

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ НОВОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ВОСУРЕЛЬ

Л.В. Авдєєва¹, В.М. Шумейко², Л.С. Бобкова²

¹Інститут епідеміології та інфекційних хвороб, Київ

²Інститут фармакології і токсикології, Київ

Резюме. Визначено активність нового лікарського засобу восурель по відношенню до музейних штамів грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, а також клінічних ізолятів із множинною стійкістю до антибіотиків, який не змінює своєї активності протягом тривалого пасування штамів *in vitro*. Представлені дані є передумовою для розгляду восурелю як потенційного лікарського засобу з широким спектром антимікробної активності.

Ключові слова: восурель, антимікробна активність, мікроорганізми.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ЛЕЧЕБНОГО СРЕДСТВА ВОСУРЕЛЬ

Л.В. Авдеева, В.М. Шумейко, Л.С. Бобкова

Резюме. Определена активность нового лечебного средства восурель в отношении музейных штаммов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а также клинических изолятов с множественной устойчивостью к антибиотикам, который сохраняет свою активность на протяжении длительного пассирования штаммов *in vitro*. Представленные данные являются предпосылкой для рассмотрения восуреля как потенциального лекарственного средства с широким спектром антимикробной активности.

Ключевые слова: восурель, антимикробная активность, микроорганизмы.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE NEW DRUG VOSUREL

L.V. Avdeeva, V.M. Shumeiko, L.S. Bobkova

Summary. It was specified activity of the new drug Vosurel in addition to gram-positive and gram-negative museum specimens, just as clinical specimens with polyresistance to antibacterial drugs. Vosurel have keep own activity during long passage specimens *in vitro*. Represented data is prerequisite for examination of Vosurel as a potential antibacterial drug with wide range of antimicrobial activity.

Key words: vosurel, antimicrobial activity, pathogens.

Адреса для листування:

Авдєєва Лілія Василівна,

03038, Київ, узвіз Протасів Яр, 4

Інститут епідеміології та інфекційних хвороб

ім. Л.В. Громашевського АМН Укаїни

ВСТУП

Протягом останніх років у всьому світі відзначається збільшення кількості збудників опортуністичних, у тому числі внутрішньолікарняних, інфекцій, резистентних до антимікробних препаратів (АМП). Розвиток резистентності є природною біологічною відповіддю мікроорганізмів на застосування АМП, які створюють селективний тиск, сприяють відбору, виживанню та розмноженню їх резистентних штамів [1, 2].

Висока стійкість, а також полірезистентність збудників інфекційних хвороб людини спонукають дослідників усіх країн до пошуку нових ефективних АМП із широким спектром активності.

Сучасні підходи до пошуку біологічно активних речовин, в тому числі лікарських засобів (ЛЗ), ефективних по відношенню до клінічних ізолятів грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів, включають:

1. Систематичний скринінг сполук різних хімічних класів з послідовним вивченням спектра біологічної дії значної кількості гомологів кожного ряду.

2. Модифікацію структури активної речовини відомого ЛЗ з метою підсилення певного фармакологічного ефекту, розширення спектра фармакологічної дії чи усунення негативних проявів.
3. Конструювання нової структури ЛЗ з кількома вичленими фармакоформними групами чи дескрипторними фрагментами.
4. Використання електронних або топологічних портретів найбільш ефективних складових ЛЗ.
5. Поглиблене вивчення механізмів біологічної дії ЛЗ для створення ЛЗ нових поколінь.
6. Дослідження математичної залежності «структура—активність» подібних ЛЗ.
7. Дескрипторний аналіз — на основі бази даних «структура—активність» вичленити фрагменти, що за статистичними показниками можуть відповідати за очікувану фармакологічну дію чи певний механізм біологічної дії.
8. Створення комбінованих препаратів з кількома активними інгредієнтами, які проявляють адитивність чи потенціюють фармакологічну дію.

9. Поєднання кількох підходів, наприклад, дескрипторного аналізу з модифікацією відомих структур.

До традиційних підходів пошуку нових ЛЗ належить систематичний скринінг, який у поєднанні з випадковою вдачею та інтуїцією авторів сприяє вирішенню поставленого завдання. Але, за даними статистики, позитивний результат цього методу складає, як правило, одну перспективну сполуку серед 6000–12 000 досліджених.

Цілеспрямований пошук сполук з передбачуваним спектром фармакологічної дії на підставі співвідношення «структура–активність» значно зменшує кількість досліджень. В сучасний період широко застосовують метод, який ґрунтується на створенні комбінацій сполук, активні складові яких потенціюють біологічну дію одне одного.

