

УДК 619:616.982.211

А. И. ИЛЬИН, Б. Ф. КЕРИМЖАНОВА, Н. В. ЛЕОНОВА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА ФС-1 НА МИКОБАКТЕРИИ ТУБЕРКУЛЕЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

(РГП «Научный центр противоинфекционных препаратов», г. Алматы)

Приведены результаты изучения антибактериальной активности нового фармацевтического препарата ФС-1 на возбудителей туберкулеза человеческого и бычьего видов. При этом установлена одинаковая эффективная ингибирующая активность в отношении чувствительного штамма *M.tuberculosis* H37Rv и *M.tuberculosis* MS-115 с множественной лекарственной устойчивостью. Препарат ФС-1 также оказывает ингибирующую активность против *M.bovis* An-2.

Инфекционные болезни в начале XXI века продолжают оставаться одной из актуальных проблем и наносят значительный ущерб человечеству. По данным ВОЗ только 1,4 миллиона пациентов стационаров страдают от кросс-инфекций, связанных с развитием резистентности возбудителей к используемым антибактериальным, противовирусным препаратам, дезинфектантам и антисептикам; изменением микробного биоценоза человека; снижением сопротивляемости организма человека по отношению к микроорганизмам [1]. В этой связи наибольшую опасность вызывает распространение штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) таких возбудителей как пневмококк, энтерококк, стафилококк, холерный вибрион, плазмидии малярии, микобактерии туберкулеза, а также вирусы гепатита и иммунодефицита.

Анализ патентной информации и данных литературы свидетельствует о том, что в мировой практике арсенал antimикробных препаратов постоянно расширяется и обновляется. В настоящее время разработка новых лекарственных соединений с применением высокопроизводительного биоскрининга, синтеза и генетических методов исследований позволили выпустить на рынок целый ряд инновационных препаратов.

В РГП «Научный центр противоинфекционных препаратов» создано новое лекарственное фармацевтическое средство ФС-1, активной субстанцией которой является йодно-полимерный комплекс.

Настоящая работа посвящена определению антибактериальной активности данного препарата на патогенные штаммы микобактерий туберкулеза в эксперименте *in vitro*. Исследования проведены на базе лаборатории микробиологии ГУ ЦНИИТ РАМН.

В работе использовали чувствительный к противотуберкулезным препаратам музейный штамм *M.tuberculosis* H37Rv, штамм с множественной лекарственной устойчивостью *M.tuberculosis* MS-115 и штамм *M.bovis* An-2, чувствительный ко всем противотуберкулезным препаратам, кроме пиразинамида из музейной коллекции микобактериальных культур института.

Методика проведения исследований. Путем пассирования на жидкой питательной среде Дюбо провели перевод микобактериальных клеток тест-штаммов в одинаковую фазу роста и стандартизовали культуры по колониеобразующим единицам.

Антибактериальное действие препарата ФС-1 изучали по динамике роста микобактериальных штаммов *M.tuberculosis* H37Rv, *M.tuberculosis* MS-115 и *M.bovis* An-2 в обогащенной жидкой среде Middlebrook 7H9 в присутствии различных концентраций исследуемого препарата по сравнению с ростом этих штаммов на среде, не содержащей препаратов, а также на среде, содержащей препарат 1-го ряда изониазид в концентрации 0,1 мкг/мл. Исследование вели в трипликах. Детекцию роста проводили с помощью автоматизированной системы учета роста культур

*WHO/HTM/TB/2010.3 Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB):2010 global report on surveillance and response.

Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, USA) в специальных пробирках MGIT, содержащих связанный флюорофор под полупроницаемой мембраной на дне пробирки. Высвобождение флюорофора и испускание света определенной волны прямо пропорционально зависело от потребления микробактериальными клетками кислорода в среде. Таким образом, чем больше активно делящихся клеток в среде, тем больше они потребляют кислород и тем больше светимость флюорофора.

