

УДК 615.281.19:579.842.16

DOI 10.20538/1682-0363-2016-4-11-19

Для цитирования: Брюханов В.М., Мирошниченко А.Г. Возможности метилэтилпиридинола в комплексном лечении бактериальной инфекции, вызванной *Klebsiella pneumoniae* (экспериментальное исследование). *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (4): 11–19.

Возможности метилэтилпиридинола в комплексном лечении бактериальной инфекции, вызванной *Klebsiella pneumoniae* (экспериментальное исследование)

Брюханов В.М.¹, Мирошниченко А.Г.²

¹ Алтайский государственный медицинский университет
Россия, 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40

² Алтайский государственный университет
Россия, 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – выявление влияния метилэтилпиридинола на результаты экспериментальной химиотерапии бактериальной инфекции, вызванной *Klebsiella pneumoniae*.

Материал и методы. Исследование проведено на клиническом штамме *Klebsiella pneumoniae*. На первом этапе исследования (*in vitro*) изучали влияние метилэтилпиридинола в концентрациях 0,25–4 мМ на развитие штамма и активность антибактериальных средств – гентамицина, ципрофлоксацина, тетрациклина, цефтазидима в сублетальных концентрациях. На втором этапе исследования (*in vivo*) на крысах линии Wistar моделировали бактериальный перитонит внутрибрюшинным введением бактериальной взвеси *Klebsiella pneumoniae* и исследовали влияние метилэтилпиридинола (80 мг/кг) на эффективность антибактериальной терапии перитонита гентамицином (30 мг/кг), ципрофлоксацином (50 мг/кг), цефтазидимом (120 мг/кг) или тетрациклином (80 мг/кг). В плазме животных определяли концентрацию церулоплазмينا (маркер интенсивности инфекционно-воспалительного процесса) и тиобарбитурат-реактивных продуктов, в эритроцитах – концентрацию восстановленного глутатиона, активность каталазы и глутатионпероксидазы.

Результаты. Установлено, что антиоксидант метилэтилпиридинол тормозит развитие периодической бактериальной культуры. Метилэтилпиридинол *in vitro* проявляет выраженный антагонизм по отношению к гентамицину, ослабляет действие цефтазидима, слабо увеличивает активность ципрофлоксацина и тетрациклина. В условиях бактериального перитонита дополнительное введение метилэтилпиридинола совместно с ципрофлоксацином и гентамицином приводит к сохранению концентрации церулоплазмينا на уровне, регистрируемом у животных, не получавших лечение. Цефтазидим проявляет антиоксидантный эффект, метилэтилпиридинол его уменьшает. Антиоксидантные свойства метилэтилпиридинола не проявляются при применении тетрациклина.

Выводы. Сопоставление данных *in vitro* и *in vivo* подтвердило нерациональность применения метилэтилпиридинола совместно с гентамицином, ципрофлоксацином, цефтазидимом или тетрациклином с целью коррекции перекисного окисления липидов при экспериментальной инфекции, вызванной *Klebsiella pneumoniae*. Метилэтилпиридинол в условиях экспериментальной химиотерапии не оказывает закономерного влияния на свободнорадикальное окисление, при применении гентамицина может уменьшать эффективность химиотерапии.

Ключевые слова: антиоксиданты, антибактериальные средства, *Klebsiella pneumoniae*, лекарственное взаимодействие.

✉ Мирошниченко Александр Геннадьевич, e-mail: pharmacologist@ya.ru

ВВЕДЕНИЕ

Оксидативный стресс остается одной из актуальных мишеней для фармакотерапии при бактериальных инфекциях и является причиной включения в комплексную терапию указанных состояний препаратов-антиоксидантов. Нарушение окислительно-восстановительных процессов при сепсисе вызывает накопление продуктов перекисаации, увеличивает частоту органических поражений и сопровождается высокой летальностью [1, 2]. В то же время гиперпродукция активных форм кислорода («респираторный взрыв») играет ключевую роль в реализации функций фагоцитов. Установлено, что скорость гибели возбудителей в организме человека прямо пропорциональна скорости продукции активных форм кислорода макрофагами [3]. Активация собственных антиоксидантных систем является важнейшим компонентом защиты бактерий от окислительного повреждения в условиях иммунного ответа [4].

Таким образом, выбор антиоксидантного средства в условиях инфекционного процесса представляет сложную задачу, так как наличие патогенных микроорганизмов предъявляет дополнительные требования к препарату, включаемому в состав комплексной терапии. Он не должен стимулировать рост патогенной микрофлоры и снижать эффективность антибактериального средства. В настоящей работе изучались свойства метилэтилпиридинола (6-метил-2-этилпиридин-3-ола-гидрохлорид) – производного 3-окси-пиридина, структурного аналога витамина В₆, отечественного антиоксиданта с антигипоксической активностью. Метилэтилпиридинол ингибирует свободнорадикальное окисление, взаимодействуя с активными формами кислорода, тормозит агрегацию тромбоцитов и нейтрофилов, полимеризацию фибрина, переход фибрина-мономера в фибрин-полимер, ингибирует фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов, увеличивает содержание цАМФ и цГМФ в клетках [5].