Мета роботи — вивчити антимікробну активність нового комплексного ЛЗ восурель.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Новий ЛЗ восурель розроблено в Інституті фармакології і токсикології АМН України (відділ фізіологічно активних речовин). За результатами квантово-хімічного та дескрипторного аналізу для створення нового ЛЗ були відібрані кремній-вмісна сполука під умовною назвою «водозоль», яка була найбільш активною по відношенню до музейних штамів мікроорганізмів. Для підсилення властивостей водозолу, зокрема протизапальних та імуномодулювальних, до складу ЛЗ були включені сполука Ф-555 (СПИС), яка виявляє протипухлинну, інтерферогенну, протівірусну дію та характеризується низькою токсичністю, а також сполука Та-8, яка, за нашими попередніми даними, у концентрації 1,25 мкг/мл пригнічує ріст штаму *S. aureus* ATCC 25923 і в концентрації 50 мкг/мл — ріст штаму *E. coli* ATCC 25922 [3].

Антимікробну активність нового ЛЗ восурель вивчали методом двократних серійних розведень в рідкому поживному середовищі, яке є оптимальним для росту тест-мікроорганізмів [4]. У кожному пробірці ряду вносили суспензію тест-мікроорганізмів з розрахунку 10^5 КУО в 1 мл розведення засобу. Результати враховували візуально через 20–24 год культивування за температури 37 °С за наявності видимого росту бактерій і через 48 год — грибів. Концентрацію засобу в останній пробірці ряду без видимого росту вважали за мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК). Контролем слугували пробірки з різними концентраціями препарату, але без культури, а також пробірки з відповідним поживним середовищем без сполуки, але з культурою тест-мікроорганізму. Крім МІК ЛЗ, визначали його МБК шляхом посіву 0,1 мл з пробірок без видимого росту мікроорганізмів на відповідні поживні середовища із подальшим підрахунком колоній, які виростили на поверхні середовища після інкубації в термостаті. За МБК приймали розведення восурелю, що пригнічувало ріст 99,9% мікробних клітин.

МІК та МБК ЛЗ визначали по відношенню до музейних культур *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* 663/885 і *Candida utilis* ЛИА-01, а також 34 клінічних ізолятів, серед яких 9 належали до *Staphylococcus spp.*, 7 — до *K. pneumoniae*, 9 — до *Enterobacter spp.*, 9 — до *Enterococcus spp.*

Для порівняльної характеристики активності восурелю і досліджуваних антибіотиків досліди проводили за допомогою методу лунок із врахуванням діаметрів затримки росту досліджених штамів навколо дисків з антибіотиками і лунок, в які вносили різні розведення восурелю [4].

Визначення швидкості та ступеня підвищення стійкості клінічних ізолятів *in vitro* проводили за допомогою ступеневої селекції штамів у рідкому поживному середовищі з додаванням ЛЗ восурель в концентраціях, які підвищували паралельно із збільшенням значень МІК після кожного пасажу. В кожному пробірці ряду вносили мікробну завись із розрахунку 10^5 КУО в 1 мл середовища із ЛЗ. Пасажі культур здійснювали щоденно з першої пробірки ряду з видимим ростом мікроорганізмів, у тому числі в пробірці з концентрацією препарату, які в 2–4 разів перевищували МІК. Через кожні 5 пасажів проводили контроль чистоти досліджуваного штаму мікроорганізмів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті вивчення антимікробної активності ЛЗ восурель встановлено, що засіб пригнічував ріст усіх без винятку музейних штамів мікроорганізмів — *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 і *E. faecalis* ATCC 29212 в розведенні 1:6, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* 663/885 і *C. utilis* ЛИА-01 — в розведенні 1:10. Причому МБК ЛЗ не відрізнялася за показниками від МІК, що свідчить про бактерицидний тип дії восурелю.

При визначенні антимікробної активності за методом лунок було встановлено, що діаметри затримки росту тест-мікроорганізмів навколо лунок, в які вносили різні розведення восурелю, коливалися залежно від концентрації сполуки і тест-мікроорганізму. Слід відзначити, що досліди з визначення діаметрів затримки росту тест-мікроорганізмів залежно від концентрацій восурелю проводили 5-кратно з подальшим розрахунком середньої арифметичної показників. Результати досліджень представлені в табл. 1, з даних якої видно, що найбільший діаметр затримки росту всіх без винятку тест-мікроорганізмів спостерігали при внесенні у лунки нативного або розведеного вдвічі ЛЗ. При розведенні 1:6, яке пригнічувало ріст тест-мікроорганізмів *E. coli*, *P. aeruginosa* і *E. faecalis* в попередніх дослідах, діаметр затримки росту навколо лунок з відповідним вмістом восурелю складав 23, 24 і 22 мм відповідно, а при розведенні 1:10, яке відповідало МІК восурелю для *S. aureus*, *C. albicans* і *C. utilis* — 16, 22 і 25 мм відповідно. Отримані результати