Детекция роста микробактериальных культур проводилась каждый час с помощью программного обеспечения Epicenter (Becton Dickinson, USA). Динамика деления микробактериальных клеток выражалась в относительных единицах флюресценции.

Для контроля специфичности роста культуры микробактерий осуществляли визуальный осмотр положительных пробирок (прозрачность среды, наличие на дне пробирки зернистости или облака культуры), микроскопию по Цилю-Нильсену, посев на кровяной агар (наличие или отсутствие роста на кровяном агаре) и ДНК-идентификацию (ПЦР на IS6110).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Office Excel.

Результаты исследований

1. Определение бактериостатической активности ФС-1 по росту штамма *Mycobacterium*

Таблица 1. Бактериостатическая активность ФС-1 в отношении *M.tuberculosis H37Rv* в автоматизированной системе Bactec MGIT 960

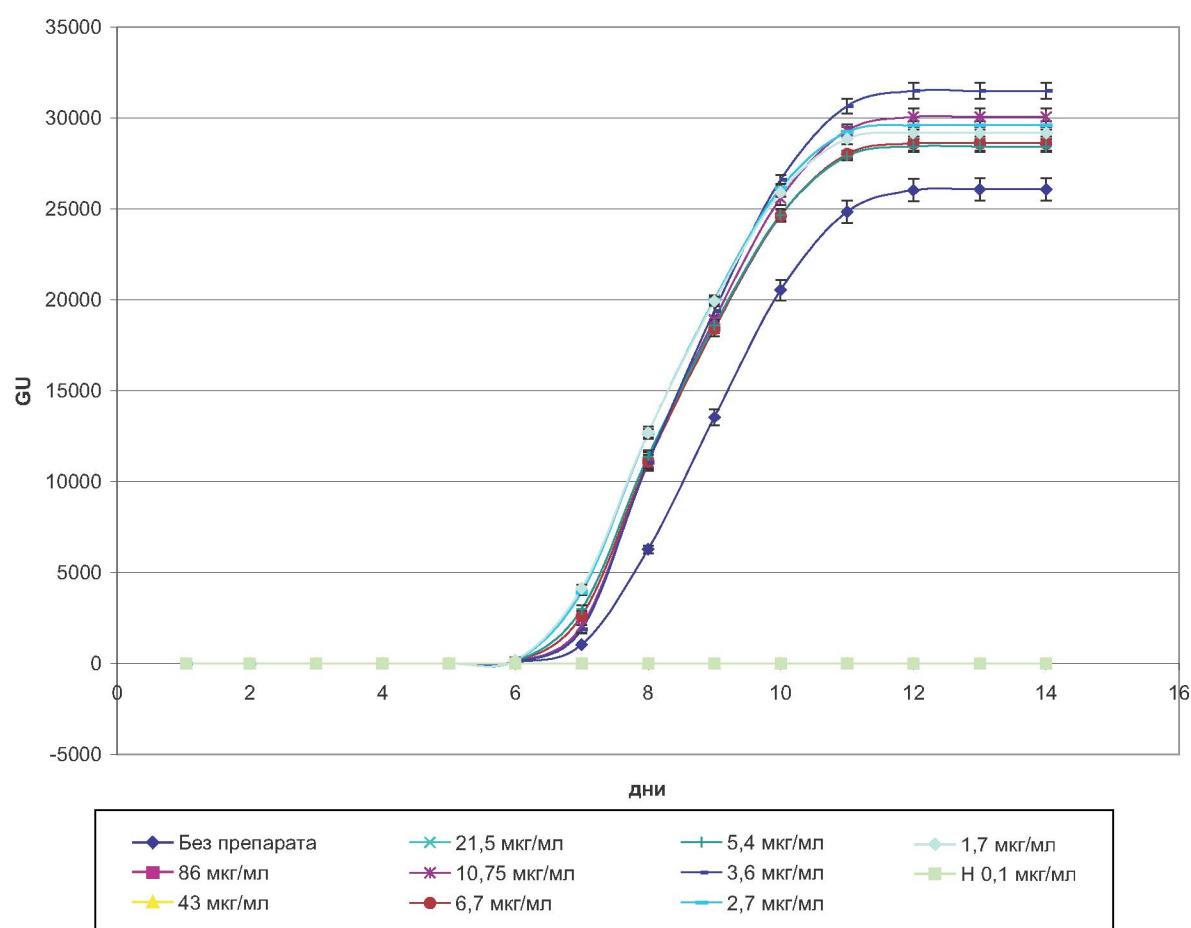
Д н и	Без		Концентрация ФС-1, мкг/мл																Изониазид 0,1 мкг/мл	
	препарата		1500		780		390		200		120		100		60		50		30	
	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	3	2	4	2	0
6	83	2	0	0	0	0	0	95	15	106	14	123	15	113	12	163	16	186	29	0
7	1037	9	0	0	0	0	0	2066	351	2611	262	2975	213	1877	219	3923	145	4132	209	0
8	6279	208	0	0	0	0	0	11078	407	11115	489	11400	344	11038	283	12665	231	12698	327	0
9	13542	437	0	0	0	0	0	18904	738	18422	411	18605	321	19390	257	20033	218	19937	248	0
10	20542	563	0	0	0	0	0	25589	390	24641	358	24680	304	26604	250	26144	236	25921	235	0
11	24849	615	0	0	0	0	0	29319	346	28014	205	27913	215	30663	403	29236	273	28866	306	0
12	26040	620	0	0	0	0	0	30063	481	28607	398	28431	280	31502	448	29610	235	29179	328	0
13	26078	615	0	0	0	0	0	30063	481	28607	398	28431	280	31502	448	29610	235	29179	328	0
14	26078	615	0	0	0	0	0	30063	481	28607	398	28431	280	31502	448	29610	235	29179	328	0

