. У дозі 0,2 мкг/мл амікацин майже повністю пригнічував ріст штаму *S.aureus* 2781, а у дозах 0,1 мкг/мл та 0,05 мкг/мл антибіотик пригнічував ріст мікроорганізмів на 1,4 та 0,9 ООЩ відповідно. АКК практично не підсилювала дію амікацину на ріст штаму *S.aureus* 2781.

Доксициклін у концентраціях 0,05 і 0,025 мкг/мл пригнічував ріст *S.aureus* ATCC 25923 в середньому на 1,1 та 0,9 ООЩ відповідно. У концентрації 0,0125 мкг/мл цей антибіотик не впливав на ріст досліджуваного штаму. При додаванні АКК (у концентраціях 5%, 2,5%, 1,25%) спостерігався ефект потенціювання. Навіть в концентрації 0,0125 мкг/мл доксициклін разом з АКК пригнічував ріст штаму *S.aureus* ATCC 25923 більше, ніж кожний з препаратів окремо. Для помірно стійкого до антибіотиків штаму *S.aureus* 2781 мінімальні ефективні дози доксицикліну були вищими. Антибіотик у дозі 0,05 мкг/мл пригнічував ріст цього штаму на 1,0 ООЩ, а додавання до середовища з антибіотиком у тій же концентрації 1,25% АКК призводило до повного пригнічення росту цього штаму ($p < 0,5$). Для штаму

S.aureus Кунда ефективні дози доксицикліну були значно вищими (5 і 10 мкг/мл). У цих концентраціях він гальмував ріст штаму відповідно на 0,9 та 1,6 ООЩ. При спільному застосуванні доксицикліну з АКК мало місце потенціювання ($p < 0,5$).

Діючі дози пеніциліну для чутливого до антибіотиків штаму *S.aureus* ATCC 25923 були 0,0125 та 0,0062 мкг/мл. В разі застосування 5% АКК з пеніциліном у концентрації 0,0125 мкг/мл спостерігалось посилення пригнічувальної дії антибіотику на ріст мікроорганізмів. Для штаму *S.aureus* 2781 діючі дози пеніциліну були дещо вищими - 0,01, 0,005 та 0,0025 мкг/мл. В разі застосування 5% АКК з пеніциліном у кінцевій дозі 0,005 мкг/мл спостерігалось посилення пригнічувальної дії антибіотику. Для штаму *S.aureus* Кунда діючі дози пеніциліну були ще вищими - 10 та 5 мкг/мл. В разі застосування 5% АКК з пеніциліном у концентрації 5 мкг/мл реєструвався ефект потенціювання.

Лінкоміцин у концентраціях 0,25, 0,125, 0,63 мкг/мл пригнічував ріст штаму *S.aureus* ATCC 25923 в середньому на 2,1, 1,7 та 1,4 ООЩ відповідно. Цей антибіотик у концентрації 0,038 мкг/мл пригнічував ріст і помірно стійкого до антибіотиків штаму *S.aureus* 2781 ($p < 0,5$). Ця концентрація була в 2 рази нижчою, ніж у чутливого штаму *S.aureus* ATCC 25923 ($p < 0,5$). Але в обох випадках додавання до підтримуючого середовища АКК у концентрації 1,25% призводило до посилення феномену пригнічення росту мікроорганізмів. Спостерігався ефект потенціювання. Такий же ефект потенціювання дії лінкоміцину та АКК реєструвався і у випадку з мультирезистентним штамом *S.aureus* Кунда ($p < 0,5$). Але при цьому концентрації препаратів були значно вищими: концентрація АКК складала 5%, а лінкоміцину - 1500 мкг/мл.

Дія гентаміцину була аналогічною до дії лінкоміцину та амікацину. Гентаміцин пригнічував ріст чутливого до антибіотиків штаму *S.aureus* ATCC 25923 у концентраціях 0,02, 0,01, 0,005 мкг/мл в середньому на 1,5, 1,1 та 0,5 ООЩ відповідно. При сумісному застосуванні антибіотику з 5% АКК спостерігалось посилення його дії. Ріст культури пригнічувався у середньому на 0,5 ООЩ більше ніж у контролі антибіотика. Гентаміцин пригнічував ріст і помірно стійкого до антибіотиків штаму *S.aureus* 2781 у кінцевій концентрації 0,001 мкг/мл. Додавання до підтримуючого середовища амінокапронової кислоти у кінцевій концентрації 1,25% призводило до посилення пригнічення росту обох штамів мікроорганізмів ($p < 0,5$). Слід зазначити, що в разі мультирезистентного штаму *S.aureus* Кунда спостерігалось посилення пригнічувальної дії гентаміцину (25 мкг/мл) на ріст мікроорганізмів при додаванні 5% АКК. Сумісна дія препаратів була сильнішою, ніж дія кожного з них окремо.

