

# ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ СРЕДСТВА

## ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОФЕРОНА НА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ *Staphylococcus aureus*

Т. М. Пашкова<sup>1</sup>, О. А. Пашинина<sup>1</sup>, Л. П. Попова<sup>1</sup>,  
О. Л. Карташова<sup>1</sup>, А. Л. Коваленко<sup>2</sup>

Целью исследования явилось изучение влияния циклоферона на чувствительность *Staphylococcus aureus* к антибиотикам. Опыты поставлены на 36 штаммах золотистого стафилококка, выделенных от больных с гнойными ранами различной локализации. Использовали циклоферон, который в количестве 0,9 мл добавляли к 0,1 мл суточной агаровой культуры стафилококков в концентрации  $10^9$  КОЕ/мл, инкубировали в течение 60 мин, затем высевали на плотную питательную среду и после культивирования в течение 18–24 ч при 37 °С определяли чувствительность микроорганизмов к ампициллину, доксициклину, фузидину, фурагину, линезолиду, цефтриаксону, эритромицину диско-диффузионным методом. Показана возможность регуляции антибиотикорезистентности золотистых стафилококков с помощью циклоферона — преимущественное увеличение числа золотистых стафилококков, чувствительных к изученным антибиотикам и снижение количества умеренно-резистентных и резистентных к ним штаммов. Установлен препарат (цефтриаксон), к которому в условиях *in vitro* после инкубации с циклофероном в 1,9 раза увеличилось число чувствительных штаммов ( $p < 0,05$ ), в 2,3 раза снизилось количество умеренно-резистентных культур ( $p < 0,05$ ), резистентные культуры не зарегистрированы. Полученные результаты открывают перспективы для изучения сочетанного действия циклоферона и цефтриаксона в клинических условиях.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus aureus*; циклоферон; антибиотики.

## ВВЕДЕНИЕ

Стафилококки по-прежнему остаются возбудителями значительной части внебольничных и нозокомиальных бактериемий, инфекций кожи, мягких тканей, костей и суставов [13]. Актуальность инфекций, вызванных *Staphylococcus aureus*, возрастает во всем мире [14]. С 2010 г. зарегистрирован рост числа пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями стафилококковой этиологии [15].

Особую значимость с практических позиций представляет собой распространение штаммов золотистых стафилококков с устойчивостью или сниженной чувствительностью к антибактериальным препаратам, вследствие чего существенно ограничивается выбор препаратов для лечения инфекций, вызванных данными штаммами [15].

В связи с этим активно обсуждается вопрос о применении нетрадиционных стратегий для решения проблемы антибиотикорезистентности. Один из примеров — повышение эффективности противомикробной терапии за счет сочетанного использования антибиотика

и гормона задней доли гипофиза — окситоцина, подавляющего персистентные свойства стафилококков [2], что явилось обоснованием их применения в местной терапии ограниченных гнойных процессов различной локализации [11].

Поскольку проведенные нами ранее исследования [1] позволили выявить снижение персистентных свойств стафилококков под воздействием циклоферона в условиях *in vitro* и *in vivo*, целью данной работы явилось изучение влияния циклоферона на чувствительность золотистых стафилококков к антибиотикам различных групп.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