tuberculosis H37Rv в автоматизированной системе Bactec MGIT 960. Для тестирования антибактериальной активности были использованы следующие разведения препарата ФС-1: 1:5 (3380 мкг/мл); 1:10 (1840 мкг/мл); 1:12,5 (1500 мкг/мл); 1:25 (780 мкг/мл); 1:50 (390 мкг/мл); 1:100 (200 мкг/мл); 1:160 (120 мкг/мл); 1:200 (100 мкг/мл); 1:300 (60 мкг/мл); 1:400 (50 мкг/мл); 1:640 (30 мкг/мл).

Результаты исследования бактериостатической активности ФС-1 в отношении музеиного чувствительного штамма *M.tuberculosis H37Rv* представлены в табл. 1 и рис. 1. Из данных табл. 1 и рис. 1 видно, что на протяжении всего срока регистрации (42 дня) наблюдалось полное подавление размножения микробактерий в концентрациях от исходного (2030 мкг/мл) до 1:50 (21,5 мкг/мл) включительно (исх; 1:5; 1:10; 1:12,5; 1:25; 1:50).

В остальных тестируемых концентрациях рост культуры начинался с 5,71 до 5,96 суток, на плато кривая роста выходила с 11,54 до 11,87 суток.

В контроле без препарата культура *M.tuberculosis H37Rv*, экспонированная со средой, дала рост на 6 сутки. Кривая роста имела классический сигмоидный вид и состояла из трех фаз – фаза скрытого роста (до 6 суток), экспоненциальной (лог-фаза, или фаза активного деления микробактериальных клеток) – с 6 суток по 12,33 сутки и стационарной фазы, когда количество клеток в культуре не увеличивалось – с 12,33 суток до даты окончания эксперимента.



Примечание. GU – ростовые единицы.

