УДК 615.277.3:576.851.252/48

ВЛИЯНИЕ МЕТОТРЕКСАТА НА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ СТАФИЛОКОККОВ И КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК

Л.Н. Шитов, В.А. Романов

ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия Росздрава», г. Ярославль, microbyama@mail.ru

Выполнено изучение влияния метотрексата на чувствительность стафилококков и кишечных палочек к антибактериальным препаратам. Воздействие метотрексата на бактерии осуществлялось в экспериментах in vivo и in vitro. Метотрексат влияет на антибиотикорезистентность стафилококков и кишечных палочек как in vivo, так и in vitro. Характер эффекта метотрексата различен при разных условиях воздействия. Изменения антибиотикорезистентности стафилококков и кишечных палочек, наблюдаемые при воздействии препарата in vitro, являются как наследуемыми, так и ненаследуемыми.

Ключевые слова: метотрексат, стафилококки, кишечные палочки, антибиотикорезистентность.

INFLUENCE OF METHOTREXATE ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF STAPHYLOCOCCUS SPP. AND E. COLI

L.N. Shitov, V.A. Romanov

Yaroslavl state medical academy, Yaroslavl, microbyama@mail.ru

The study of influence of methotrexate on antimicrobial resistance of Staphylococcus spp. and E. coli is performed. The exposure of methotrexate to bacteria was realized in vivo and in vitro. Methotrexate affects antimicrobial resistance of Staphylococcus spp. and E. coli both in vivo and in vitro. The character of effect of methotrexate is different in various conditions of exposure. The alterations of resistance of Staphylococcus spp. and E. coli observed in vitro are both heritable and nonheritable.

Key words: methotrexate, staphylococcus, escherichia coli, antimicrobial resistance.

Введение

Метотрексат (МТ) входит в число широко применяемых препаратов, обладая противоопухолевым и иммуносупрессивным действием. К наиболее опасным и часто встречающимся осложнениям, развивающимся на фоне иммуносупрессии, возникающей при цитостатической терапии, относятся инфекции, возбудителями которых являются, главным образом, условнопатогенные представители нормальной микрофлоры организма [2, 4, 6]. Препараты с цитостатическим механизмом действия являются ДНК-тропными агентами, проявляют мутагенные свойства и, следовательно, потенциально способны вызвать изменения биологиче-

ских свойств микроорганизмов. Отмечено, что биологические свойства бактерий, выделенных на фоне введения рассматриваемых лекарственных средств, отличаются от аналогичных свойств бактерий, встречающихся у людей или лабораторных животных, не подвергавшихся воздействию препаратов с цитотоксическими свойствами [1, 3]. Публикации о прямом влиянии МТ на биологические свойства условнопатогенных бактерий в доступной литературе отсутствуют.

Цель работы

Изучение влияния МТ на антибиотикорезистентность стафилококков и кишечных палочек (КП) в экспериментах in vivo и in vitro.

Материалы и методы

Исследования in vivo выполнены на 30 беспородных белых мышах обоих полов массой 30 ± 3 г. Контрольная и опытная группы состояли из 15 животных. Все животные находились в стандартных условиях содержания и кормления. МТ вводили внутрижелудочно в дозе 2,5 мг/кг в неделю за 2 приема с интервалом 24 часа в течение 6 недель. По истечении 6 недель осуществляли выделение стафилококков и кишечных палочек из фекалий мышей контрольной и опытной группы для последующей оценки чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП).

Исследования in vitro выполнены на стандартных штаммах S. aureus ATCC 25923 и E. coli ATCC 25922. В течение 5 суток осуществляли культивирование указанных штаммов в пробирках с 5 мл мясопептонного бульона (МПБ), содержащего натриевую соль метотрексата в концентрациях 1– 500 мкг/мл, а также с МПБ, не содержащим препарата (контроль); по окончании срока культивирования выполняли оценку чувствительности к АБП.

Исследование антибиотикорезистентности проводили согласно методическим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (МУК 4.2. 1890-04) к основным клинически значимым препаратам. Оценивали минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотиков, а также частоты встречаемости чувствительных и устойчивых штаммов.

Статистическую обработку полученных данных проводили на IBM PC совместимом компьютере с помощью программ STATISTICA ® (StatSoft, Inc.) релиз 7.0 и Primer of Biostatistics (Stanton A. Glantz, McGraw Hill) версия 4.03 в среде WINDOWS ™.

Результаты и их обсуждение

При сравнении показателей антибиотикорезистентности стафилококков, выделенных у контрольной и опытной групп, статистически достоверных различий между группами не установлено. У животных, получавших МТ, обнаружено 6,7% оксациллинорезистентных штаммов стафилококков, не выявленных у мышей контрольной группы. В группе контроля изолировано 10% штаммов, устойчивых к линкомицину, тогда как у мышей, получавших МТ, такие штаммы отсутствовали (табл. 1).

E. coli, выделенные у животных опытной группы, характеризуются достоверно повышенной чувствительностью ко всем АБП, за исключением ципрофлоксацина (табл. 2), по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы ($p<0,05$).