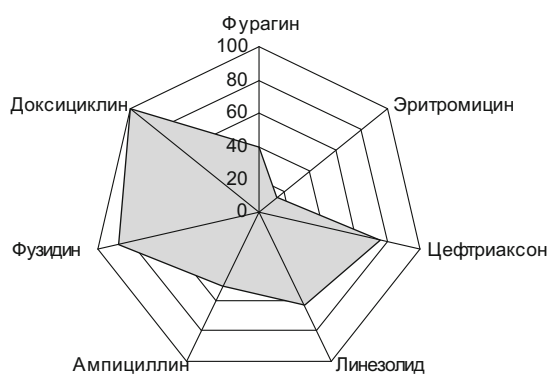
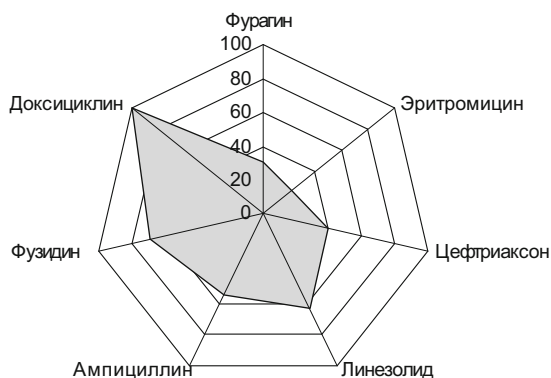
В экспериментах *in vitro* использовали раствор циклоферона для внутривенного и внутримышечного введения (ООО “Научно-технологическая фармацевтическая фирма “ПОЛИСАН”, Санкт-Петербург). Состав препарата: активное вещество — меглюмина акридон-ацетат в пересчете на акридонуксусную кислоту (125,0 мг), акридонуксусная кислота (125,0 мг), N-метилглюкамин (96,3 мг), вспомогательное вещество — вода для инъекций (до 1,0 мл).

Исследовано 36 штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных согласно методике клинических лабораторных исследований [7] от больных с гнойными ранами

<sup>1</sup> Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Россия, 460000, Оренбург, ул. Пионерская, д. 11.

<sup>2</sup> Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства, Россия, 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1.

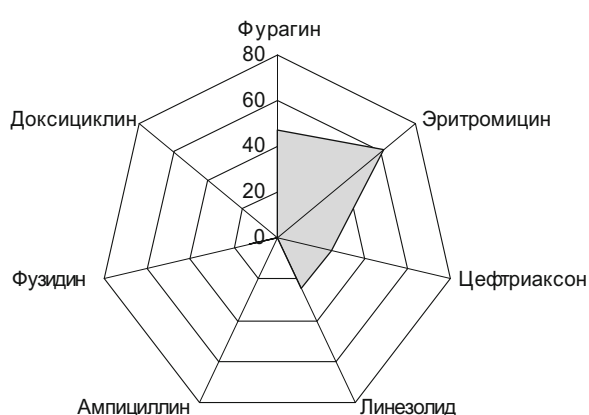
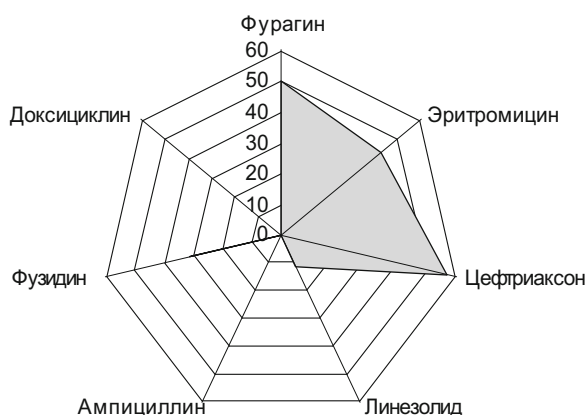
## Чувствительные



Контроль

Опыт

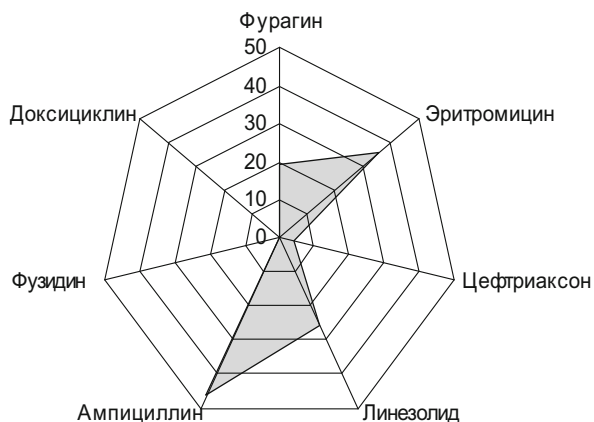
## Умеренно-резистентные



Контроль

Опыт

## Резистентные



Контроль

Опыт

Влияние циклоферона на антибиотикорезистентность *S. aureus* (0,9 мл циклоферона + 0,1 мл взвеси стафилококков  $10^9$  КОЕ/мл, время инкубации 60 мин с дальнейшей культивацией в течение 18 – 24 ч).