Рис. 1. Кривая роста *M.tuberculosis* H37Rv на Bactec MGIT 960 (контрольные и тестируемые образцы)

Таблица 2. Анализ результатов исследований бактериостатической активности ФС-1 в отношении штамма *M.tuberculosis* H37Rv

Препаратор – концентрация	Начало роста (сутки)	Начало плато (сутки)	Продолжительность фазы активного деления (сутки)
Без препарата	6,00	12,33	6,33
Изониазид - 0,1 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 2030 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 3380 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 1840 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 1500 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 780 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 390 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 200 мкг/мл	5,96	11,83	5,87
ФС-1 - 120 мкг/мл	5,92	11,75	5,83
ФС-1 - 100 мкг/мл	5,88	11,67	5,79
ФС-1 - 60 мкг/мл	5,88	11,83	5,95
ФС-1 - 50 мкг/мл	5,75	11,58	5,83
ФС-1 - 30 мкг/мл	5,71	11,54	5,83

Культивирование *M.tuberculosis* H37Rv на среде с контрольным препаратом изониазидом 0,1 мкг/мл показало, что изониазид подавлял деление микробактериальных клеток на протяжении всего срока эксперимента.

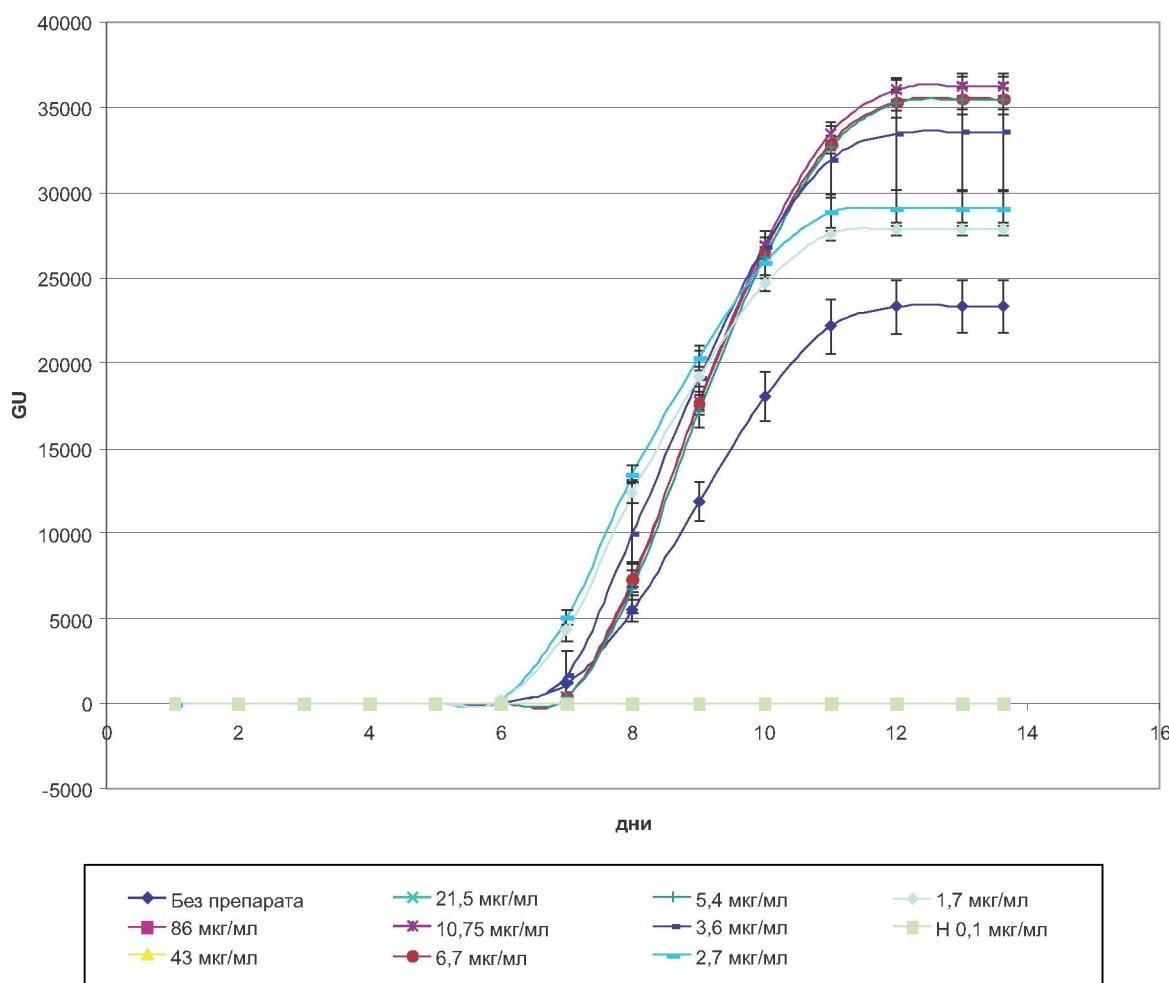
Для наглядности результаты исследования бактериостатической активности ФС-1 в отношении музейного чувствительного штамма H37Rv сведены в табл. 2.