Цель исследования – выявление действия метилэтилпиридинола на результаты экспериментальной химиотерапии бактериальной инфекции, вызванной *Klebsiella pneumoniae*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на клиническом штамме *Klebsiella pneumoniae*, идентифицированном с помощью набора ENTEROtest 16 (Erba Lachema s.r.o, Чехия). На первом этапе исследования (*in vitro*) изучали влияние метилэтилпиридинола («Эмоксипин», ФГУП МЭЗ, Россия) в

концентрациях 0,25–4 мМ на развитие периодической культуры штамма в течение 24 ч при 35 °С в минеральной питательной среде М9. В аналогичных условиях исследовали влияние этого антиоксиданта на активность гентамицина (AppliChem, Германия), ципрофлоксацина (Sigma-Aldrich, США), тетрациклина (AppliChem, Германия), цефтазидима (Sigma-Aldrich, США), примененных в сублетальных концентрациях (50% минимальной подавляющей концентрации, установленной опытным путем). Развитие периодической культуры оценивали по оптической плотности бактериальной суспензии, измеренной с помощью аппарата Densi-la-meter (Erba Lachema s.r.o, Чехия).

На втором этапе исследования (*in vivo*) с помощью изучаемого штамма моделировали бактериальный перитонит. Для этого крысам линии Wistar массой 245–280 г внутрибрюшинно вводили бактериальную суспензию плотностью 2,5 ед. по Мак-Фарланду в дозе 5 мл/кг. Через 3 ч животным группы негативного контроля вводили стерильный изотонический раствор хлорида натрия, животным группы позитивного контроля (АБ) – растворы антибактериальных средств (гентамицин – 30 мг/кг, ципрофлоксацин – 50 мг/кг, цефтазидим – 120 мг/кг или тетрациклин – 80 мг/кг). Животные опытной группы (АБ+АО) дополнительно к антибактериальному средству получали раствор метилэтилпиридинола (80 мг/кг). Еще через 3 ч препараты вводили повторно. Через 18 ч кровь, полученную после декапитации животных, исследовали биохимически.

Для оценки интенсивности инфекционно-воспалительного процесса и перекисаации в плазме определяли концентрацию церулоплазмينا и тиобарбитурат-реактивных продуктов (ТБРП). В эритроцитах измеряли концентрацию восстановленного глутатиона (GSH), активность каталазы и глутатионпероксидазы (ГПО) [6].

Для расчетов использовали компьютерные программы Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, США) и SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., США) для Windows. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью непараметрических критериев Краскела – Уоллиса (H) и Манна – Уитни. Данные представляли в виде медианы *M* и интерквартильного размаха *Me* (25%; 75%). Различия показателей считали значимыми при $p \leq 0,05$ в исследованиях *in vitro* и при $p \leq 0,025$ в исследованиях *in vivo* [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антиоксидант метилэтилпиридинол подавляет развитие периодической бактериальной культуры

Klebsiella pneumoniae. Указанное влияние характеризуется прямой зависимостью от концентрации лекарственного средства в инкубационной среде (табл. 1). Статистически значимо оптическая плотность бактериальной суспензии уменьшалась на протяжении всего эксперимента в пробах, содержащих 2 и 4 мМ антиоксиданта.

Т а б л и ц а 1

Влияние метилэтилпиридинола на развитие периодической культуры <i>Klebsiella pneumoniae</i>			
Концентрация метилэтилпиридинола, мМ	Оптическая плотность бактериальной биомассы, М (25%; 75%) усл. ед. по Мак-Фарланду		
	6 ч	12 ч	24 ч
0	5,1 (5,0; 5,1)	5,3 (5,2; 5,3)	5,1 (5,0; 5,1)
0,25	5,2 (5,2; 5,2) ^{0,013}	5,3 (5,2; 5,3) ^{0,777}	5,1 (5,1; 5,2) ^{0,169}
0,5	5,1 (5,0; 5,2) ^{0,845}	5,2 (5,2; 5,3) ^{0,342}	5,1 (5,1; 5,2) ^{0,189}
1,0	5,1 (5,1; 5,1) ^{1,000}	5,1 (5,1; 5,2) ^{0,010}	5,1 (5,0; 5,1) ^{0,688}
2,0	4,5 (4,3; 4,7) ^{0,002}	5,0 (4,9; 5,0) ^{0,002}	4,8 (4,8; 4,9) ^{0,002}
4,0	4,3 (4,3; 4,4) ^{0,002}	4,8 (4,8; 4,8) ^{0,002}	4,7 (4,6; 4,7) ^{0,002}

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: в верхнем индексе указан уровень статистической значимости различия в сравнении с контрольной группой.