Таблица 1

Чувствительность к АБП стафилококков, выделенных у экспериментальных животных

Антибактериальные препараты	Контроль (n=30)		Метотрексат (n=30)	
	МПК, мг/л	% устойчивых	МПК, мг/л	% устойчивых
Бензилпенициллин	0,53±0,45	83,3	0,45±0,50	70,0
Оксациллин	0,063±0,064	нет	0,084±0,055	6,7
Гентамицин	0,062±0,040	нет	0,075±0,037	нет
Ванкомицин	5,40±3,01	33,3	5,40±2,34	16,7
Линкомицин	4,51±5,03	10,0	3,21±3,47	нет
Ципрофлоксацин	0,31±0,13	нет	0,41±0,16	нет

Таблица 2

Чувствительность к АБП E. coli, выделенных у экспериментальных животных

Антибактериальные препараты	Контроль (n=37)		Метотрексат (n=36)	
	МПК, мг/л	% устойчивых	МПК, мг/л	% устойчивых
Ампициллин	10,86±4,73	нет	7,61±7,04*	нет
Меропенем	0,20±0,18	нет	0,10±0,07*	нет
Гентамицин	0,63±0,39	нет	0,32±0,21*	нет
Цефтазидим	1,75±0,83	нет	1,08±0,44*	нет
Цефотаксим	5,14±2,27	нет	3,47±1,93*	нет
Ципрофлоксацин	0,38±0,15	нет	0,34±0,15	нет

** — статистически достоверные различия с контрольной группой, $p<0,05$*

Исследования прямого воздействия различных концентраций МТ на лекарственную устойчивость бактерий in vitro показали, что препарат вызывает статистически достоверные изменения резистентности обоих штаммов по сравнению с исходным уровнем.

У S. aureus ATCC 25923 при воздействии МТ отмечены (табл. 3): статистически достоверное повышение чувствительности

Таблица 3

Чувствительность к антибактериальным препаратам S. aureus ATCC 25923, подвергшегося воздействию МТ

$C_{МТ}$, мг/л	Бензилпенициллин	Оксациллин	Меропенем	Гентамицин	Ципрофлоксацин	Линкомицин
	МПК, мг/л					
0	0,19±0,07	0,042±0,011	0,05±0,01	0,17±0,03	0,35±0,06	0,83±0,15
1	0,17±0,04	0,043±0,004	0,05±0,01	0,14±0,01	0,31±0,02	0,69±0,07
10	0,11±0,04*	0,040±0,003	0,04±0,02	0,10±0,01*	0,50±0,08*	0,83±0,15
100	0,08±0,04*	0,040±0,011	0,04±0,01	0,10±0,02*	0,50±0,13*	0,73±0,17
500	0,12±0,05	0,042±0,011	0,04±0,01	0,09±0,02*	0,44±0,12	0,83±0,08

** — статистически достоверные различия с контрольным образцом, $p<0,05$*

$C_{МТ}$ — концентрация метотрексата, мг/л (здесь и далее)

к бензилпенициллину (в концентрациях цитостатика 10-100 мкг/мл) и гентамицину (10, 100 и 500 мкг/мл МТ), снижение чувствительности к ципрофлоксацину (10, 100 и 500 мкг/мл МТ), $p<0,05$. Повышение чувствительности к бензилпенициллину сохранялось при последующем пересеве штамма; в отношении остальных АБП измененный уровень чувствительности не сохранялся. Изменения резистентности к бензилпенициллину, гентамицину и меропенему были однонаправленными на всем диапазоне исследуемых концентраций МТ.

У E. coli ATCC 25922 под влиянием МТ было констатировано (табл. 4): повышение чувствительности к цефтриаксону (при культивировании штамма МТ в присутствии концентраций МТ 1, 100 и 500 мкг/ мл), снижение чувствительности к ампициллину (концентрация МТ — 500 мкг/мл), меропенему (10 мкг/мл МТ), гентамицину (10 мкг/мл МТ), ципрофлоксацину (10 мкг/мл МТ), $p<0,05$.

При последующем пересеве культур сохранялся измененный уровень чувствительности к ампициллину, меропенему и гентамицину; в случае цефтриаксона и ципрофлоксацина изменения чувствительности не сохранялись. Изменения чувствительности E. coli ATCC 25922 к цефтриаксону при воздействии разных концентраций МТ имели однонаправленный характер.

Характер воздействия МТ на антибиотикорезистентность бактерий различен в опытах in vivo и in vitro: in vivo не было выявлено статистически значимых изменений лекарственной устойчивости стафилококков, тогда как in vitro резистентность штамма S. aureus ATCC 25923 достоверно менялась по сравнению с исходным уровнем. В опытах in vivo на фоне введения МТ выявлены оксациллинорезистентные стафилококки, в то время как in vitro влияния МТ на чувствительность к оксациллину не установлено. Чувствительность КП к АБП при воздействии МТ in vivo повышалась, а в опытах in vitro — преимущественно снижалась.