2. Определение бактериостатической активности по росту штамма *Mycobacterium bovis* An-2 в автоматизированной системе Bactec MGIT 960. Результаты исследования бактериостатической активности ФС-1 в отношении штамма *Mycobacterium bovis* An-2 представлены в табл. 4 и рис. 2.

Как видно из табл. 3 и рис. 2, при исследовании антибактериального действия препарата ФС-1 на культуру *M.bovis* An-2 было показано, что при концентрациях от исходного (2030 мкг/мл)

Таблица 3. Бактериостатическая активность ФС-1 в отношении *M. bovis* An-2
в автоматизированной системе Bactec MGIT 960

Д н и	Без препарата		Концентрация ФС-1, мкг/мл																Изониа- зид 0,1 мкг/мл	
			1500		780		390		200		120		100		60		50			
	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	10	2	8	2	0
6	97	1	0	0	0	0	0	0	25	6	30	10	29	12	84	57	222	21	213	14
7	1203	55	0	0	0	0	0	0	381	39	408	79	387	114	1686	1433	5060	444	4326	614
8	5495	610	0	0	0	0	0	0	7192	650	7361	970	6790	1468	10002	3136	13459	546	12396	652
9	11867	1183	0	0	0	0	0	0	17782	532	17665	698	17177	956	19126	1568	20338	725	19177	538
10	18023	1461	0	0	0	0	0	0	26926	484	26563	493	26203	440	26863	920	25878	917	24660	448
11	22141	1565	0	0	0	0	0	0	33433	516	32856	437	32637	360	31920	2200	28805	1043	27569	386
12	23285	1552	0	0	0	0	0	0	36023	575	35296	555	35211	779	33446	3306	29087	1067	27853	367
13	23353	1530	0	0	0	0	0	0	36250	596	35493	607	35457	913	33547	3457	29087	1067	27853	367
14	23353	1530	0	0	0	0	0	0	36250	596	35493	607	35457	913	33547	3457	29087	1067	27853	367



Примечание. GU – ростовые единицы.

Рис. 2. Кривая роста *M. bovis* An-2 на Bactec MGIT 960 (контрольные и тестируемые образцы)

Таблица 4. Анализ результатов исследований бактериостатической активности ФС-1 в отношении штамма *M. bovis* An-2

Концентрация	Начало роста (сутки)	Начало плато (сутки)	Продолжительность фазы активного деления (сутки)
Без препарата	5,92	12,58	6,66
Изониазид - 0,1 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 2030 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 3380 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 1840 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 1500 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 780 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 390 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 200 мкг/мл	6,33	12,46	6,13
ФС-1 - 120 мкг/мл	6,29	12,38	6,09
ФС-1 - 100 мкг/мл	6,29	12,46	6,17
ФС-1 - 60 мкг/мл	5,92	11,96	6,04
ФС-1 - 50 мкг/мл	5,58	11,54	5,96
ФС-1 - 30 мкг/мл	5,62	11,58	5,96

до 1:50 (21,5 мкг/мл) включительно (исх.; 1:5; 1:10; 1:12,5; 1:25; 1:50) наблюдалось полное подавление размножения микобактерий на протяжении всего срока регистрации (60 дней).