В связи с выявленными антибактериальными свойствами метилэтилпиридинола особый интерес представляет анализ его взаимодействия с антибактериальными средствами *in vitro* (табл. 2). Выраженный антагонизм, напрямую зависящий от концентрации, этот антиоксидант проявляет

в отношении гентамицина – уже через 6 ч после начала инкубации статистически значимо в 18 раз увеличивалась биомасса бактерий в присутствии 4 мМ метилэтилпиридинола по сравнению с биомассой в контрольных пробах. Через 12 ч фиксировалось начало инверсии оптической плотности образцов. Инверсия становилась отчетливо выраженной через 24 ч. Она обусловлена ускоренным развитием культур в пробах, содержащих метилэтилпиридинол и, соответственно, более ранним наступлением фазы отмирания, когда гибель клеток преобладала над их размножением в связи с истощением питательных веществ. Метилэтилпиридинол увеличивал активность ципрофлоксацина и тетрациклина. Этот эффект наиболее отчетлив через 24 ч инкубации и имел слабо выраженную связь с концентрацией антиоксиданта в пробах.

В пробах, содержащих цефтазидим и метилэтилпиридинол, максимум оптической плотности определяется уже через 6 ч после начала инкубации. В это время отчетливо выражен про-бактериальный эффект метилэтилпиридинола, прямо зависящий от его содержания. К 12 ч наступало резкое снижение оптической плотности в 3–4 раза во всех пробах с сохранением прежних тенденций. Через 24 ч плотность реверсивно изменялась (причина этого явления описана выше).

Т а б л и ц а 2

Влияние метилэтилпиридинола на активность антибактериальных средств в отношении периодической культуры <i>Klebsiella pneumoniae</i>				
Концентрация метилэтилпиридинола, мМ	Антибактериальное средство	Оптическая плотность бактериальной биомассы, М (25%; 75%) усл. ед. по Мак-Фарланду		
		6 ч	12 ч	24 ч
0 (контроль)	Гентамицин 0,65 мг/л	0,1 (0,1; 0,2)	1,2 (1,2; 1,4)	4,9 (4,7; 5,0)
0,25		0,1 (0,0; 0,1) ^{0,225}	1,8 (1,6; 1,8) ^{0,004}	5,0 (4,9; 5,4) ^{0,491}
0,5		0,1 (0,1; 0,2) ^{0,497}	2,5 (2,2; 2,8) ^{0,003}	5,0 (4,9; 5,2) ^{0,384}
1,0		0,2 (0,2; 0,2) ^{0,021}	4,0 (3,8; 4,3) ^{0,003}	4,7 (4,5; 4,7) ^{0,024}
2,0		0,6 (0,6; 0,6) ^{0,002}	4,3 (4,3; 4,4) ^{0,003}	4,3 (4,3; 4,4) ^{0,002}
4,0		1,8 (1,8; 1,8) ^{0,002}	4,1 (4,1; 4,2) ^{0,002}	4,2 (4,1; 4,3) ^{0,004}
0 (контроль)	Ципрофлоксацин 0,25 мг/л	0,5 (0,5; 0,5)	0,5 (0,5; 0,5)	1,4 (1,2; 1,8)
0,25		0,5 (0,5; 0,6) ^{0,049}	0,6 (0,5; 0,6) ^{0,050}	0,5 (0,5; 0,6) ^{0,003}
0,5		0,5 (0,5; 0,5) ^{0,136}	0,6 (0,6; 0,6) ^{0,014}	0,5 (0,5; 0,6) ^{0,003}
1,0		0,5 (0,5; 0,6) ^{0,049}	0,6 (0,6; 0,6) ^{0,003}	0,6 (0,6; 0,6) ^{0,002}
2,0		0,5 (0,5; 0,5) ^{0,350}	0,5 (0,5; 0,5) ^{0,344}	0,5 (0,5; 0,5) ^{0,002}
4,0		0,5 (0,5; 0,5) ^{0,930}	0,5 (0,5; 0,5) ^{0,344}	0,4 (0,4; 0,4) ^{0,002}
0 (контроль)	Цефтазидим 5 мг/л	2,3 (2,1; 2,4)	0,7 (0,6; 0,7)	0,5 (0,4; 0,5)
0,25		2,1 (2,1; 2,1) ^{0,158}	0,6 (0,6; 0,6) ^{0,179}	0,5 (0,5; 0,5) ^{0,217}
0,5		2,3 (2,1; 2,3) ^{0,608}	0,6 (0,6; 0,6) ^{0,179}	0,5 (0,5; 0,5) ^{0,217}
1,0		2,3 (2,2; 2,4) ^{0,448}	0,7 (0,6; 0,7) ^{0,730}	0,5 (0,5; 0,5) ^{0,217}
2,0		2,8 (2,8; 2,9) ^{0,002}	0,8 (0,8; 0,8) ^{0,002}	0,4 (0,4; 0,4) ^{0,090}
4,0		3,4 (3,4; 3,4) ^{0,002}	1,0 (1,0; 1,1) ^{0,002}	0,3 (0,3; 0,4) ^{0,004}
0 (контроль)	Тетрациклин 0,9 мг/л	0,4 (0,4; 0,4)	0,8 (0,8; 0,9)	2,9 (2,8; 3,0)
0,25		0,4 (0,4; 0,4) ^{0,572}	0,7 (0,7; 0,7) ^{0,013}	2,8 (2,5; 2,8) ^{0,060}
0,5		0,4 (0,3; 0,4) ^{0,217}	0,7 (0,7; 0,7) ^{0,004}	2,6 (2,4; 2,7) ^{0,093}
1,0	Тетрациклин 0,9 мг/л	0,4 (0,3; 0,4) ^{0,217}	0,7 (0,7; 0,7) ^{0,004}	2,7 (2,7; 2,7) ^{0,062}
2,0		0,3 (0,3; 0,3) ^{0,002}	0,7 (0,7; 0,7) ^{0,004}	2,4 (2,3; 2,7) ^{0,016}
4,0		0,2 (0,2; 0,2) ^{0,001}	0,6 (0,5; 0,6) ^{0,002}	2,4 (2,4; 2,5) ^{0,007}

Введение антибиотиков животным с моделью перитонита снижало концентрацию церулоплазмина в плазме (рис.).

