

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 615:28+616.002.5

ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА НА АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОНИАЗИДА В ОТНОШЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

О. А. МАНИЧЕВА¹, Н. С. СОЛОВЬЕВА¹, В. Г. АНТОНОВ², В. Ю. ЖУРАВЛЕВ¹, С. В. МАЗОХИНА¹, А. Е. ЗМАЗНОВА¹

THE INFLUENCE OF GLUTOXIM ON THE ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF ISONIAZID WITH REGARD TO DRUG RESISTANT STRAINS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

O. A. MANICHEVA¹, N. S. SOLOVYEV¹, V. G. ANTONOV², V. Y. ZHURAVLEV¹, S. V. MAZOKHINA¹, A. E. ZMAZNOVA¹¹Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава РФ,²Военно-медицинская академия, г. Санкт-Петербург

Исследовали способность препарата глутоксим (ЗАО «ФАРМА ВАМ») влиять на величину минимальной ингибирующей концентрации (МИК) изониазида в отношении стандартного чувствительного штамма *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) H37Rv и четырех клинических изолятов с различными мутациями, ассоциированными с устойчивостью к изониазиду. Потенцирующую способность глутоксима изучали с помощью адаптированного к особенностям микобактерий метода «шахматной доски». Рост бактерий визуализировали добавлением индикатора МТТ и регистрировали с помощью планшетного фотометра. Вычисляли средние значения оптической плотности по трем планшетам, результаты обрабатывали по критерию t. Глутоксим ни в одной из концентраций не влиял на рост *Mtb*, при этом препарат снижал МИК изониазида в 1,6-2,0 раза как для чувствительного штамма *Mtb* H37Rv, так и для клинических изолятов с устойчивостью, обусловленной различными мутациями в генах *katG*, *inhA* и *ahpC*. Наиболее эффективные концентрации глутоксима – 3,1-12,5 мкг/мл. В реакционной смеси *in vitro* изучен возможный механизм влияния препарата на трансформацию изониазида. Доказана способность глутоксима обеспечить полную трансформацию изониазида при окислении его перекисью водорода в конечный продукт – изоникотиновую кислоту с образованием активного промежуточного продукта – ацильного радикала, что объясняет его изониазид-потенцирующий эффект в отношении устойчивых к изониазиду штаммов *Mtb* с мутациями в гене *katG*.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, устойчивость к изониазиду, мутации, глутоксим.

The authors investigated the ability of glutoxim (JSC «FARMA VAM») to influence the value of the minimal inhibitory concentration (MIC) of isoniazid with regard to typical susceptible strain of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) H37Rv and four clinical isolates with various mutations associated with resistance to isoniazid. Potentiating ability of glutoxim was studied by means of «chessboards» method adapted to the specifics of mycobacteria. Bacterial growth was visualized by adding MTT indicator and registered by the plate photometer.

The average values of optical density were calculated on three plates, results were processed in accordance with t-criterion. Glutoxim didn't have an effect on *Mtb* growth in any concentration, thus the drug reduced MIC of isoniazid by 1.6-2.0 times both for the susceptible strain of *Mtb* H37Rv and for clinical isolates with resistance caused by various mutations in genes *katG*, *inhA* and *ahpC*. The most effective concentrations of glutoxim were 3.1-12.5 mkg/ml.

In the reaction mixture *in vitro* a possible mechanism of drug's effect on isoniazid's transformation was studied. The ability of glutoxim to provide a complete transformation of isoniazid through its oxidation by hydrogen peroxide into the final product – isonicotinic acid and formation an active intermediate product – acylic radical – was proven. It explains its isoniazid – potentiating effect with regard to isoniazid resistant *Mtb* strains with mutations in *katG* gene.

Key words: mycobacterium tuberculosis, resistance to isoniazid, mutation, glutoxim.

Появление и распространение лекарственно-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* является определяющим фактором в снижении эффективности этиотропной терапии туберкулеза. Вопросом времени является развитие лекарственной устойчивости возбудителя к новым средствам химиотерапии туберкулеза. В связи с этим повышение эффективности используемых средств химиотерапии в отношении лекарственно-устой-

чивых штаммов *M. tuberculosis* может быть одним из путей решения проблемы.

