

**О.Ю. Зінченко, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін,
С.В. Водзінський, Ю.В. Ішков**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 68 79 64, e-mail: farmikr@mail.ru

ВПЛИВ СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ НА ЧУТЛИВІСТЬ УМОВНО-ПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ

*Досліджено вплив синтетичних порфіринів на чутливість *S. aureus* і *E. coli* до еритроміцину та тетрацикліну. Показано, що сумісне додавання вказаних сполук до поживного середовища призводить до значного зниження мінімальних інгібувальних концентрацій як антибіотиків, так і порфіринів. Характер взаємодії досліджуваних речовин для більшості комбінацій визначено як синергізм.*

К л ю ч о в і с л о в а: антибіотики, синтетичні порфірини, комбіноване застосування, синергізм.

Етіологічна структура інфекційних захворювань людини на сьогоднішній день характеризується залученням до патогенетичного процесу все більшої кількості мікроорганізмів, роль яких у виникненні інфекцій донедавна вважалася незначною. Становище ускладнюється відсутністю засобів специфічної терапії та множинною стійкістю збудників до відомих препаратів. Сучасні принципи боротьби з мікробною резистентністю базуються на декількох можливих підходах, серед яких велика надія покладається на комбіноване застосування препаратів [1, 10].

Протягом двох останніх десятиріч увагу дослідників привертають унікальні властивості синтетичних порфіринів, ефективність яких у лікуванні онкологічних захворювань та локалізованих інфекцій не викликає сумніву [8, 11]. У зарубіжній літературі зустрічаються повідомлення про здатність сполук даного класу змінювати проникність поверхневих структур бактерій для хімічних речовин, в тому числі, антибіотиків [9]. Це слугує підставою для вивчення у даній роботі впливу сумісного застосування антибіотиків та синтетичних порфіринів на ріст умовно-патогенних мікроорганізмів.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на культурах *S. aureus* ОНУ 223 та *E. coli* ОНУ 206, отриманих з музею культур кафедри мікробіології і вірусології ОНУ імені І.І. Мечникова. Вибір тест-штамів був обумовлений необхідністю оцінити особливості впливу порфіринів на чутливість до антибіотиків грампозитивних та грамнегативних бактерій.

У роботі використовували 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфіри-нато тритозилат (сполука I) та його цинковий комплекс (сполука II), синтезовані співробітниками Лабораторії синтезу лікарських засобів ОНУ імені І.І. Мечникова.



Вивчали вплив зазначених сполук на чутливість тест-штамів до еритроміцину та тетрацикліну для порівняння ефекту при застосуванні відповідно гідрофобних та гідрофільних антибактеріальних засобів.

На першому етапі визначали мінімальні інгібувальні концентрації (МІК) антибіотиків та порфіринів. Середовище Гісса з глюкозою розливали у пробірки по 1 мл та стерилізували в автоклаві при 0,5 атм. Готували дворазові розведення антибіотиків та порфіринів і стерильно додавали у пробірки з середовищем. Культури тест-мікроорганізмів, вирощені на скошеному МПА в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином. Отриману суспензію розводили до концентрації $2 \cdot 10^4$ кл/мл, відбирали по 50 мкл та вносили до кожної пробірки. Таким чином, кінцева кількість клітин у 1 мл середовища дорівнювала $1 \cdot 10^3$. Пробірки з мікроорганізмами витримували у термостаті при 37 °С протягом доби, після чого візуально визначали наявність росту за зміною кольору індикатора Андреде [4].

Для оцінки сумісної дії антибіотиків та порфіринів тест-мікроорганізми вирощували у середовищі Гісса з індикатором Андреде, до якого одночасно додавали антибіотики та порфірини у концентраціях, менших за МІК. Визначення характеру сумісної дії антибіотиків та порфіринів здійснювали шляхом обчислення фракційної інгібувальної концентрації (ФІК) за наступною формулою [6]:

$$\text{ФІК} = \text{МІК A у присутності B} / \text{МІК A} + \text{МІК B у присутності A} / \text{МІК B},$$

де А – антибіотик, В – порфірин.