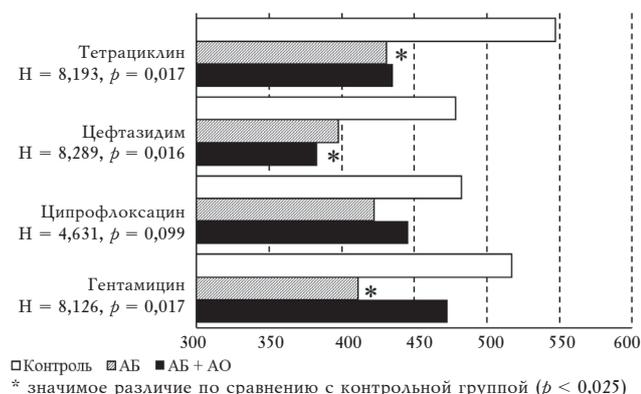


Рисунок. Изменение концентрации церулоплазмина в плазме крови крыс с бактериальным перитонитом, вызванным *Klebsiella pneumoniae*, на фоне применения антибактериальных средств и их сочетаний с метилэтилпиридинолом

Исключение составили ципрофлоксацин и цефтазидим. При применении последнего в виде монотерапии снижение содержания этого маркера лишь приблизилось к заданному порогу статистической значимости ($p = 0,026$). При этом дополнительное введение антиоксиданта вызвало снижение концентрации церулоплазмина значимо в сравнении с контролем ($p = 0,011$). Ципрофлоксацин как в виде монотерапии, так и в комбинации с метилэтилпиридинолом не вызвало статистически значимого изменения уровня церулоплазмина в плазме. При применении гентамицина дополнительное введение метилэтилпиридинола приводило к сохранению концентрации церулоплазмина на уровне контроля. Отметим, что антиоксидант не изменял показатели пероксидации при использовании указанных антибактериальных средств, лишь при применении гентамицина стабилизировал активность каталазы (табл. 3).

Таблица 3

Влияние метилэтилпиридинола на свободнорадикальное окисление в условиях химиотерапии экспериментального перитонита, вызванного <i>Klebsiella pneumoniae</i>				
Группа	ТБРП плазмы, мкМ	GSH эритроцитов, мкМ/г Нб	Каталаза эритроцитов, % на мг Нб	ГПО эритроцитов, мкМ/(мин х г Нб)
<i>Гентамицин</i>				
Контроль (n = 7)	3,57 (3,43; 3,67)	0,55 (0,47; 0,67)	0,048 (0,044; 0,052)	18,28 (14,44; 19,22)
АБ (n = 7)	3,49 (2,70; 3,59) $p = 0,318$	0,61 (0,45; 0,63) $p = 1,000$	0,030 (0,023; 0,035) $p = 0,001$	16,27 (14,01; 17,64) $p = 0,259$
АБ+АО (n = 7)	3,60 (2,96; 4,15) $p = 0,805$	0,52 (0,48; 0,56) $p = 0,710$	0,049 (0,045; 0,051) $p = 0,805$	17,40 (16,21; 18,35) $p = 0,902$
Н; p	1,975; 0,372	0,468; 0,792	12,341; 0,002	1,343; 0,511
<i>Ципрофлоксацин</i>				
Контроль (n = 7)	4,26 (3,71; 4,93)	0,64 (0,61; 0,72)	0,053 (0,048; 0,057)	11,63 (10,37; 15,27)
АБ (n = 7)	4,26 (3,74; 4,84) $p = 0,805$	0,63 (0,59; 0,69) $p = 0,620$	0,046 (0,036; 0,049) $p = 0,038$	16,94 (14,26; 18,44) $p = 0,097$
АБ+АО (n = 7)	4,34 (3,94; 4,47) $p = 0,902$	0,84 (0,59; 0,87) $p = 0,383$	0,040 (0,038; 0,050) $p = 0,038$	12,35 (11,06; 14,03) $p = 0,805$
Н; p	0,097; 0,953	1,610; 0,447	6,078; 0,048	4,393; 0,111
<i>Цефтазидим</i>				
Контроль (n = 7)	3,80 (3,50; 4,58)	0,51 (0,45; 0,60)	0,042 (0,035; 0,057)	18,52 (17,44; 19,98)
АБ (n = 7)	3,10 (2,84; 3,53) $p = 0,017$	0,68 (0,60; 0,74) $p = 0,007$	0,018 (0,015; 0,024) $p = 0,002$	20,95 (19,07; 22,38) $p = 0,053$
АБ+АО (n = 7)	3,53 (3,22; 3,78) $p = 0,165$	0,60 (0,53; 0,74) $p = 0,128$	0,028 (0,021; 0,034) $p = 0,011$	20,98 (19,12; 21,57) $p = 0,053$
Н; p	6,518; 0,038	6,731; 0,035	11,273; 0,004	5,351; 0,069
<i>Тетрациклин</i>				
Контроль (n = 7)	4,03 (3,71; 4,31)	0,49 (0,41; 0,53)	0,049 (0,048; 0,051)	16,87 (16,30; 20,50)
АБ (n = 7)	5,12 (4,97; 5,61) $p = 0,001$	0,46 (0,45; 0,65) $p = 0,382$	0,037 (0,036; 0,043) $p = 0,026$	16,34 (13,38; 16,82) $p = 0,318$
АБ (n = 7)	5,12 (4,97; 5,61) $p = 0,001$	0,46 (0,45; 0,65) $p = 0,382$	0,037 (0,036; 0,043) $p = 0,026$	14,88 (13,49; 15,66) $p = 0,053$
Н; p	11,810; 0,003	0,987; 0,610	6,820; 0,033	3,570; 0,168