Изониазид (гидразид изоникотиновой кислоты) представляет собой пролекарство, трансформируемое микобактериями туберкулеза (МБТ) внутриклеточно в фармакологически активную форму. Под действием каталазы-пероксидазы KatG, кодируемой геном *katG*, от изониазида отщепляется гидразин и образуется ацильный ра-

дикал, который, в свою очередь, взаимодействует с никотинамидадениндинуклеотидом (НАД). Комплексообразующий радикал и НАД ингибируют фосфатредуктазу, кодируемую геном *inhA* и являющуюся синтазой жирных кислот II типа. В результате в клетке аккумулируются длинные цепи жирных кислот, а синтез миколовой кислоты, необходимого компонента клеточной стенки, прекращается. Мутации в гене *katG* приводят к инактивации фермента, и комплекс изоникотиноил-НАД не образуется, что фенотипически проявляется в виде устойчивости к изониазиду. Помимо этого, при взаимодействии изониазида с KatG образуется NO-радикал, ингибирующий ключевые ферменты дыхательной цепи [3, 11].

Глутоксим известен как регулятор естественного иммунитета, который успешно применяется при лечении туберкулеза [5]. Глутоксим является препаратом поливалентного действия, в числе прочего потенцирующим действие рифампицина и изониазида на модели заражения возбудителем туберкулеза культуры легочной ткани мышей [2, 4]. Применительно к активной форме изониазида глутоксим повышает доступность *M. tuberculosis*, иницируя механизмы удаления возбудителя из пораженных макрофагов [1]. Однако открытым остается вопрос о способности глутоксима влиять на образование активной формы изониазида из пролекарства при их сочетанном воздействии на штаммы МБТ, лекарственная устойчивость которых обусловлена мутациями в генах *katG*, *inhA* и *ahpC*.

Цель работы: исследовать способность препарата глутоксима потенцировать антимикробное действие изониазида на устойчивые к нему штаммы *Mycobacterium tuberculosis* с различными генетическими мутациями и изучить в модельном эксперименте возможный механизм образования активной формы изониазида.

Материалы и методы. Исследуемые препараты: глутоксим – химически синтезированный гексапептид со стабилизированной дисульфидной связью (бис(гамма-L-глутамил)-L-цистеинил) – бис-глицин динатриевая соль (ЗАО «ФАРМА ВАРМ»); изониазид – гидразид изоникотиновой кислоты (Sigma), изоникотиновая кислота (Sigma), глутатион окисленный (Sigma), перекись водорода (ЗАО «ВЕКТОН»), ацетонитрил (ЗАО «ВЕКТОН»), муравьиная кислота (ЗАО «ВЕКТОН»).

Штаммы *M. tuberculosis*. Исследовали штаммы *M. tuberculosis* (7106, 5307, 2712, 2067), полученные при культивировании клинического материала на плотных яичных питательных средах (Левенштейна – Йенсена и Финна-2) и музейный штамм H37Rv, полученный из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения».

Верификацию принадлежности выделенных штаммов к виду *M. tuberculosis* проводили с помощью стандартных бактериологических (морфология колоний, срок появления колоний на среде), тинкториального (окраска по Цилю – Нельсону), биохимических (салицилатный и нитратредуктазный тесты) и молекулярно-генетического методов. Амплификацию нуклеотидной последовательности IS6110 – маркера микобактерий туберкулезного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis complex*) – проводили с использованием тест-системы ЗАО «Синтол» (Россия) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) на анализаторе iCycleriQ5, Bio-Rad (США).

Фенотипическую оценку лекарственной устойчивости изолятов к изониазиду осуществляли с помощью непрямого метода абсолютных концентраций, в соответствии с приказом № 109 МЗ РФ. Штаммы 7106, 2712 и 2067 характеризовались множественной лекарственной устойчивостью, штамм № 5307 был полирезистентным (устойчивость к стрептомицину, изониазиду, этионамиду).

Молекулярно-генетическая характеристика резистентности исследуемых штаммов дана по детекции мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду в генах: *katG*, *inhA*, межрегуляторной области генов *ahpC-oxhR* с помощью биологических микрочипов «ТБ-БИОЧИП» (Регистрационное удостоверение № ФС 03262004/0889-04) ИМБ РАН.

