

МОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ТРИПТОФАНА И ЦИНКА АСПАРТАТА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К ДОКСИЦИКЛИНУ

Артюх Т.В., Соколова Т.Н., Павлюковец А.Ю., Случич О.И.

Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга

Актуальность. Метаболизм аминокислот в бактериальных клетках может влиять на развитие факторов вирулентности микроорганизмов, изменять их патогенность, снижать протективные возможности, в том числе лишая их способности размножаться [1]. Так в тканях организма в результате снижения концентрации ионов магния и цинка, необходимых для активности гликолитических ферментов *S. aureus*, происходит нарушение гликолиза в клетках этих микроорганизмов. Глюкоза является основным субстратом энергетического метаболизма для *S. aureus*, при дефиците ионов марганца и цинка микроорганизмы могут использовать аминокислоты в качестве источника энергии [2].

Цель. Оценить модулирующий эффект триптофана и цинка аспартат на чувствительность *S.aureus*, *S.haemolyticus*, *P.aeruginosa*, и *E.coli* к доксициклину.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на клинических штаммах *S.aureus* и *S.haemolyticus*, *P.aeruginosa*, и *E.coli* выделенных у больных с вагинитами [3]. Использовали суточную культуру микроорганизмов, выращенную на скошенном мясо пептонном агаре (среда БНТ-агар, сухая для культивирования микроорганизмов) в концентрации $7,5 \times 10^6$ КОЕ/мл ед. в стерильном физиологическом растворе хлорида натрия. Концентрацию микробных тел контролировали измерением оптической плотности растворов по шкале McFarland на детекторе мутности суспензий DEN-1 Biosan.

В иммунологические планшеты вносили по 0.1 мл бульона, в качестве питательного бульона использовался мясопептонный бульон Мюллера-Хинтона, и 0.1 мл исследуемого препарата. Использовались 4 группы воздействующих веществ: 1 группа – препарат Doxycycline 20 мг/мл.; 2 группа – Doxycycline + триптофан; 3 группа – Doxycycline + цинка аспартат; 4 группа – Doxycycline + смесь (триптофан + цинка аспартат) (таблица 1). Триптофан и цинка аспартат также использовались в концентрации 20 мг/мл. Проводились двукратные разведения препаратов от 10 до 0.07 мг/мл. Затем вносился рабочий раствор бактериальной взвеси в количестве 0,02 мл. Для регистрации минимальной ингибирующей концентрации (МИК) проводилось измерение оптической плотности спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 492$ на фотометре до и после 18-ти часовой инкубации при $t=37^\circ\text{C}$.

Таблица 1. – Сравнение ингибирующей концентрации (МИК) доксициклина и его комбинации с триптофаном и цинка аспартатом

Микро-организм	Разведения исследуемых веществ в мг/мл							
	10	5	2.5	1.25	0.6	0.3	0.15	0.07
доксициклин								
<i>S. aur.</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. haem.</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>P. aer.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
доксициклин + триптофан								
<i>S. aur.</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>S. haem.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. aer.</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
доксициклин + цинка аспартат								
<i>S. aur.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. haem.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aer.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
доксициклин + триптофан + цинка аспартат								
<i>S. aur.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. haem.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aer.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+

Примечание – “-” – отсутствие роста, “+” – наличие роста;

На втором этапе исследования проводился посев инокулята из лунок на чашки для подсчета КОЕ [3]. Результаты КОЕ, минимальная бактерицидная концентрация (МБК) исследуемых микроорганизмов в зависимости от препарата и его разведения представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Сравнение бактерицидной концентрации (МБК) доксициклина и его комбинации с триптофаном и цинка аспартатом

Микро-организм	Разведения исследуемых веществ в мг/мл							
	10	5	2.5	1.25	0.6	0.3	0.15	0.07
доксициклин								
<i>S.aur.</i>	нет	нет	3	10	сп.р.	сп.р	сп.р	сп.р.
<i>S.haem.</i>	нет	4	60	57	сп.р.	сп.р	сп.р	сп.р.
<i>P.aer.</i>	сп.р.	сп.р	сп.р	сп.р.	сп.р.	сп.р	сп.р	сп.р.
<i>E.coli</i>	нет	нет	нет	нет	нет	нет	2	10
доксициклин + триптофан								
<i>S.aur.</i>	нет	нет	2	41	45	95	сп.р.	сп.р
<i>S.haem.</i>	нет	нет	нет	нет	15	37	64	175
<i>P.aer.</i>	13	10	12	20	75	71	31	83
<i>E.coli</i>	нет	нет	нет	нет	35	26	52	46
доксициклин + цинк аспартат								
<i>S.aur.</i>	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
<i>S.haem.</i>	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
<i>P.aer.</i>	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	20
<i>E.coli</i>	нет	нет	2	1	12	16	25	61
доксициклин + триптофан + цинка аспартат								
<i>S.aur.</i>	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
<i>S.haem.</i>	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
<i>P.aer.</i>	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
<i>E.coli</i>	19	52	56	40	42	86	105	120