При додаванні 5% АКК до поживного середовища стрептоміцин у кінцевих концентраціях 0,125 та 0,062 мкг/мл пригнічував ріст *S.aureus* ATCC 25923 на 0,6 ООЩ більше. Спостерігався

ефект потенціювання дії препаратів. Діюча доза антибіотику значною мірою залежала від антибіотикочутливості штаму. Окремо стрептоміцин у кінцевій концентрації 100 мкг/мл вже не пригнічував ріст мультирезистентного штаму *S.aureus* Кунда. Однак, при додаванні 5% АКК ця доза антибіотику призводила до гальмування росту мікроорганізмів і також спостерігався ефект потенціювання. При дослідженні впливу стрептоміцину та АКК на ріст помірно резистентного штаму *S.aureus* 2781 ефект потенціювання зберігався. Але дія реєструвалась у нижчих концентраціях, ніж штаму *S.aureus* Кунда.

Дози рифампіцину також залежали від антибіотикочутливості штамів. Для чутливого штаму *S.aureus* ATCC 25923 мінімальна ефективна доза була 0,0005 мкг/мл. При спільному застосуванні 5% АКК з рифампіцином у кінцевій концентрації 0,002, 0,001 та 0,0005 мкг/мл спостерігався ефект потенціювання пригнічення росту мікроорганізмів. У дозі 0,005 мкг/мл рифампіцин пригнічував ріст помірно стійкого до антибіотиків штаму *S.aureus* 2781 на 0,4 ООЩ. Додавання до середовища з антибіотиком у тій же концентрації 1,25% АКК призводило до посилення пригнічення росту цього штаму на 0,9 ООЩ. При цьому також спостерігався ефект потенціювання дії препаратів. Для мультирезистентного штаму *S.aureus* Кунда мінімальна ефективна доза антибіотику була значно вищою. Рифампіцин у дозі 5 мкг/мл пригнічував ріст стійкого до антибіотиків штаму на тільки 0,3 ООЩ. Додавання до середовища з антибіотиком у тій же концентрації 5% АКК призводило до посилення пригнічувальної дії антибіотику (0,5 ООЩ).

Такий же феномен спостерігався і в разі спільного використання АКК з нітроміцином. Антибіотик застосовували у концентрації 0,025, 0,0125 та 0,0062 мкг/мл. Сумісне застосування препаратів пригнічувало ріст *S.aureus* ATCC 25923 на 0,5 ООЩ більше, ніж кожний з них окремо. Для помірно резистентного штаму *S.aureus* 2781 ефективні дози нітроміцину були дещо вищими 0,04, 0,02 та 0,01 мкг/мл. В разі спільного застосування АКК з антибіотиком спостерігався ефект потенціювання.

Канаміцин у концентрації 0,12, 0,06 та 0,03 мкг/мл спричиняв пригнічувальну дію на ріст штаму *S.aureus* ATCC 25923. Додавання 5% АКК призводило до підвищення дії антибіотику. В цьому випадку ріст мікроорганізмів пригнічувався на 0,3 ООЩ більше, ніж окремо антибіотиком. Для помірно резистентного штаму *S.aureus* 2781 дози канаміцину були дещо вищими - 0,4, 0,2 та 0,1 мкг/мл. В разі спільного застосування 1,25% АКК з антибіотиком у концентрації 0,2 мкг/мл також мав місце ефект потенціювання.

Таким чином, АКК підсилювала протимікробну дію гентаміцину, доксицикліну, пеніциліну, лінкоміцину, стрептоміцину, рифампіцину у відношенні досліджуваних штамів *S. aureus* незалежно від рівня їх чутливості/резистентності до антибіотиків.