Определение изониазид-потенцирующей активности глутоксима проводили с помощью метода «шахматной доски» («checkerboard titrations») [9], адаптированного к особенностям микобактерий. Опыты проводили в 96-луночных круглодонных планшетах. Питательную среду Миддлбука 7H9 с 10% ростовой добавкой OADC (Remel), 1,25 г/л панкреатического гидролизата казеина, 0,02% Tween-80 вносили в лунки для разведения препаратов в объеме 100 мкл. Конечные концентрации разведений глутоксима от 1,6 до 100 мкг/мл, изониазида – от 0,004 до 80 мкг/мл в зависимости от степени устойчивости к нему исследуемого штамма *M. tuberculosis*. Разведения изониазида для исследования штамма № 7106 готовили с шагом 0,5 мкг/мл, конечные концентрации: 1,0-1,5-2,0-2,5-3,0-3,5-4,0-4,5-5,0 мкг/мл.

Суспензию трехнедельной культуры *M. tuberculosis*, выращенной на плотной яичной среде Левенштейна – Йенсена, доводили до плотности 1,5 ед. McFarland, разводили в 10 раз питательной средой Миддлбука (см. выше) и инкубировали в течение 7 дней с ежедневной двукратной (по 30 с) обработкой ультразвуком (ультразвуковая ванна УЗВ7-0,063/37) и перемешиванием. Полученную субкультуру доводили питательной средой Миддлбука до плотности 1 ед. McFarland (приблизительно 3×10^8 бактерий/мл) и разводили в 20 раз той же средой. Разведение

1 : 20 – рабочее, его инокулировали в опытные и контрольные лунки. Кроме того, готовили разведение рабочей суспензии 1 : 100 – контроль 1% популяции. Объем инокулятов – 100 мкл. Планшеты помещали в герметичный полиэтиленовый пакет (для предотвращения высыхания среды) и инкубировали в течение 7 дней в термостате при температуре +35°C. На 7-е сутки инкубации во все лунки добавляли по 30 мкл водного раствора МТТ (Thiazolylblue, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, Sigma) концентрацией 1 мг/мл, стерилизованного с помощью мембранного фильтра с диаметром пор 0,2 мкм. Через сутки регистрировали интенсивность роста *M. tuberculosis* с помощью планшетного спектрофотометра Stat Fax 2100, длина волны 630 нм.

В одном опыте использовали 3 планшета в качестве параллелей. Опыт повторяли 2 раза. В каждом опыте вычисляли средние значения экстинкций и доверительный интервал для контроля роста рабочей суспензии, контроля 1% популяции и для каждого сочетания концентраций изониазида/глутоксима. Для каждого опыта строили графики изменения экстинкций, соответствующих интенсивности роста штамма. Точкой ингибции роста *M. tuberculosis* считали средние значения экстинкций, значимо не превышающие контроль 1% популяции и/или первую точку «плато». Вычисления проводили с помощью программы, составленной в формате Excel специально для метода «шахматной доски». Различия оценивали по t-тесту с помощью программы Statistica 10.0.

Изучение механизма образования активной формы изониазида. Образование активной формы изониазида при сочетанном действии окислителя (перекиси водорода) и глутоксима изучали *in vitro*.

Анализировали следующие варианты возможных химических взаимодействий:

1. **Спонтанное окисление** в растворе глутатиона (1×10^{-6} М) (действующего начала препарата глутоксим) и изониазида (1×10^{-6} М) исследовали при температуре $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Отбирали пробы в случае глутатиона через 27 ч и 100 ч; в случае изониазида – через 27, 50, 120, 145, 170 ч.

2. **Окисление глутоксима перекисью водорода.** 25 мл раствора препарата (10^{-6} М) и перекиси водорода (8×10^{-5} М) разливали по 1 мл во флаконы с крышкой. Отбирали пробы сразу после смешивания, через 27 и 100 ч инкубации при температуре $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

3. **Окисление изониазида перекисью водорода.** 25 мл раствора изониазида (10^{-6} М) и перекиси водорода (8×10^{-5} М) разливали по 1 мл во флаконы с крышкой. Отбирали пробы сразу после смешивания, через 27, 50, 120, 145 и 170 ч инкубации при температуре $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

4. **Окисление изониазида перекисью водорода в присутствии глутоксима.** 25 мл раствора, содержа-

щего изониазид (1×10^{-6} М), глутоксим (1×10^{-6} М) и перекись водорода (8×10^{-5} М), вносили по 1 мл во флаконы с крышкой. Отбирали пробы сразу после смешивания, через 27, 50, 120, 145 и 170 ч инкубации при температуре $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Отобранные пробы реакционных смесей (растворов) далее анализировали без разбавления с помощью методов хроматографии и хромато-масс-спектрометрии.