различной локализации, находящихся на лечении в хирургическом отделении НУЗ “Отделенческая клиническая больница на станции Оренбург ОАО “РЖД” в период с марта по апрель 2017 г. Идентификацию микроорганизмов осуществляли по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам с помощью

тест-систем “STAPHYtest” (“Erba Lachema s.r.o.”, European Union).

Влияние циклоферона на антибиотикорезистентность стафилококков проводили по следующей схеме: к 0,1 мл суточной агаровой культуры стафилококков (концентрация  $10^9$  КОЕ/мл) добавляли 0,9 мл цикло-

ферона, инкубировали в течение 60 мин, затем высевали на плотную питательную среду и культивировали в течение 18 – 24 ч при 37 °С. Далее определяли чувствительность микроорганизмов к антибиотикам параллельно с контрольными культурами, не подвергавшимися влиянию циклоферона [4].

Чувствительность к антибактериальным препаратам ампициллину, доксициклину, фузидину, фурагину, линезолиду, цефтриаксону, эритромицину до и после воздействия циклоферона определяли диско-диффузионным методом [8]. Эксперимент проводили в 3 повторностях. Степень ингибирования роста бактерий интерпретировали согласно таблице, прилагаемой изготовителем дисков антибиотиков.

Микроорганизм считается умеренно-резистентным к антибиотику, если по своей чувствительности он занимает промежуточное положение между чувствительными и резистентными штаммами. Данные обработки методами вариационной статистики [5].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что из 36 штаммов почти половина (47,2 ± 9,4) % резистентна к ампициллину, (36,1 ± 9,0) % культур – к эритромицину и (25,0 ± 7,3) % – к линезолиду; (41,6 ± 9,3) % и (11,1 ± 5,3) % штаммов характеризовались умеренной резистентностью к эритромицину и линезолиду (рисунок).

Половина изученных штаммов была умеренно-резистентна к фурагину (50,0 ± 9,8) %, (58,3 ± 9,3) % — к цефтриаксону; (19,4 ± 7,7) % и (5,5 ± 3,0) % штаммов, соответственно, характеризовались резистентностью к этим антибиотикам.

Среди выделенных штаммов отсутствовали резистентные к фузидину культуры, однако зарегистрировано (30,5 ± 8,5) % умеренно-резистентных стафилококков. К доксициклину резистентных и умеренно-резистентных *S. aureus* не выявлено.

Все изученные штаммы были чувствительны к доксициклину, (69,4 ± 8,5) % — к фузидину, (52,7 ± 9,4) % — к ампициллину, (38,8 ± 9,2) % — к цефтриаксону, (33,3 ± 7,9) % — к линезолиду; (35,7 ± 9) % — к фурагину и (22,2 ± 7,7) % — к эритромицину.

После инкубирования стафилококков с циклофероном получены следующие результаты: чувствительностью к фурагину характеризовались (38,8 ± 8,1) %, к фузидину — (88,8 ± 5,8) %, к доксициклину — 100 % штаммов, достоверно большее число культур проявили чувствительность к цефтриаксону (75,0 ± 7,2) % и линезолиду (61,1 ± 7,9) % ( $p < 0,05$ ).

Отмечено снижение числа штаммов, резистентных к фурагину (13,8 ± 5,7) %, эритромицину (25,0 ± 7,2) %, линезолиду (13,8 ± 5,6) %, а также умеренно-резистентных стафилококков к фурагину (47,2 ± 8,3) %, цефтриаксону (25,0 ± 7,2) %, фузидину (11,1 ± 5,8) % и отсутствие резистентных культур к цефтриаксону.

Вместе с тем незначительно увеличилось число штаммов, резистентных к ампициллину, и снизилась чувствительность к этому антибиотику.