Висновки

При сумісному використанні досліджених антибіотиків з Е-амінокапроновою кислотою спостерігається підсилення протимікробної дії відносно штамів *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* 2781, *S.aureus* Кунда. Посилення дії антибіотиків має місце незалежно від рівня їх чутливості/резистентності до антибіотиків. Спектр антибіотиків, активність яких посилює додавання Амбену, значно менший, ніж у випадку з АКК.

References

1. World Health Organization. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial resistance. Geneva, 2001. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.
2. Kutcyk RV Microbiological study new approaches to the treatment and prevention of staphylococcal infections based on a study of antimicrobial properties of thiazole derivatives, furan, acridine and biologically active substances of natural origin: Avtoref.dys ... Dr. of Medical Science: 03.00.07 / state enterprise "Inst. mikrobiol. and imunol. im.I.I.Mechniykova Sciences of Ukraine." - Kharkov, 2008. - 40.
3. Order № 167 On approval of guidance "given the sensitivity of microorganisms to antibiotics" MOH of Ukraine of 05.04.2007.
4. Studying the specific activity of antimicrobial drugs / [Volyanskiy YL, Shirobokov VP, Biryukov SV and others.] // Guidelines. - Kyiv. - 2004. - 38С.
5. Thornsberry, C. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci / C. Thornsberry, L.K.McDougal // J.Clin.Microbiol. - 1983. - Vol.18, №5. - P.1084-1091.
6. 1. Urbach VY Statistical analysis in biological and medical research / V.Yu.Urbah. - M.: Medicine, 1975. - 295p.

УДК: 615.281

ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕОЛІЗУ НА ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Гридіна¹ Т.Л., Федчук¹ А.С., Лозицький¹ В.П., Мудрик¹ Л.М., Шитикова¹ Л.І., Сочесло¹ Л.В., Волянський² А.Ю., Мироненко² Л.Г., Грузевський³ О.А., Кольцова³ І.Г.

Додавання до поживного середовища інгібіторів протеолізу призводило до зміни чутливості до антибіотиків досліджуваних штамів *S. aureus*. Амбен посилював пригнічувальну дію деяких антибіотиків незначною мірою. Спільне застосування антибіотиків і Е-амінокапронової кислоти посилювало гальмування росту усіх досліджуваних штамів *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 2781, *S. aureus* Кунда незалежно від рівня чутливості/резистентності їх до антибіотиків.

Ключові слова: антимікробна дія, антибіотики, інгібітори протеолізу

УДК: 615.281

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕОЛИЗА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Гридина¹ Т.Л., Федчук¹ А.С., Лозицкий¹ В.П., Мудрик¹ Л.М., Шитикова¹ Л.И., Сочесло¹ Л.В., Волянский² А.Ю., Мироненко² Л.Г., Грузевский³ О.А., Кольцова³ И.Г.

Добавление в питательную среду ингибиторов протеолиза изменяло чувствительность к антибиотикам изучаемых штаммов *S. aureus*. Амбен незначительно усиливал ингибирующее действие некоторых антибиотиков на рост микроорганизмов. Совместное применение антибиотиков и Е-аминокапроновой кислоты усиливало торможение роста всех исследованных штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 2781, *S. aureus* Кунда не зависимо от уровня их чувствительности/резистентности к антибиотикам.

Ключевые слова: антимикробное действие, антибиотиков, ингибиторы протеолиза

UDC: 615.281

INFLUENCE OF PROTEOLYSIS INHIBITORS ON SENSITIVITY STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TO ANTIBIOTICS

Grydina T.L., Fedchuk A.S., Lozitsky V.P., Mudrik L.M., Shytikova L.I., Socheslo L.V., Volyansky A.Yu., Myronenko L.G., Gruzevskij O.A., Koltsova I.G.

Addition the proteolysis inhibitors to the nutritive medium has increased the inhibition acting some antibiotics towards the growth of strains *S. aureus*. The number of antibiotics, which activity was enhanced as a result of Ambenum addition, was significantly smaller than those influenced by aminocaproic acid addition. The aminocaproic acid addition has increased the hindrance activity of antibiotics acting towards the growth of all studied strains of *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 2781, *S. aureus* Кунда. The increase of antibiotics activity was registered independently on the level of the strains' sensitivity / resistance to the antibiotics

Key words: antimicrobial action, antibiotics, proteolysis inhibitors