Хроматография. Анализ выполнен на ультра-эффективном жидкостном хроматографе (УЭЖХ) со спектрофотометрическим (диодно-матричным) детектором Acquity (Waters, США). Колонка BEH C18 $2,1 \times 100$ мм, зернение сорбента 1,7 мкм. Подвижная фаза: смесь ацетонитрила и 0,085% муравьиной кислоты. Содержание ацетонитрила линейно увеличивали от 0 до 20% в течение 10 мин, далее 20% в течение 6 мин. Скорость потока – 0,2 мл/мин. Длина волны УФ-детектора 220 нм. В хроматограф вводили 2 мкл раствора анализируемых веществ.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Колонка Hypersil Golda Q $100 \times 2,1$. Температура колонки 35°C . Режим и условия хроматографии описаны выше. Скорость потока 0,25 мл/мин. Ввод 2 мкл раствора анализируемых веществ.

Хромато-масс-спектрометрия. Анализ выполнен на аппарате Agilent 6530 LC/MS с квадрупольным и времяпролетным масс-анализаторами и диодно-матричным детектором.

Масс-спектрометрия (МС). Ионизация электрораспылением («электроспрей»). Режим регистрации положительных и отрицательных ионов. Напряжение на капилляре – 3,5 кВ, противоэлектростатическое – 120 В, «фрагментатор» – 200 В и другие стандартные условия регистрации масс-спектров. Высокое разрешение: $> 10\,000$. Энергия столкновений в тандемной МС: 15–25 эВ.

Продукты реакций (компоненты реакционных смесей) идентифицированы: УЭЖХ – при введении в растворы аналитических стандартов, ВЭЖХ-МС – по точной массе ионов $[M + H]^+$ и спектрам МС2.

Результаты и обсуждение

Штаммы 7106, 5307, 2712, 2067 по совокупности проведенных исследований идентифицировали как принадлежащие к виду *Mycobacterium tuberculosis*. Все штаммы были фенотипически устойчивы к изониазиду. У штамма 7106 выявлена мутация в гене *katG* (Ser315→Thr), 2712 – 3 мутации: в гене *katG* (Ser315→Thr) и (Ile335→Val), в гене *ahpC* (T10), 5307 – в гене *inhA* (T15), 2067 – в гене *ahpC* (T15).

Во всех опытах глутоксим в концентрациях от 1,6 до 100 мг/мл не влиял на интенсивность роста исследуемых штаммов.

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) изониазида для чувствительного штамма H37Rv была равна 0,062 мкг/мл. Глутоксим в концентрациях 1,6-12,5 мкг/мл повышал активность изониазида в 2 раза (рис. 1, 2; табл.).

В предварительных опытах было установлено, что глутоксим потенцировал действие изониазида на штамм 7106 менее чем в 2 раза. Поэтому использовали изониазид в концентрациях с шагом в 0,5 мкг/мл, в диапазоне от 1,0 до 5,0, т. е. 1,0-1,5-2,0-2,5-3,0-3,5-4,0-4,5-5,0 мкг/мл. МИК изониазида была равна 3,5 и 3,0 мкг/мл соответственно в первой и второй серии опытов, в среднем составила 3,25 мкг/мл. Глутоксим в концентрациях от 1,6 до 12,5 мкг/мл потенцировал действие изониазида, уменьшая МИК до 2,0 мкг/мл, т. е. в 1,5-1,75 раза (в среднем в 1,6 раза) (рис. 1, 2; табл.).

Рис. 1. Потенцирующая изониазид активностью глутоксима в отношении штаммов *M. tuberculosis*.