Анализ профиля маркеров свободнорадикального окисления показывает, что введение цефтазида препятствует окислительному стрессу, возникающему в результате воспаления. Это выражается снижением концентрации ТБРП в

плазме, повышением концентрации GSH и уменьшением активности каталазы в эритроцитах. Дополнительное применение метилэтилпиридинола препятствует реализации антиоксидантного эффекта цефтазида, о чем свидетельствует рост

уровня ТБРП и восстановленного глутатиона в плазме при комбинированном лечении.

У всех животных, получавших тетрациклин в том числе в составе комплексной терапии, значительно возрастала концентрация ТБРП в плазме. Однако это не сопровождалось снижением содержания GSH в эритроцитах. Метилэтилпиридинол не влиял на этот эффект. Активность ГПО у животных, получавших только антибиотик, а также его комбинацию с антиоксидантом, примерно одинакова, что согласуется с вышеописанным равным содержанием субстрата этого фермента – GSH.

Метилэтилпиридинол – относительно новый антиоксидант, производное 3-оксипиридина. Антиокислительные свойства соединения обусловлены перехватом свободных радикалов за счет наличия экранированного алкильными радикалами фенольного гидроксила. Антибактериальные свойства метилэтилпиридинола может проявлять благодаря уменьшению окислительно-восстановительного потенциала, однако такое объяснение кажется не вполне достаточным. Попытаемся установить возможную мишень антиоксиданта путем анализа его взаимодействия с антибактериальными средствами. Прежде всего обращает на себя внимание феноменальное снижение активности гентамицина в присутствии метилэтилпиридинола. На основании этого можно предположить, что метилэтилпиридинол имеет сходный с аминогликозидами механизм действия. С учетом роли процессов свободнорадикального окисления в механизме действия указанного класса антибиотиков [2] можно предположить, что антагонизм обусловлен антиоксидантными свойствами взаимодействующих агентов.

Для ответа на вопрос о механизме антибактериального действия метилэтилпиридинола проанализируем его взаимодействие с другими химиотерапевтическими средствами. Установлено, что метилэтилпиридинол усиливает их действие, причем наиболее сильный эффект проявляется в его высоких концентрациях. Этот факт говорит, во-первых, об отсутствии конкуренции за фармакологическую мишень, во-вторых – о незначительном влиянии антиоксидантных свойств метилэтилпиридинола на действие прооксидантных средств. Известно, что ципрофлоксацин имеет выраженный прооксидантный эффект [8, 9]. Если бы вышеприведенная гипотеза о мощных антиоксидантных свойствах метилэтилпиридинола была верна, то в соответствующих пробах эффективность антибактериального средства уменьшалась. В связи с этим оправдан-

ным кажется предположение, согласно которому метилэтилпиридинол имеет сходный с аминогликозидами механизм действия.

Если ципрофлоксацин оказывает действие как в отношении бактерий, находящихся в состоянии покоя, так и на активно делящиеся микроорганизмы, то действие цефтазида направлено только на последних. В реализации модулирующего эффекта метилэтилпиридинола на активность цефтазида ключевая роль принадлежит специфике механизма действия антибиотика и соответствующей динамике развития штаммов. Цефтазидим является антибактериальным средством, которое эффективно преимущественно в период активного размножения бактерий, то есть в лог-фазе. Поскольку метилэтилпиридинол оказывает бактериостатическое действие, лог-фаза в соответствующих пробах угнетена, что создает кажущуюся картину усиления действия антибиотика. Далее происходит смена эффекта, которую можно объяснить сочетанием двух факторов: ослаблением бактериостатического действия цефтазида под влиянием метилэтилпиридинола и потерей активности цефтазида с течением времени. В результате этого микроорганизмы, находящиеся в состоянии бактериостаза, позднее получают возможность безопасного размножения. Инверсия развития периодических культур вызвана достижением пределов питательной среды (как в случае одновременного присутствия гентамицина и метилэтилпиридинола), поскольку штамм не достигает предела размножения (5,0–5,2 усл. ед. по Мак-Фарланду) на протяжении всего эксперимента.