В остальных тестируемых концентрациях рост культуры начинался с 5,58 до 6,33 суток, на плато кривая роста выходила с 11,54 до 12,46 суток.

Культура *M. bovis* An-2, экспонированная со средой без добавления препаратов, дала рост на 5,92 сутки. Кривая роста имела классический сигмоидный вид и состояла из трех фаз – фаза

скрытого роста (до 5,92 суток), экспоненциальной (лог-фаза, или фаза активного деления микобактериальных клеток) – с 5,92 суток по 12,58 сутки и стационарной фазы, когда количество клеток в культуре не увеличивалось – с 12,58 суток до даты окончания эксперимента.

Культивирование *M. bovis* An-2 на среде с контрольным препаратом изониазидом 0,1 мкг/мл показало, что изониазид подавлял деление микобактериальных клеток на протяжении всего срока эксперимента.

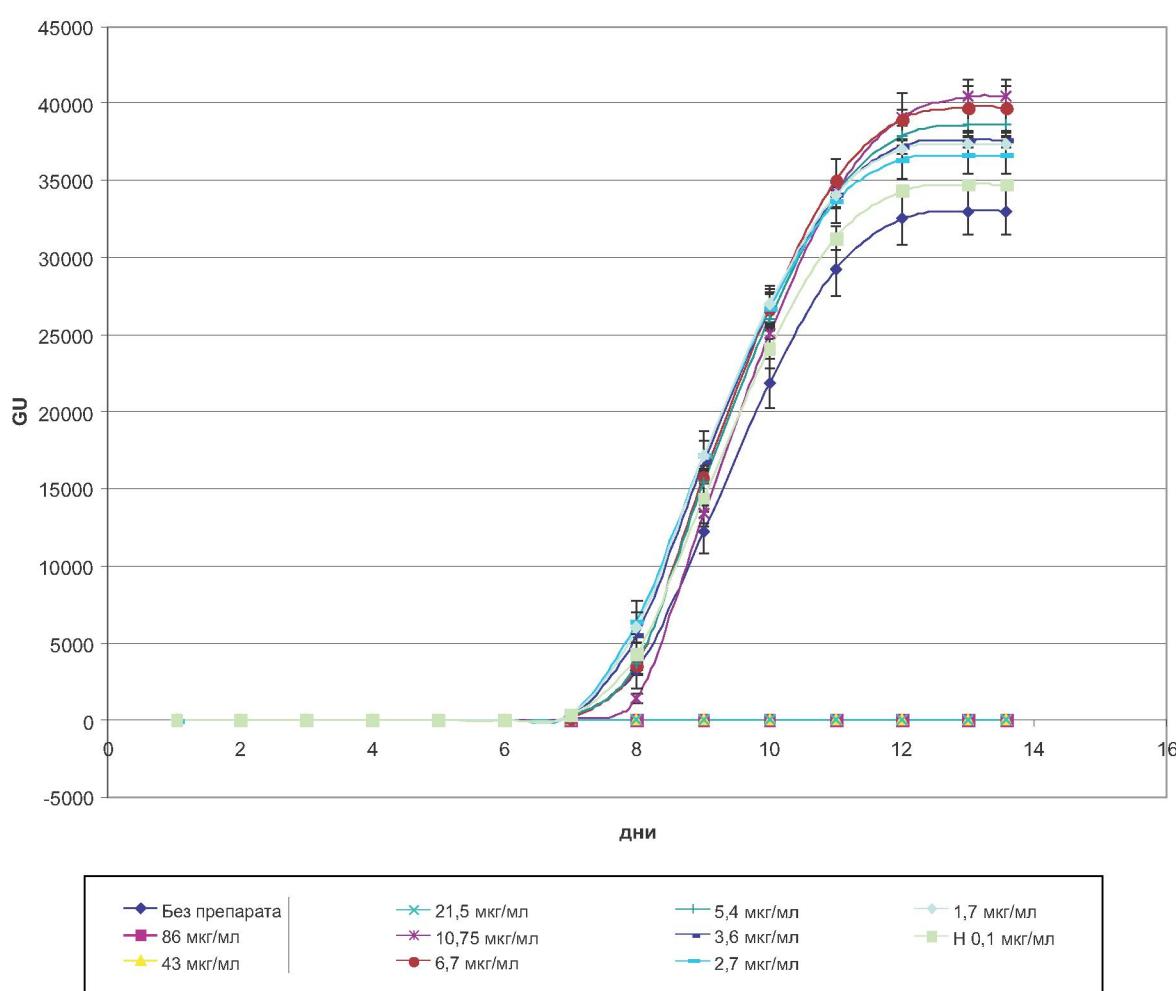
Для наглядности результаты исследования бактериостатической активности ФС-1 в отношении штамма *M. bovis* An-2 сведены в табл. 4.