Визуальная картина планшетов. А1 – контроль среды, бланк. Ряд А2-А10 – разведения изониазида, ряд В1-Н1 – разведения глутоксима, ряды В2-Н10 – разведения изониазида + глутоксима, ряд А11-Н11 – рабочий контроль роста, ряд А12-Н12 – контроль роста 1% популяции

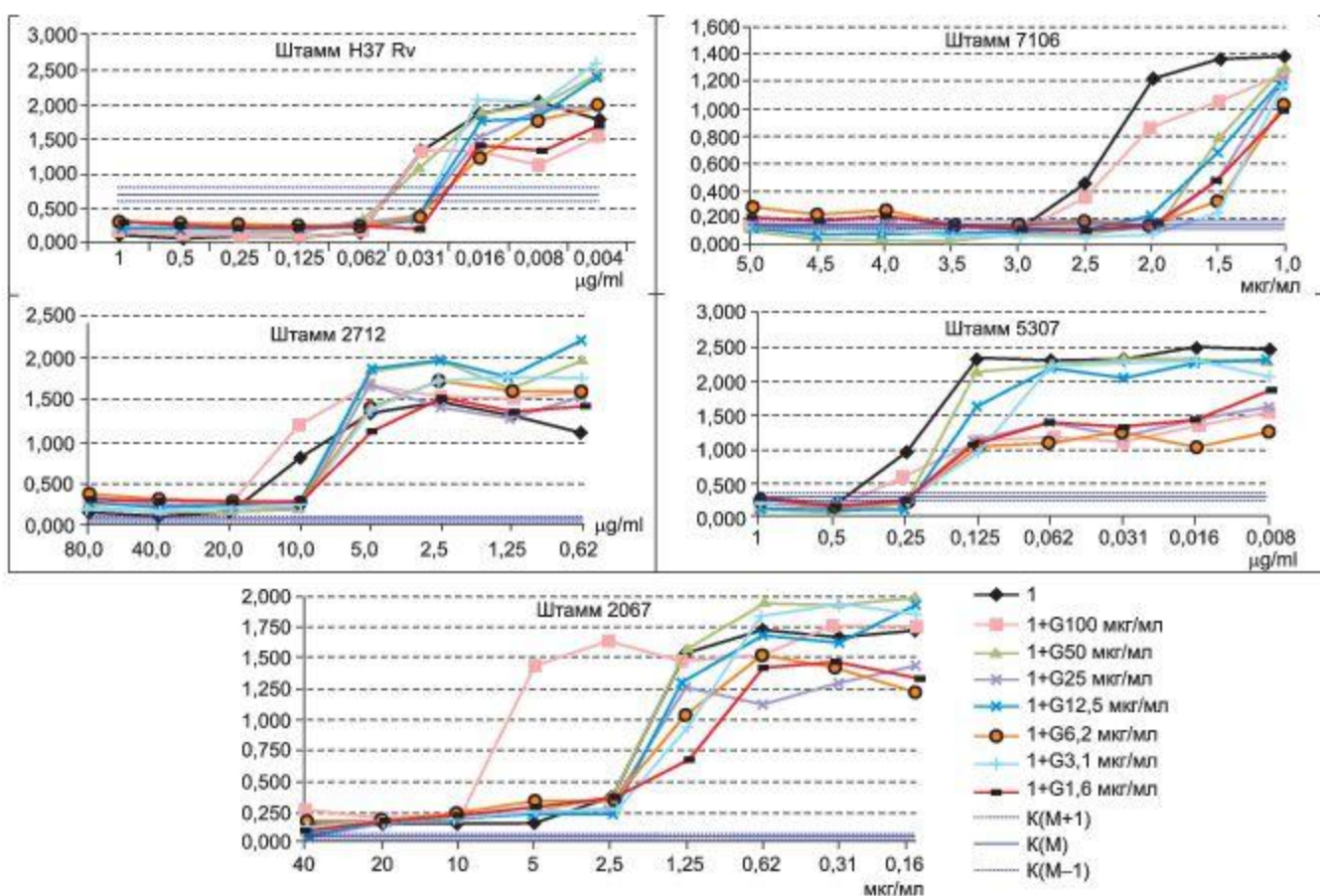
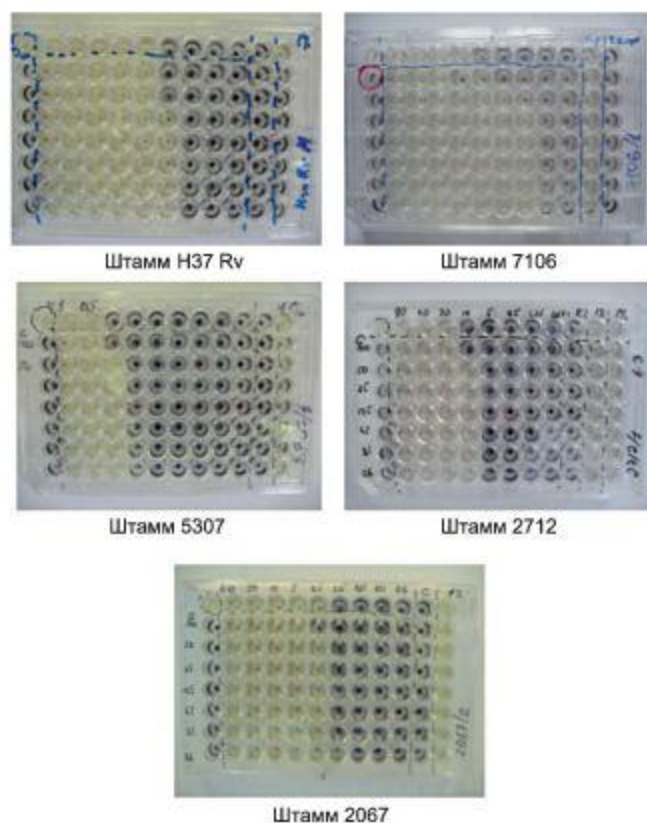