Таблиця 1
Активність восурелю по відношенню до тест-мікроорганізмів (діаметр затримки росту, мм)

Тест-мікроорганізм	Розведення восурелю					
	0	1:2	1:6	1:10	1:16	1:32
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35	28	23	18	16	12
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	38	30	26	16	10	8
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	35	28	22	18	11	6
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	36	30	24	16	13	10
<i>C. albicans</i> 663/885	41	40	38	22	20	18
<i>C. utilis</i> ЛИА-01	50	46	40	25	22	18

дають підстави припустити, що вказані вище діаметри затримки росту музейних штамів мікроорганізмів можна розцінювати як діаметри, що відповідають чутливим до восурелю штамам.

Такі самі діаметри затримки росту навколо лунок з відповідними розведеннями восурелю реєстрували і по відношенню до клінічних ізолятів актуальних видів збудників гнійно-запальних інфекцій, які мають множинну стійкість до антибіотиків. Так, із 10 штамів *Staphylococcus spp.*, стійких до оксациліну, що опосередковано свідчить про стійкість до метициліну, який вважається міткою госпітальних штамів стафілококів, жоден не виявився стійким до восурелю в розведенні 1:10 (табл.2).

Крім стафілококів, одними з домінуючих колонізуючих агентів, а також потенційних збудників тяжких інфекцій є *Enterococcus spp.* Як свідчать наші попередні дані [5], клінічні ізоляти ентерококів мають високий рівень та множинний характер стійкості до антибіотиків. Однак відібрані для досліджень штами виявилися чутливими до восурелю (табл. 3). Діаметри затримки росту усіх без винятку клінічних ізолятів навколо лунок з во-

сурелем, розведеним у 6 разів, дорівнювали таким щодо музейного штаму, що свідчить про високу чутливість ентерококів до восурелю і відсутність стійких до нього варіантів навіть серед штамів із множинною стійкістю до антибіотиків.

Також відзначено значну чутливість до восурелю клінічних ізолятів актуальних видів грамнегативних ентеробактерій, а саме *Enterobacter spp.* і *K. pneumoniae*, в тому числі їх варіантів з множинною стійкістю до антибіотиків (табл. 4, 5).

Затримка росту вищезазначених видів мікроорганізмів діаметром 22 мм і більше навколо лунок з розведенням восурелю 1:6 вказує на те, що у них відсутня природна стійкість до восурелю, а концентрація ЛЗ, яка утворюється у разі його розведення в 6 разів, притаманна чутливим штамам грамнегативних умовно-патогенних ентеробактерій.

Важливою характеристикою препарату з антимікробною активністю є швидкість підвищення стійкості до нього у клінічних ізолятів мікроорганізмів. Тому було проведено пасування *in vitro* по 5 штамів різних представників умовно-патогенних бактерій в наростаючих концентраціях восурелю. Встановлено, що його МІК відносно досліджених ізолятів як грамположитивних, так і грамнегативних бактерій не змінювалася протягом 25–30 пасажів (табл.6).

Отже, восурель виявляє високу антимікробну активність, навіть по відношенню до клінічних ізолятів умовно-патогенних мікроорганізмів, зокрема *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.* і *Staphylococcus spp.* з множинною стійкістю до сучасних антибіотиків. Крім того, восурель є засобом, який не змінює своєї активності протягом тривалого пасування штамів *in vitro*. Представлені дані є передумовою для розгляду восурелю як потенційного ЛЗ з широким спектром антимікробної активності. Крім того, розроблення на основі восурелю нового препарату, а також його

Таблиця 2
Чутливість клінічних ізолятів *Staphylococcus spp.* до восурелю в порівнянні з антибіотиками (діаметр затримки росту, мм)

Препарат	Номер штаму <i>Staphylococcus spp.</i>								
	58	61	62	63	64/1	80/1	81/1	89	90
Восурель	35	38	35	33	37	38	38	40	36
Восурель 1:10	16	17	16	16	18	18	18	18	17
Пеніцилін	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Оксацилін	6	6	10	11	12	6	6	6	6
Ампіцилін	6	6	8	11	6	6	6	6	6
Гентаміцин	20	6	23	21	6	6	6	6	6
Хлорамфенікол	19	6	18	13	6	15	22	16	6
Тетрациклін	13	6	16	15	11	13	18	12	6
Ципрофлоксацин	6	6	6	6	17	6	6	6	6