Показано также снижение чувствительности штаммов к эритромицину — (13,9 ± 5,8) % культур при одновременном повышении числа умеренно резистентных стафилококков (61,1 ± 8,1) %.

Таким образом, в эксперименте *in vitro* установлена возможность регуляции антибиотикорезистентности золотистых стафилококков с помощью циклоферона, заключающаяся в преимущественном увеличении числа штаммов, чувствительных к антибиотикам различных групп, и снижении умеренно-резистентных и резистентных культур.

Циклоферон, обладая большим диапазоном биологической активности [9], характеризуется широким спектром фармакологического действия [10]. Результаты проведенных *in vitro* исследований свидетельствуют о том, что циклоферон также можно рассматривать как средство, повышающее чувствительность к антибиотикам стафилококков, способных длительно выживать в органах и тканях, демонстрируя при этом широкий диапазон адаптационных возможностей [6].

Проведенное ранее изучение морфофункциональной реакции золотистых стафилококков на воздействие циклоферона методом атомно-силовой микроскопии свидетельствует о нарушении барьерных функций клеточной стенки культур [12], что создает благоприятные условия для проникновения антибиотиков в бактериальную клетку, усиливая их действие.

### Интерпретация зон задержки роста при определении чувствительности бактерий к антибиотикам

| № | Противомикробный препарат и его концентрация в диске | Среда Мюллера – Хинтон, диаметр (в мм) зон подавления роста культур |                       |                |
|---|--|---|-----------------------|----------------|
|   |  | резистентные  | умеренно-резистентные | чувствительные |
| 1 | Фурагин 300 мкг                                      | ≤ 15  | 16 – 18               | ≥ 19           |
| 2 | Эритромицин 15 мкг                                   | ≤ 13  | 14 – 22               | ≥ 23           |
| 3 | Цефтриаксон 30 мкг                                   | ≤ 13  | 14 – 20               | ≥ 21           |
| 4 | Линезолид 30 мкг                                     | ≤ 20  | –                     | ≥ 21           |
| 5 | Ампициллин 10 мкг                                    | ≤ 28  | –                     | ≥ 29           |
| 6 | Фузидин 10 мкг                                       | ≤ 16  | 17 – 20               | ≥ 21           |
| 7 | Доксициклин 30 мкг                                   | ≤ 12  | 13 – 15               | ≥ 16           |

Данная особенность действия циклоферона имеет важное практическое значение, поскольку может рассматриваться как один из подходов решения проблемы воздействия на антибиотикорезистентную госпитальную микрофлору.

Полученные результаты о достоверном росте числа чувствительных штаммов стафилококков и снижении умеренно-резистентных и резистентных культур под действием цефтриаксона после инкубации штаммов с циклофероном открывают перспективы для изучения их сочетанного действия в клинических условиях.

Так, установленная ранее у окситоцина способность повышать чувствительность к антибиотикам у резистентных культур бактерий позволила разработать способ лечения гнойно-воспалительных заболеваний [11]. А выявленная высокая эффективность совместного применения окситоцина и ципрофлоксацина в исследованиях *in vitro* явилась основанием для проведения их клинической апробации при лечении хирургической инфекции мягких тканей [3].

Таким образом, способность циклоферона повышать чувствительность штаммов *S. aureus* к антибиотикам расширяет возможности его применения в комплексной терапии гнойных заболеваний. Препарат может быть использован для усиления действия традиционных антибиотиков, что особенно важно, когда необходимо купировать инфекционный процесс, вызванный мульти- или панрезистентным возбудителем, или в том случае, когда повышение дозы антибиотика может вызвать опасный или нежелательный побочный эффект (аллергическая реакция, токсическое действие и др.).

## ВЫВОДЫ

Показана возможность циклоферона повышать чувствительность золотистых стафилококков к антибиотикам. Установлен препарат (цефтриаксон), к которо-

му в условиях *in vitro* после инкубации с циклофероном в 1,9 раза увеличивается число чувствительных штаммов ( $p < 0,05$ ), в 2,3 раза снижается количество умеренно-резистентных культур ( $p < 0,05$ ) и отмечается отсутствие резистентных стафилококков.