При $\text{ФІК} \leq 0,5$ взаємодію досліджуваних сполук оцінювали як синергізм, $0,5 < \text{ФІК} < 2,0$ – як адитивний ефект, $\text{ФІК} \geq 2,0$ – антагонізм [6].

Кількість паралелей у кожному експерименті дорівнювала 5. Експеримент повторювали тричі.

Результати та їх обговорення

Результати визначення МІК препаратів наведені у таблиці 1. Отже, МІК еритроміцину та тетрацикліну для стафілокока дорівнювали відповідно 60 мкг/мл та 240 мкг/мл. Для кишкової палички МІК еритроміцину – 120 мкг/мл, тетрацикліну – 240 мкг/мл. МІК порфіринів для *S. aureus* 10 та 9 мкг для сполук I і II, відповідно, для *E. coli* 22 і 16 мкг, відповідно.

Таблиця 1

МІК еритроміцину та тетрацикліну для *S. aureus* ОНУ 223 та *E. coli* ОНУ 206

Table 1

MICs of erythromycin and tetracycline for *S. aureus* ONU 223 and *E. coli* ONU 206

Препарат	МІК досліджуваних сполук, мкг/мл	
	<i>S. aureus</i> ОНУ 223	<i>E. coli</i> ОНУ 206
Еритроміцин	60	120
Тетрациклін	240	240
Сполука I	10	22
Сполука II	9	16

При одночасному додаванні до поживного середовища антибіотиків та порфіринів спостерігали значне зниження МІК як тих, так і інших.



Так, МІК еритроміцину для *S. aureus* ОНУ 223 знижувалася до 3,75 мкг/мл, тобто, у 16 разів, МІК тетрацикліну — у 8 разів (рис. 1, а), при цьому МІК порфіринів, в свою чергу, зменшувалася у 1,5–15 разів (рис. 2).

МІК еритроміцину для *E. coli* ОНУ 206 за присутності синтетичних порфіринів також зменшувалася у 16 разів (рис. 1, б).