Примечание – “сп.р.” – сплошной рост, “нет” – отсутствие роста, “цифра” – количество КОЕ

Результаты. МИК (табл. 1) доксициклина для *S.aureus* 0.6 мг/мл, для *S.haemolyticus* 1.25 мг/мл, для *P.aeruginosa* больше 10 мг/мл, для *E.coli* меньше 0.15 мг/мл; МИК 2 препарата для *S.aureus* 0.3 мг/мл, для *S.haemolyticus* 0.15 мг/мл, для *P.aeruginosa* 0.6 мг/мл, для *E.coli* 0.15 мг/мл; МИК 3 препарата для *S.aureus* меньше 0.07 мг/мл, *S.haemolyticus* меньше 0.07 мг/мл, для *P.aeruginosa* меньше 0.07 мг/мл, для *E.coli* 0.07 мг/мл; МИК 4 препарата для *S.aureus* меньше 0.07 мг/мл, для *S.haemolyticus* меньше 0.07 мг/мл, для *P.aeruginosa* меньше 0.07 мг/мл, для *E.coli* 0.3 мг/мл.

МБК (табл. 2) доксициклина для *S.aureus* 5 мг/мл, для *S.haemolyticus* 10 мг/мл, для *P.aeruginosa* больше 10 мг/мл, *E.coli* 0,3 мг/мл; МБК 2 препарата для *S.aureus* 5 мг/мл, *S.haemolyticus* 1.25 мг/мл, *P.aeruginosa* больше 10 мг/мл,

E.coli 1.25 мг/мл; МБК 3 препарата для *S.aureus* меньше 0.07 мг/мл, *S.haemolyticus* меньше 0.07 мг/мл, *P.aeruginosa* 0.07 мг/мл, *E.coli* 10мг/мл; МБК 4 препарата для *S.aureus* меньше 0.07 мг/мл, *S.haemolyticus* меньше 0.07мг/мл, *P.aeruginosa* меньше 0.07 мг/мл, *E.coli* больше 10 мг/мл.

Наибольшая чувствительность к доксициклину наблюдается у *E.coli* ; *P.aeruginosa* обладает наибольшей устойчивостью к доксициклину. Комбинация доксициклина с триптофаном повышает чувствительность *S.aureus*, *S.haemolyticus*, *P.aeruginosa*. У кишечной палочки напротив триптофан снижает чувствительность к доксициклину. МБК для *E.coli* под воздействием присутствия триптофана повысилась с 0.3 мг/мл до 1.25 мг/мл. Комбинация доксициклина с цинка аспартатом также повышает чувствительность трех микробных изолятов, кроме кишечной палочки, в еще более выраженной степени. У *S.aureus*, *S.haemolyticus* наблюдается отсутствие роста во всех разведениях, МБК для *P.aeruginosa* 0.07 мг/мл, МБК доксициклина для *E.coli* под воздействием цинка повысилась с 0.3 мг/мл до 5 мг/мл. Смесь триптофана и цинка аспартата также повышает чувствительность для *S.aureus*, *S.haemolyticus*, *P.aeruginosa* к доксициклину – наблюдается отсутствие роста. МИК доксициклина для *E.coli* под воздействием смеси триптофана и цинка аспартата повысилась с 0.3 мг/мл до более чем 10 мг/мл (табл. 2).

Выводы. МИК и МБК клинических штаммов *S.aureus*, *S.haemolyticus*, *P.aeruginosa* и *E.coli* к доксициклину зависит от его дозы. Присутствие в среде триптофана или цинка аспартата повышает активность доксициклина на *S.aureus*, *S.haemolyticus*, *P.aeruginosa*, а их комбинация с доксициклином приводит к синергетическому эффекту на данные микроорганизмы. Присутствие в среде триптофана или цинка аспартата снижает активность доксициклина по отношению к *E.coli*.

Литература

1. Павлюковец, А.Ю. Инфекционный процесс, воспаление и аминокислоты / А.Ю. Павлюковец [и др.] // Актуальные вопросы микробиологии, инфектологии и иммунологии: сборник материалов науч.-практ. конф.,Гродно, 29 апреля 2019. – С.50-52.
2. Amino-acid transporters in T-cell activation and differentiation. / W. Ren [et al.] // Cell Death Dis. – 2017. - Vol. 8. – Р.1-5.
3. Концевая, И.И. Микробиология: культивирование и рост бактерий: руководство / И.И.Концевая. – Чернигов: издательство “Десна полиграф”, 2017. – 43 с.