3. Определение бактериостатической активности ФС-1 по росту штамма *Mycobacterium tuberculosis* MS-115 с множественной лекарственной устойчивостью в автоматизированной системе Bactec MGIT 960. *Mycobacterium tuberculosis* MS-115 устойчив к препаратам 1 ряда: рифамицину, изониазиду, стрептомицину, этамбутолу и пиразинамиду. Результаты исследования бактериостатической активности ФС-1 в отношении штамма *M. tuberculosis* MS-115 представлены в табл. 6 и рис. 3.

В результате приведенных исследований антибактериального действия препарата ФС-1 на культуру *M. tuberculosis* MS-115 было установлено, что наблюдалось полное подавление размножения микобактерий в концентрациях от исходного (2030 мкг/мл) до 1:50 (21,5 мкг/мл)

Таблица 5. Бактериостатическая активность ФС-1 в отношении МЛУ *M. tuberculosis* MS-115 на Bactec MGIT 960

Д н и	Без препарата		Концентрация ФС-1, мкг/мл												Изониа- зид 0,1 мкг/мл			
			1500	780	390	200	120	100	60	50	30	M	CO	M	CO	M	CO	M
	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO	M	CO
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	16	2	0	0	0	0	0	3	3	9	5	7	6	19	7	25	5	27
7	286	4	0	0	0	0	0	123	22	190	13	202	54	306	72	381	46	362
8	3286	361	0	0	0	0	0	1412	303	3565	324	3716	1622	5529	1492	6417	1316	6018
9	12200	1313	0	0	0	0	0	13355	609	15783	338	15415	1132	16728	1376	17170	1541	17122
10	21870	1592	0	0	0	0	0	25056	361	26686	910	26074	481	26722	1050	26741	1459	26973
11	29210	1668	0	0	0	0	0	34215	372	34991	1364	34096	289	34051	703	33616	1333	34094
12	32501	1646	0	0	0	0	0	39091	556	38984	1686	37905	858	37212	498	36370	1204	37034
13	33021	1587	0	0	0	0	0	40431	705	39735	1810	38606	1154	37609	498	36617	1156	37334
14	33021	1586	0	0	0	0	0	40439	715	39735	1810	38606	1154	37609	498	36617	1156	37334



Примечание. GU – ростовые единицы.

Рис. 3. Кривая роста *M. tuberculosis* MS-115 на Bactec MGIT 960 (контрольные и тестируемые образцы)

Таблица 6. Анализ результатов исследований бактериостатической активности ФС-1 в отношении штамма *M. tuberculosis* MS-115

Концентрация	Начало роста (дни)	Начало плато (дни)	Продолжительность фазы активного деления (дни)
Без препарата	6,5	12,96	6,46
Изониазид 0,1 мкг/мл	6,42	12,71	6,29
ФС-1 - 2030 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 3380 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 1840 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 1500 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 780 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 390 мкг/мл		Нет роста	
ФС-1 - 200 мкг/мл	6,83	13,04	6,21
ФС-1 - 120 мкг/мл	6,63	12,79	6,16
ФС-1 - 100 мкг/мл	6,63	12,79	6,16
ФС-1 - 60 мкг/мл	6,46	12,58	6,12
ФС-1 - 50 мкг/мл	6,38	12,46	6,08
ФС-1 - 30 мкг/мл	6,42	12,54	6,12

включительно (исх; 1:5; 1:10; 1:12,5; 1:25; 1:50) на протяжении всего срока регистрации (42 дня).