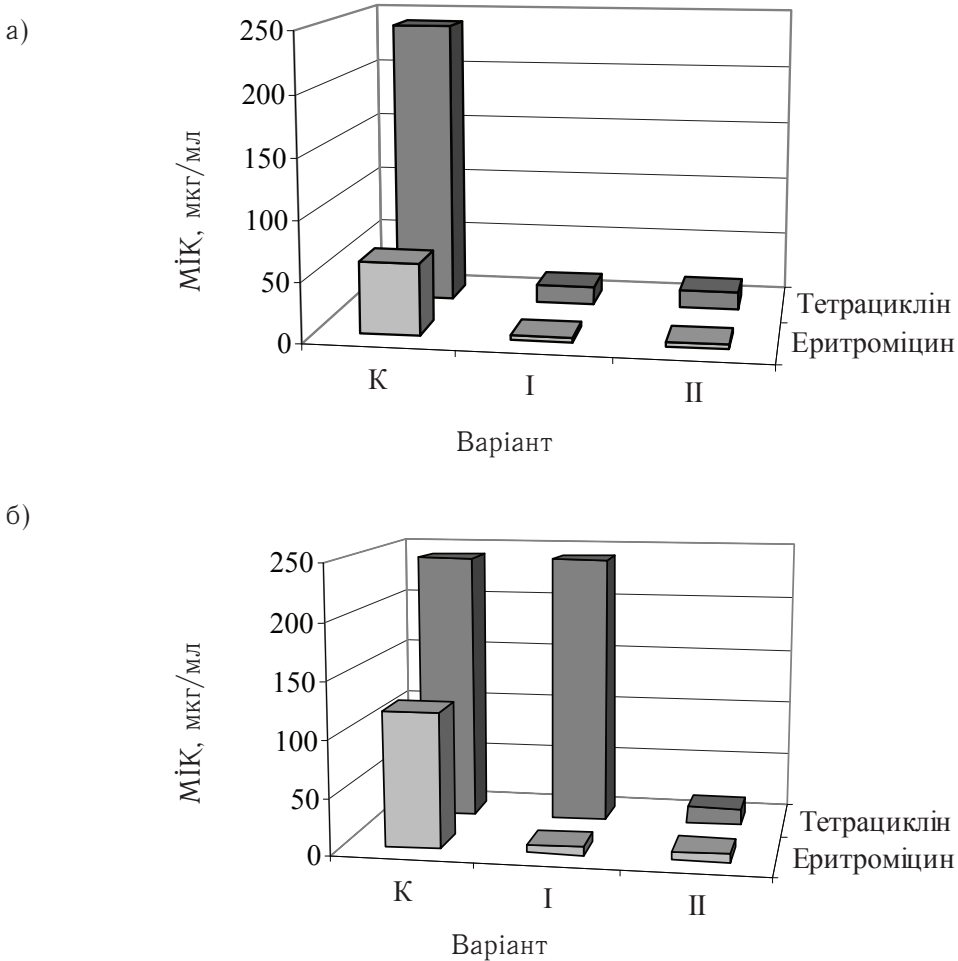


Рис. 1. МІК антибіотиків щодо *S. aureus* (а) та *E. coli* (б) в присутності синтетичних порфіринів

Fig. 1. MICs of antibiotics for *S. aureus* ONU 223 and *E. coli* ONU 206 in the presence of synthetic porphyrins

Зменшення МІК тетрацикліну у 16 разів відбувалося лише при додаванні цинкового комплексу 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфіринату тритозилату (сполука ІІ). Присутність у середовищі вільної основи порфірину (сполука І) не викликала жодного ефекту. МІК самих порфіринів у комбінації як з еритроміцином, так і з тетрацикліном, значно зменшувалися (рис. 2).

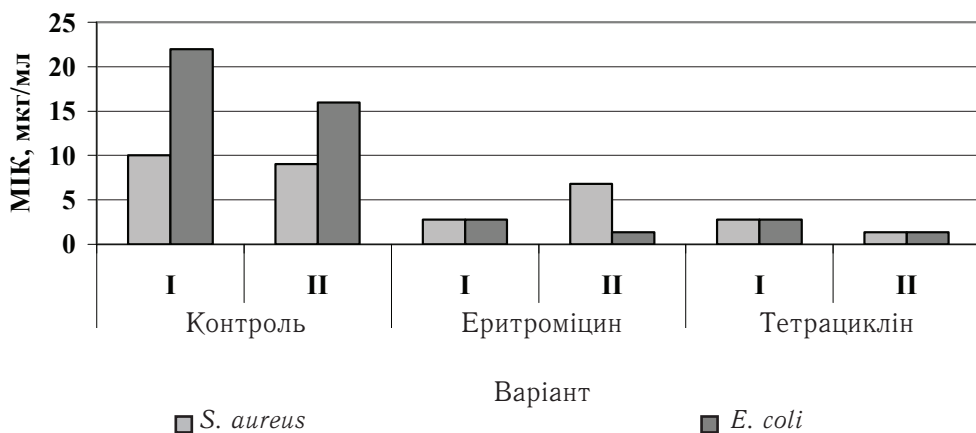


Рис. 2. МІК порфіринів щодо *S. aureus* ОНУ 223 та *E. coli* ОНУ 206 в присутності антибіотиків

Fig. 2. MICs of porphyrins for *S. aureus* ONU 223 and *E. coli* ONU 206 in the presence of antibiotics

Обчислення МІК, результати якого наведені в таблиці 2, дозволило оцінити характер взаємодії досліджуваних порфіринів та антибіотиків. Для більшості комбінацій він був визначений як синергізм. Для комбінацій еритроміцин+сполука II у випадку *S. aureus* ОНУ 223 та тетрациклін+сполука I у випадку *E. coli* ОНУ 206 характер взаємодії зазначених сполук був визначений як адитивний ефект.