Таблиця 3
Чутливість клінічних ізолятів *Enterococcus spp.* до восурелю в порівнянні з антибіотиками (діаметр затримки росту, мм)

Препарат	Номер штаму <i>Enterococcus spp.</i>								
	29/2	13/2	32/2	20	28	29/1	33	31/2	8/2
Восурель	36	38	37	36	37	38	38	35	36
Восурель 1:6	22	22	22	23	23	22	23	22	23
Пеніцилін	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Ампіцилін	6	6	6	6	6	20	6	6	6
Нітрофурантоїн	6	6	19	17	18	18	17	16	15
Хлорамфенікол	6	6	14	22	6	23	12	26	6
Тетрациклін	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Ципрофлоксацин	6	6	6	6	6	16	16	6	6

Чутливість клінічних ізолятів *Enterobacter spp.* до восурелю в порівнянні з антибіотиками (діаметр затримки росту, мм)

Препарат	Номер штаму <i>Enterobacter spp.</i>								
	90/1	90/2	98	59	67	81/1	7/1	2/3	1440
Восурель	28	29	29	27	28	28	28	28	29
Восурель 1:6	22	22	24	23	22	23	23	24	23
Ампіцилін	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Гентаміцин	6	12	12	6	6	6	6	11	13
Нетилміцин	6	12	12	6	6	6	6	6	8
Амікацин	22	10	20	6	12	6	6	6	15
Хлорамфенікол	12	6	6	6	6	6	6	16	15
Тетрациклін	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Ципрофлоксацин	21	6	24	6	25	6	6	17	16
Цефазолін	6	6	13	6	6	6	6	6	13
Цефотаксим	6	6	15	6	12	6	6	6	17
Цефтазидим	6	6	17	6	14	6	6	6	20
Цефтриаксон	6	6	16	6	15	6	6	6	19

Таблиця 5

Чутливість клінічних ізолятів *K. pneumoniae* до восурелю в порівнянні з антибіотиками (діаметр затримки росту, мм)

Препарат	Номер штаму <i>K. pneumoniae</i>						
	148	158/1	137/1	141	150/1	146/2	137
Восурель	29	28	29	29	28	30	28
Восурель 1:6	23	22	23	23	22	25	23
Ампіцилін	6	6	6	6	6	6	6
Гентаміцин	6	6	6	6	6	6	6
Нетилміцин	6	6	13	6	6	21	6
Амікацин	6	6	14	21	6	6	6
Хлорамфенікол	13	10	6	6	6	6	15
Тетрациклін	6	6	6	6	6	6	6
Ципрофлоксацин	25	31	21	30	6	29	21
Цефазолін	6	6	14	6	6	6	6
Цефотаксим	11	16	9	12	6	16	6
Цефтазидим	12	23	6	24	11	28	6
Цефтриаксон	6	27	6	11	6	21	6

Таблиця 6

МІК восурелю залежно від кількості пасажів клінічних штамів мікроорганізмів (кратність розведення)

Мікроорганізм	Кількість пасажів						
	1	5	10	15	20	25	30
<i>E. faecalis</i>	1:6	1:6	1:6	1:6	1:6	1:6	1:4
<i>Staphylococcus spp.</i>	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
<i>Enterobacter spp.</i>	1:6	1:6	1:6	1:6	1:6	1:10	1:10
<i>K. pneumoniae</i>	1:6	1:6	1:6	1:6	1:6	1:10	1:10

різних лікарських форм можуть стати підґрунтям до подальших поглиблених досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н.* (2002) Практическое руководство по антиинфекционной терапии. Москва, Боргес, 379 с.
2. *O'Brien T.F.* (1997) The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin. Infect. Diseases*, 24(Suppl. 1): 2–8.
3. *Авдеева Л.В., Овруцький В.М., Шумейко В.М. та співавт.* (2000) Скринінг антимікробної активності нових хімічних сполук. *Актуальные проблемы медицины и биологии*, 2: 298–302.
4. *Навашин С.М., Фомина И.П.* (1982) Рациональная антибиотикотерапия. Москва, Медицина, 495 с.
5. *Авдеева Л.В., Поліщук О.І., Макушенко О.С., Каніболюцька М.Б.* (2001) Антибіотикорезистентність штамів ентерококів, виділених від новонароджених з перинатальною патологією. *Укр. хіміотерапевт. журн.*, 3: 37–41.