В остальных тестируемых концентрациях рост культуры начинался с 6,38 до 6,83 суток, на плато кривая роста выходила с 12,46 до 13,04 суток.

Культура *M. tuberculosis* MS-115, экспонированная со средой без добавления препаратов, дала рост на 6,5 сутки. Кривая роста имела классический симмоидный вид и состояла из трех фаз – фаза скрытого роста (до 6,5 суток), экспоненциальной (лог-фаза или фаза активного деления микобактериальных клеток) – с 6,5 суток по 12,96 сутки и стационарной фазы, когда количество клеток в культуре не увеличивалось – с 12,96 суток до даты окончания эксперимента.

Культивирование МЛУ штамма *M. tuberculosis* MS-115 на среде с контрольным препаратом изониазидом 0,1 мкг/мл показало, что изониазид не подавлял деление микобактериальных

клеток и рост культуры начинался на 6,42 сутки. Начало выхода на плато фиксировалось на 12,71 сутки.

Для наглядности результаты исследования сведены в табл. 6.

Заключение. Изучение ингибирующей активности препарата ФС-1 по данным культивирования в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 микобактерий туберкулеза штаммов: *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* MS-115, *M. bovis* An-2 показало, что испытуемый препарат обладал бактерицидной активностью в отношении микобактерий туберкулеза в концентрациях от исходного (2030 мкг/мл) до 1:50 (21,5 мкг/мл) включительно (исх; 1:5; 1:10; 1:12,5; 1:25; 1:50) на протяжении исследованного срока регистрации (42 сутки).

Следует отметить, что в действующих концентрациях исследованный препарат ФС-1 одинаково эффективно проявлял ингибирующую активность как в отношении чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, так и штамма *M. tuberculosis* MS-115 с множественной лекарственной устойчивостью, а также подавлял рост микобактерий туберкулеза бычьего вида *M. bovis* An-2. При этом в контрольных пробирках с изониазидом наличие роста с 5-6 суток уста-

новлено у микобактерий туберкулеза *M. tuberculosis* MS-115, тогда как у *M. tuberculosis* H37Rv и *M. bovis* An-2 наличие роста не отмечено.

Начиная со следующего разведения 1:100 (мкг/мл), наблюдался рост микобактерий туберкулеза, начальная стадия которых отмечена на 5-6 сутки в зависимости от исследуемого штамма. Начало выхода на плато установлено на 11-13 сутки в зависимости от исследуемого штамма и продолжительность фазы активного роста отмечена на 5-6 сутки.

Резюме

Жаңа ФС-1 фармацевтикалық препаратының адам және бұқа туберкулезінің қоздырышына бактерияға карсы белсенділігін зерттеу нәтижелері көлтірілген. Зерттеу нәтижесінде, *M. tuberculosis* H37Rv – дәрілік препараттарға сезімділігі жогары және *M. tuberculosis* MS-115 – көптеген препараттарға тәзімді штамдарға қатысты пәрменді тәжеуші белсенділігі бірдей екені анықталды. ФС-1 препараты *M. bovis* An-2 штамына да тәжеуші әсер етеді.

Summary

The results of the study of antibacterial activity of a new pharmaceutical product FS-1 on tuberculosis pathogens of human and bovine species are introduced. It is established equal effective inhibitory activity against susceptible strains *M. tuberculosis* H37Rv and *M. tuberculosis* MS-115 with multidrug resistance. The preparation FS-1 also has inhibitory activity against *M. bovis* An-2.