Таблиця 2
Фракційні інгібувальні концентрації комбінацій антибіотиків та порфіринів, мкг/мл

Table 2
Fractional inhibitory concentrations of antibiotics and porphyrins, μg/ml

Комбінація		Штам	
		<i>S. aureus</i> ОНУ 223	<i>E. coli</i> ОНУ 206
Еритроміцин	сполука I	0,34	0,19
Еритроміцин	сполука II	0,82	0,15
Тетрациклін	сполука I	0,41	1,13
Тетрациклін	сполука II	0,28	0,15

За даними літератури, порфірини здатні знижувати МІК гідрофобних антибактеріальних агентів. Так, Minnok зі співавт. [9] показали, що при одноразовому додаванні до середовища еритроміцину та піридинфталоціаніну МІК для *E. coli* зменшувалася учетверо. На чутливість до тетрацикліну ця сполука майже не впливала — МІК знижувалася лише у 1,7 разу. Причиною такого явища дослідники вважають здатність піридинфталоціаніну заміщувати іони Mg^{2+} , які зв'язують сусідні молекули ЛПС зовнішньої мембрани, та порушувати її проникність. За таких умов полегшується надходження до клітини гідрофобних молекул. На транспорт



гідрофільних речовин це порушення не впливає, оскільки вони потрапляють до бактеріальних клітин за допомогою порфіринів [7].

У наших досліджах порфірини виявили значний вплив на чутливість кишкової палички як до еритроміцину, так і тетрацикліну, оскільки МІК цих антибіотиків знизилася у 16 разів. Цікаво, що МІК тетрацикліну зменшувалася лише за присутності цинкового комплексу дослідженого порфірину, тоді як антимікробна активність досліджених порфіринів була приблизно однаковою [2]. Вірогідно, у випадку еритроміцину підвищення чутливості клітин *E. coli* ОНУ 206 відбувалося за рахунок механізму, описаного дослідниками [9].

Що ж стосується тетрацикліну, тут можливі декілька шляхів. Відомі механізми резистентності грамнегативних бактерій до дії тетрацикліну включають активне виведення та захист рибосоми, оскільки мішенню дії антибіотика є 30S субодинаця рибосом. Перший механізм є найбільш поширеним. Детермінанти резистентності локалізовані на плазмідах, що забезпечує їх швидке поширення як усередині виду, так і поза його межами. Серед грамнегативних видів поширені гени TetA–TetE та їх продукти [3]. Вірогідно, сполука II здатна зв'язуватися з плазмідною ДНК або з продуктами відповідних генів, інактивуючи їх.

Іншим механізмом резистентності грамнегативних бактерій до тетрацикліну вважають синтез ряду захисних протеїнів, які дозволяють бактерії синтезувати білок, незважаючи на приєднання тетрацикліну до рибосоми. Механізм такого захисту невідомий, проте описано 5 генів, що кодують захисні білки [5]. Можливо, цинковий комплекс дослідженого порфірину здатний блокувати синтез подібних білків або впливати на їх захисні функції. У будь-якому разі участь центрального атому Zn в даному процесі неясна, але очевидно, що наявність іону металу є вирішальною.

Що ж стосується впливу порфіринів на чутливість *S. aureus* до антибіотиків, у літературі нема вказівок на подібні дослідження. У наших досліджах внесення синтетичних порфіринів зменшувало МІК еритроміцину у 16 разів. Оскільки стафілокок належить до грамположитивних мікроорганізмів і не має зовнішньої мембрани, в даному випадку виключається можливість полегшеного надходження даного антибіотика усередину клітини та подолання резистентності. Мішенню дії еритроміцину є 50S субодинаця рибосоми. Відомо, що стійкість стафілококів до макролідів, яким є еритроміцин, може виникати унаслідок метилування 23S субодинаці рРНК. Існує близько 20 генів *erm*, що кодують фермент метилазу. Вони асоційовані з транспозонами та можуть локалізуватися як на плазмідах, так і на хромосомах. Синтез стафілококових метилаз індукується, зокрема, 14-членними макролідами, до яких належить еритроміцин [3]. Враховуючи зниження МІК у присутності досліджуваних порфіринів, можна припустити, що ці сполуки здатні зв'язуватися з генами, які кодують метилазу та перешкоджати її синтезу. Цілком ймовірно, що порфірини діють і на більш пізній стадії та інактивують безпосередньо фермент.