Изменения чувствительности условно-патогенных бактерий происходили на фоне изменения их популяционного уровня: у животных, получавших МТ, достоверно повышалось содержание стафилококков в фекалиях (22,11 млн КОЕ/г против

Таблица 4

Чувствительность к антибактериальным препаратам E. coli ATCC 25922, подвергшейся воздействию МТ

$C_{МТ}$, мг/л	Ампициллин	Цефтриаксон	Цефтазидим	Меропенем	Гентамицин	Ципрофлоксацин
	МПК, мг/л					
0	6,67±2,15	0,125±0,010	0,59±0,12	0,015±0,002	0,20±0,04	0,009±0,001
1	5,95±2,77	0,092±0,010*	0,49±0,13	0,027±0,015	0,25±0,11	0,010±0,002
10	6,30±3,13	0,102±0,035	0,64±0,09	0,031±0,015*	0,41±0,07*	0,011±0,003
100	6,30±0,73	0,088±0,015*	0,61±0,19	0,017±0,003	0,19±0,09	0,009±0,001
500	14,91±6,92*	0,080±0,022*	0,51±0,13	0,019±0,005	0,22±0,04	0,009±0,002

** — статистически достоверные различия с контрольным образцом, $p<0,05$*

1,48 млн КОЕ/г у контрольной группы, $p<0,05$), и достоверное снижался уровень КП (1,25 млн КОЕ/г против 5,99 млн КОЕ/г у контрольной группы, $p<0,05$).

Вероятно, in vitro МТ оказывал прямое влияние на бактериальные клетки, тогда как изменения, наблюдаемые in vivo, по-видимому, должны рассматриваться на популяционном уровне в контексте изменения численности бактериальных популяций со сдвигом пропорции устойчивых и чувствительных клеток, а также с изменением процессов обмена мобильными генетическими элементами, обусловливающими устойчивость к антибактериальным препаратам. Ряд авторов рассматривают изменение структуры популяций бактерий по признаку антибиотикорезистентности в контексте иммусупрессии, развивающейся в макроорганизме на фоне введения цитостатиков [1]. Нельзя также исключить возникновения случайных сложно воспроизводимых мутаций.

При выбранном режиме дозирования метотрексата в опытах на мышах не создается высоких стационарных концентраций, которые были использованы в опытах in vitro. Между тем применение высоких и сверхвысоких доз может создавать в организме концентрации препарата в пределах диапазона, выбранного нами для опытов in vitro [5]. Поэтому можно предположить, что механизмы, приводящие к изменению чувствительности к антибактериальным препаратам под действием метотрексата in vitro, в определенных условиях могут реализовываться и в условиях живого организма.

Таким образом, характер воздействия МТ на антибиотикорезистентность бактерий в составе микробиоценозов организма, по-видимому, является комплексным и может реализовываться путем как прямого воздействия на клетки микроорганизмов, так и опосредованно через макроорганизм и микроэкологические взаимоотношения. Множественность факторов, определяющих характер влияния, различия направленности воздействия в зависимости от условий, предполагает возможность непредсказуемых эффектов цитостатика, особенно в клинических условиях. Это указывает на необходимость максимально широкого использования мер микробиологического мониторинга у пациентов, получающих МТ, с целью выбора рациональной антибактериальной терапии в случае развития инфекционных осложнений.

Выводы

1. Метотрексат влияет на антибиотикорезистентность стафилококков и кишечных палочек как in vivo, так и in vitro.

2. Характер эффекта метотрексата различен при воздействии in vivo и in vitro.

3. Изменения антибиотикорезистентности стафилококков и кишечных палочек, наблюдаемые при воздействии препарата in vitro, являются как наследуемыми, так и ненаследуемыми.

Список литературы

1. Гетерогенность микробных популяций / В.В. Бельский, П.В. Калуцкий, В.В. Киселева и др. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. — 160 с.

2. Госпитальные инфекции в онкологической клинике: актуальность, проблемы, пути их решения / А. А. Соколов, С. Д. Митрохин, В. И. Минаев // Сопроводительная терапия в онкологии. — 2007. — № 1– 2. — С. 24–34.

3. Гульнева М.Ю. Микробная экология кишечника при некоторых системных заболеваниях соединительной ткани / М.Ю. Гульнева, В.А. Романов, Н.П. Шилкина // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2007. — № 4. — С. 38–41.

4. Коморбидные инфекции при ревматических заболеваниях: современное состояние проблемы / Б.С. Белов, Р.М. Балабанова, С.Г. Манукян и др. // Научно-практ. ревматол. — 2006. — № 3. — С. 62–66.

5. Сингин А.С. Популяционное моделирование фармакокинетики высоких доз метотрексата у пациентов с остеосаркомой / А.С. Сингин, И.Б. Бондарева // Клиническая фармакокинетика. — 2005. — № 1. — С. 18–23.

6. Recurrent major infections in juvenile-onset systemic lupus erythematosus — a close link with long-term disease damage / P.P.W. Lee, T.-L. Lee, M.H.-K. Ho [et al.] // Rheumatology. — 2007. — V. 46. — P. 1290–1296.