## ЛИТЕРАТУРА

1. О. В. Бухарин, О. Л. Карташова и др., Патент РФ № 2441656, Опубликовано 10.02.2012.
2. О. В. Бухарин, П. П. Курлаев, Н. Б. Перунова и др., *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.*, № 6, 3 – 7 (2010).
3. О. В. Бухарин, О. Н. Чупахин, В. Н. Чарушин и др., *Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие*, Т. 7, № 4(19), 45 – 51 (2012).
4. Д. А. Кириллов, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Оренбург (2004).
5. Г. Ф. Лакин, *Биометрия*, Высшая школа, Москва (1990).
6. С. С. Ляликов, М. Г. Романцов, П. Г. Бедин и др., *Международ. ж. приклад. и фундам. исследов.*, № 10, 391 – 396 (2013).
7. *Методики клинических лабораторных исследований: справочное пособие*, Т. 3; *Клиническая микробиология. Бактериологические исследования*, В. В. Меньшиков (ред), Лабор, Москва (2009), с. 880.
8. МУК 4.2.1890-04. *Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*, Т. 6. № 4, 306 – 359 (2004).
9. П. И. Павлов, В. А. Кичигина, Л. М. Карзакова, *Вестник Чувашского универ.*, № 3, 446 – 450 (2012).
10. С. Ю. Ермак, С. А. Ляликов, М. Г. Зубрицкий и др., *Антибиотики и химиотерапия*, 59(7 – 8), 25 – 29 (2013).
11. Ю. И. Скоробогатых, О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова, Патент РФ № 2466720, опубликовано 20.11.2012.
12. Т. М. Уткина, Л. П. Потехина, О. Л. Карташова и др., *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.*, № 4, 76 – 79 (2014).
13. J. Aguilar, *PLoS One*, № 12(1), (2017).
14. M. A. Krezalik, S. Hyoju, A. Zaborin, et al., *Ann. Surg*, № 2, 9 (2017).
15. Y. Wang, V. Leng, V. Patel, et al., *Sci. Rep*, № 7, 45070 (2017).

Поступила 20.07.17

## THE EFFECT OF CYCLOFERON ON THE ANTIBIOTIC RESISTANCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS

T. M. Pashkova<sup>1</sup>, O. A. Pashinina<sup>1</sup>, L. P. Popova<sup>1</sup>, O. L. Kartashova<sup>1</sup>, and A. L. Kovalenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Pionerskaya 11, Orenburg, 460000 Russia

<sup>2</sup> Institute of Toxicology, Federal Biomedical Agency of the Russian Federation, ul. Bekhtereva 1, St. Petersburg, 192019 Russia

This work was aimed at studying the effect of cycloferon on the sensitivity of bacteria to antibiotics. The experiments were performed on 36 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with purulent wounds of various localization. Cycloferon in an amount of 0.9 mL was added to 0.1 mL of daily agar culture of staphylococci at a concentration of  $10^8$  cfu/mL, incubated for 60 minutes, plated on a dense nutrient medium, and cultivated for 18 – 24 h at 37°C. Then, the sensitivity of microorganisms to ampicillin, doxycycline, fusidic acid, furazolidone, linezolid, ceftriaxone, and erythromycin was determined by the disc-diffusion method. The possibility of control over the antibiotic resistance of *St. aureus* with the aid of cycloferon has been established, as manifested by predominant increase in the number of *St. aureus* cells sensitive to the antibiotic studied and a decrease in the number of moderately resistant and resistant cells. A drug (ceftriaxone) was found for which the number of sensitive strains increased by a factor of 1.9 ( $p < 0.05$ ), the number of moderately resistant strains decreased by a factor of 2.3 ( $p < 0.05$ ), and no resistant *St. aureus* cultures were found after the incubation with cycloferon. The obtained results open prospects for studying the combined effects of cycloferon and ceftriaxone under clinical conditions.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; cycloferon; antibiotics; resistance.