Відомий також механізм резистентності стафілококів до еритроміцину за рахунок ферментативної інактивації антибіотика, проте його значення вважають набагато меншим порівняно з попереднім [3]. Однак не виключено, що досліджені сполуки здатні інактивувати відповідні ферменти.

Наявність у порфіринів здатності підвищувати чутливість тест-штамів до антибіотиків відкриває широкі можливості для створення вискоєфективних комбінованих антибактеріальних препаратів.



ЛІТЕРАТУРА

1. Гаврисюк В.К. Пенициллины, их место в отечественных и международных соглашениях по лечению пневмонии и инфекционных обострений ХОЗЛ // Украинський пульмонологічний журнал. — 2007. — № 1. — С. 52–55.
2. Зінченко О.Ю., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Іваниця В.О., Жиліна З.І., Водзінський С.В., Водзінська Н.С. Антимікробні властивості асиметрично мезо-заміщених порфіринів // Вісник ОНУ. Біологія. — 2006. — Т. 10, № 7. — С. 110–116.
3. Сидоренко С.В. Механизмы резистентности микроорганизмов // Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — М.: Наука, 2002. — 142 с.
4. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. — М.: Медицина, 1972. — С. 175–177.
5. Basic and clinical pharmacology / Ed. by B.G. Katzung. — San Francisco: Appleton and Lange, 1995. — V. 2. — P. 225–320.
6. Hallander H.O., Dornbush K., Gezelius L. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity; interaction index and killing curve method // Antimicrob. Agents Chemother. — 1982. — V. 22, № 5. — P. 743–752.
7. Hancock R.E.W. The bacterial outer membrane as a drug barrier // Trends Microbiol. — 1997. — V. 5, № 1. — P. 37–42.
8. Malik Z., Ladan H., Ehrenberg B., Nitzan Y. Bacterial and viral photodynamic inactivation // Photodynamic therapy — Medical applications / Ed. B. W. Henderson, T. J. Dougherty. — Buffalo: Marcel Dekker Inc., 1992. — P. 97–113.
9. Minnok A., Vernon D.I., Schofield J. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli* // Antimicrob. Agents Chemother. — 2000. — V. 5, № 5. — P. 522–527.
10. Miskinis K., Kaminskaite A. Treatment outcomes of multidrug resistant tuberculosis // The European respiratory Journal. Abstracts ERS Annual Congress. Geneva, Switzerland. — 1998. — P. 368.
11. Moan J., Rogan S.E., Evensen J.F. Cell photosensitization by porphyrins // Photobiophys. Photobiophys. Suppl. — 1987. — P. 385–395.

О.Ю. Зінченко, Т.О. Филиппова, Б.Н. Галкин, С.В. Водзинский, Ю.В. Ишков

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: farmikr@mail.ru

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОРФИРИНОВ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

Реферат

Исследовано влияние синтетических порфиринов на чувствительность *S. aureus* и *E. coli* к эритромицину и тетрациклину. Показано, что совместное добавление данных соединений к питательной среде приводит к значительному снижению минимальных ингибирующих концентраций как антибиотиков, так и порфиринов. Характер взаимодействия исследованных веществ для большинства комбинаций определен как синергизм.

К л ю ч е в ы е с л о в а: антибиотики, синтетические порфирины, комбинированное применение, синергизм.



O.Yu. Zinchenko, T.O. Filipova, B.M. Galkin, S.V. Vodzinsky, Yu.V. Ishkov

Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2,
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: farmikr@mail.ru

THE SYNTHETIC PORPHYRINS INFLUENCE ON OPPORTUNISTIC BACTERIA SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS

Summary

The influence of synthetic porphyrins on *S. aureus* and *E. coli* sensitivity to erythromycin and tetracycline has been studied. It has been shown the significant decrease of MICs of the mentioned compounds under their combined addition to the nutrient medium. The interaction type of studied chemicals has been determined as synergism for the most combinations.

K e y w o r d s: antibiotics, synthetic porphyrins, combined application, synergism.