Полученные данные необходимы для анализа второго этапа исследования, когда взаимодействуют все четыре элемента комплексного химиотерапевтического лечения – возбудитель, макроорганизм, антибактериальное средство и антиоксидант метилэтилпиридинол. Этот этап имеет важнейшее значение, так как в нем изучается экспериментальная фармакотерапевтическая модель, максимально приближенная к реальным условиям.

Рассмотрим модуляцию химиотерапии при применении гентамицина. Этот антибиотик вызывает наибольшую настороженность при совместном использовании с метилэтилпиридинолом, так как последний вызывает практически полную антибиотикорезистентность *in vitro*. Действительно, описанный эффект проявляется у животных с экспериментальным перитонитом – концентрация церулоплазмينا в плазме значимо снижается только при монотерапии антибиотиком.

Введение метилэтилпиридинола полностью нивелирует этот эффект. Кроме того, ни гентамицин, ни его сочетание с метилэтилпиридинолом не уменьшают концентрацию ТБРП в плазме при экспериментальном перитоните. Это связано со снижением активности антибиотика и повышенной генерацией активных форм кислорода при инфекционном процессе [10].

Сходный профиль действия обнаруживается и при применении цiproфлоксацина. В эксперименте *in vitro* метилэтилпиридинол усиливает действие этого фторхинолона, однако *in vivo*, несмотря на антибактериальную терапию, концентрация церулоплазмينا сохраняется на уровне контроля. Отсутствие антиоксидантного эффекта метилэтилпиридинола при совместном введении с цiproфлоксацином можно объяснить тем, что последний обладает прооксидантной активностью как активатор генерации фагоцитами реактивных форм кислорода [11].

Тетрациклин уменьшает концентрацию церулоплазмينا в плазме в результате антибактериального и противовоспалительного влияния. Этот антибиотик тормозит продукцию провоспалительных цитокинов, ингибирует матриксные металлопротеиназы, оказывает антиоксидантное действие [12]. При этом дополнительное введение метилэтилпиридинола не влияет на уровень церулоплазмينا и параметры свободнорадикального окисления.

Введение цефтазидима уменьшает уровень церулоплазмينا и ТБРП плазмы, повышает концентрацию GSH в эритроцитах. Изменение уровня ТБРП плазмы и GSH эритроцитов обусловлено не только антибактериальной активностью, но также антиоксидантными свойствами антибиотика, установленными нами ранее [13]. Интересно, что метилэтилпиридинол препятствует изменению параметров пероксидации, вызванных цефтазидимом.

Продукты перекисного окисления липидов могут быть использованы в качестве маркеров интенсивности свободнорадикального окисления в условиях различных патологических процессов, в том числе сепсиса [14]. Показанное нами отсутствие закономерных изменений параметров пероксидации под влиянием метилэтилпиридинола в условиях инфекционного процесса и применения антибактериальных средств, обладающих самостоятельным влиянием на свободнорадикальные процессы, обусловлено взаимозависимостью содержания и активности антиоксидантов, объединенных в системы [15, 16]. Следовательно, на первый план при решении вопроса о включении антиоксиданта в комплексную терапию бактериальной инфекции должны выступать результаты

исследований *in vitro*, подтверждающие отсутствие снижения активности антибактериального средства в отношении периодической культуры возбудителя при добавлении антиоксиданта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные продемонстрировали неоднозначное влияние метилэтилпиридинола на активность антибактериальных средств. Сопоставление данных *in vitro* и *in vivo* подтвердило нерациональность применения метилэтилпиридинола в условиях химиотерапии гентамицином, цiproфлоксацином, цефтазидимом или тетрациклином с целью коррекции параметров пероксидации при экспериментальной инфекции, вызванной *Klebsiella pneumoniae*. Как антиоксидант, метилэтилпиридинол в условиях экспериментальной химиотерапии не оказывает закономерного влияния на процессы свободнорадикального окисления, а при применении гентамицина может вызвать ослабление эффективности химиотерапии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Животных содержали в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000), Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей» (Страсбург, 1986).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кашия Ш.Р., Курмуков И.А., Обухова О.А., Байкова В.Н., Боровкова Н.Б., Шоуа Э.К., Голубкина Н.А. Применение антиоксидантов в комплексной интенсивной терапии инфекционных осложнений лекарственного противоопухолевого лечения // *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2012; 5 (1): 54–60.
2. Albesa I., Becerra M.C., Battan P.C., Paez P.L. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 317: 605–609.
3. Voyich J.M., Braughton K.R., Sturdevant D.E., Whitney A.R., Sand-Salim B., Porcella S.F., Long R.D., Dorward D.W., Gardner D.J., Kreiswirth B.N., Musser J.M., DeLeo F.R.

- Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils // *J. Immunol.* 2005; 175: 3907–3919.
4. Wang S., Deng K., Zaremba S., Deng X., Lin C., Wang Q., Tortorello M.L., Zhang W. Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress // *Applied and environmental microbiology.* 2009; 75 (19): 6110–6123.
 5. Оковитый С.В. Клиническая фармакология антиоксидантов. ФАРМиндекс-Практик. 2003; 5: 85–111.
 6. Галактионова Л.П. Особенности изменения оксидантно-антиоксидантного статуса больных бронхиальной астмой при медикаментозной и немедикаментозной коррекции: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2004. 41 с.
 7. Унгурияну Т.Н., Гржибовский А.Н. Сравнение трех и более независимых групп с использованием непараметрического критерия Краскела – Уоллиса в программе STATA // *Экология человека.* 2014; 6: 55–58.
 8. Becerra M.C., Albesa I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 297: 1003–1007.
 9. Goswami M., Mangoli S.H., Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50: 949–954.
 10. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease // *Biochem. J.* 1984; 219: 744–752.
 11. Шемагонов Д.В., Катаев В.А., Фархутдинов Р.Р. Влияние некоторых антимикробных средств на процессы свободнорадикального окисления в модельных системах // *Медицинский альманах.* 2013; 3: 89–90.
 12. Griffina M.O., Ceballos G., Villarreal F. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: possible mechanisms of action // *Pharmacol. Res.* 2011; 63 (2): 102–107.
 13. Брюханов В.М., Мирошниченко А.Г. Антиоксидантная коррекция токсичности антибактериальных средств и их влияния на процессы свободнорадикального окисления // *Фундаментальные исследования.* 2013; 12 (1): 22–26.
 14. Lalonde C., Daryani R., Campbell C., Know J., Youn Y.K., Demling R. Relationship between liver oxidant stress and antioxidant activity after zymosan peritonitis in the rat // *Crit. Care Med.* 1993: 894–900.
 15. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // *Успехи химии.* 1985; 54: 1540–1558.
 16. Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Якимчук Г.Н. Оценка холестаза по отношению супероксиддимутаза/церулоплазмин при гепатобилиарной патологии // *Клин. лаб. диагностика.* 1992; 9 (10): 11–13.

Поступила в редакцию 24.02.2016

Утверждена к печати 25.07.2016

Брюханов Валерий Михайлович, д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

Мирошниченко Александр Геннадьевич, канд. мед. наук, заместитель проректора по НИР, руководитель НОК «Живые системы» Алтайского государственного университета, г. Барнаул.

✉ Мирошниченко Александр Геннадьевич, e-mail: pharmacologist@ya.ru.

УДК 615.281.19:579.842.16

DOI 10.20538/1682-0363-2016-4-11–19

For citation: Brykhanov V.M., Miroshnichenko A.G. The potential of methylethylpyridinol in treatment of bacterial infections caused by *Klebsiella pneumoniae* (experimental study). *Bulletin of Siberian Medicine.* 2016; 15 (4): 11–19.

The potential of methylethylpyridinol in treatment of bacterial infections caused by *Klebsiella pneumoniae* (experimental study)

Brykhanov V.M.¹, Miroshnichenko A.G.²

¹ Altai State Medical University
40, Av. Lenina, Barnaul, 656038, Russian Federation

² Altai State University
61, Av. Lenina, Barnaul, 656049, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. Investigated the activity of methylethylpyridinol (6-methyl-2-ethyl-pyridin-3-ol hydrochloride) in the comprehensive treatment of the experimental bacterial infection caused by *Klebsiella pneumoniae*.

Materials and methods. The study was conducted on clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. At the first stage of the study (in vitro) studied the effect of methylethylpyridinol in concentrations 0,25–4 mM on the growth of the strain and the activity of the sublethal concentrations of antibiotics – gentamicin, ciprofloxacin, tetracycline, ceftazidime. In the second stage of the study (in vivo) in rats Wistar simulated bacterial peritonitis by intraperitoneal injection of a suspension of *Klebsiella pneumoniae* and investigated the effect of methylethylpyridinol (80 mg/kg) on the effectiveness of antibiotic therapy with gentamicin (30 mg/kg), ciprofloxacin (50 mg/kg), ceftazidime (120 mg/kg) or tetracycline (80 mg/kg). The animal blood plasma was determined ceruloplasmin concentration (marker of the intensity of infectious-inflammatory process) and thiobarbiturate-jet products, erythrocytes – the concentration of reduced glutathione, catalase and glutathione peroxidase.

Results. It is found that a methylethylpyridinol inhibits the development of periodic bacterial cultures, but exhibits a pronounced antagonism with respect to gentamicin. Antioxidant slightly increases the activity of ciprofloxacin and tetracycline. The bacteriostatic effect of antioxidant reduces the action of ceftazidime *in vitro*. In conditions of chemotherapy by using of gentamicin and ciprofloxacin additional injection of methylethylpyridinol leads to the preservation of ceruloplasmin level to the level of non-treated animals without showing the antioxidant effect. Ceftazidime exhibits antioxidant effect, reduces the introduction of methylethylpyridinol. The antioxidant properties of methylethylpyridinol did not appear in the application of tetracycline.

Conclusion. Comparison of results *in vitro* and *in vivo* confirmed irrationality of using of methylethylpyridinol in chemotherapy with gentamicin, ciprofloxacin, ceftazidime or tetracycline for correction of peroxidation in experimental infection caused by *Klebsiella pneumoniae*. Methylethylpyridinol in experimental chemotherapy has no law-governed effect on free radical oxidation, and when applied gentamicin may cause reduction the effectiveness of chemotherapy, confirmed *in vitro*.

Key words: antioxidants, antibacterial drugs, *Klebsiella pneumoniae*, drug interactions.

REFERENCES

- Kashija Sh.R., Kurmukov I.A., Obuhova O.A., Bajkova V.N., Borovkova N.B., Shoua Je.K., Golubkina N.A. Primenenie antioksidantov v kompleksnoj intensivnoj terapii infekcionnyh oslozhenij lekarstvennogo protivopuholevogo lechenija [The use of antioxidants in complex intensive therapy of infectious complications of cancer treatment drug] // *Klinicheskaja onkogematologija. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaja praktika – Clinical oncobematology. Basic research and clinical practice*, 2012; 5(1): 54–60 (in Russian).
- Albesa I., Becerra M.C., Battan P.C., Paez P.L. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 317: 605–609.
- Voyich J.M., Braughton K.R., Sturdevant D.E., Whitney A.R., Sand-Salim B., Porcella S.F., Long R.D., Dorward D.W., Gardner D.J., Kreiswirth B.N., Musser J.M., DeLeo F.R. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils // *J. Immunol.* 2005; 175: 3907–3919.
- Wang S., Deng K., Zaremba S., Deng X., Lin C., Wang Q., Tortorello M.L., Zhang W. Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress // *Applied and environmental microbiology*. 2009; 75 (19): 6110–6123.
- Okovityj S.V. Klinicheskaja farmakologija antioksidantov [Clinical pharmacology of antioxidants]. FARMIndeks-Praktik. 2003; 5: 85–111 (in Russian).
- Galaktionova L.P. Osobennosti izmenenija oksidantno-antioksidantnogo statusa bol'nyh bronhial'noj astmoj pri medikamentoznoj i nemedikamentoznoj korrakcii: diss. dokt. ...biol. nauk [Features of change of oxidant-antioxidant status in patients with bronchial asthma with medication and non-drug correction. Diss. dr. ... biol. sci.]. Novosibirsk, 2004: 41 (in Russian).
- Ungurjanu T.N., Grzhibovskij A.N. Sravnenie treh i bolee nezavisimyh grupp s ispol'zovaniem neparametricheskogo kriterija Kraskela-Uollisa v programme STATA [Comparison of three or more independent groups using the nonparametric Kruskal-Wallis test in STATA] *Jekologija cheloveka – Human ecology*. 2014; 6: 55–58 (in Russian).
- Becerra M.C., Albesa I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 297: 1003–1007.
- Goswami M., Mangoli S.H., Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50: 949–954.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease // *Biochem. J.* 1984; 219: 744–752.

11. Shemagonov D.V., Kataev V.A., Farhutdinov R.R. Vlijanie nekotoryh antimikrobnih sredstv na processy svobodnoradikal'nogo okislenija v model'nyh sistemah [Influence of some antimicrobial agents on the processes of free radical oxidation in model systems] // *Medicinskij al'manah – Medical almanac*. 2013; (3): 89–90 (in Russian).
12. Griffina M.O., Ceballos G., Villarreal F. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: possible mechanisms of action // *Pharmacol Res*. 2011; 63 (2): 102–107.
13. Brykhanov V.M., Miroshnichenko A.G. Antioksidantnaja korekcija toksichnosti antibakterial'nyh sredstv i ih vlijanija na processy svobodnoradikal'nogo okislenija [Antioxidant toxicity correction of antibacterial agents and their influence on the processes of free radical oxidation] // *Fundamental'nye issledovanija – Fundamental research*, 2013; 12(1): 22–26 (in Russian).
14. Lalonde C., Daryani R., Campbell C., Know J., Youn Y.K., Demling R. Relationship between liver oxidant stress and antioxidant activity after zymosan peritonitis in the rat // *Crit. Care Med*. 1993; 894–900.
15. Burlakova E.B., Hrapova N.G. Perekisnoe okislenie lipidov membran i prirodnye antioksidanty [Peroxidation of membrane lipids and natural antioxidants] // *Uspehi himii – Russian Chemical Reviews*, 1985; 54: 1540–1558 (in Russian).
16. Matjushin B.N., Loginov A.S., Jakimchuk G.N. Ocenka holestaza po otnosheniju superoksiddimutaza/ceruloplazmin pri gepatobiliarnoj patologii [Evaluation cholestasis against superoxide dismutase / ceruloplasmin with hepatobiliary disease] // *Klin. lab. diagnostika – Clinical Laboratory Services*. 1992; 9 (10): 11–13 (in Russian).

Received February 24.2016

Accepted July 25.2016

Brykhanov Valery M., MD, Professor, Department of Pharmacology, Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation.

Miroshnichenko Alexander G., PhD, Deputy of Vice-Rector for Scientific and Innovative Development – Head of the Scientific-Educational Complex “Living systems”, Altai State University, Barnaul, Russian Federation.

✉ **Miroshnichenko Alexander G.**, e-mail: pharmacologist@ya.ru.