Рис. 2. Потенцирующая изониазид активностью глутоксима в отношении штаммов *M. tuberculosis* при фотометрической индикации роста. По оси абсцисс концентрации изониазида в мкг/мл, по оси ординат – средние значения оптической плотности. I – изониазид, G – глутоксим, К 1% (М + I) – верхняя граница доверительного интервала контроля роста 1% популяции, К 1% (М) – среднее значение оптической плотности контроля роста (1% популяции), К 1% (М - I) – нижняя граница доверительного интервала контроля роста 1% популяции

Характеристика исследованных штаммов, МИК изониазида, потенцирующая активность глутоксима

Штамм	Характер чувствительности к противотуберкулезным препаратам	Мутация	МИК изониазида (мкг/мл)	МИК изониазида (мкг/мл) при воздействии глутоксима*
H37Rv	Чувствительность	нет	0,062	0,031
7106	Множественная лекарственная устойчивость	<i>katG</i> (Ser315→Thr)	3,25	2,0
2712	Множественная лекарственная устойчивость	<i>katG</i> (Ser315→Thr), (Ile335→Val), <i>ahpC</i> (T10)	20,0	10,0
5307	Полнорезистентность	<i>inhA</i> (T15)	0,5	0,25
2067	Множественная лекарственная устойчивость	<i>ahpC</i> (T9)	5,0	2,5

Примечание: * – концентрация глутоксима 3,1-12,5 мкг/мл.

При исследовании влияния сочетаний различных концентраций глутоксима и изониазида штамм 5307 МИК изониазида оказалась равной 0,5 мкг/мл. Потенцирующее действие глутоксима (рис. 1, 2) проявлялось в концентрациях от 1,6 до 50 мкг/мл, при этом препарат уменьшал МИК изониазида в 2 раза (табл.).

МИК изониазида для штамма 2712 в обеих сериях опытов была 20,0 мкг/мл. Глутоксим в концентрациях 1,6-50 мкг/мл усиливал антибактериальный эффект изониазида в 2 раза (табл.; рис. 1, 2).

МИК изониазида для штамма 2067 достигала 5,0 мкг/мл. Глутоксим в концентрациях 1,6-50 мкг/мл потенцировал эффект изониазида в 2 раза (табл.), однако эффект был менее выраженным в сравнении с остальными штаммами (рис. 1, 2). В случае со штаммами 2712 и 2067 рост контроля 1% популяции был очень медленным, и точки МИК определяли для данных штаммов с помощью графика по первой точке выхода ломаной на «плато».

Таким образом, глутоксим усиливал антимикробный эффект изониазида в отношении устойчивых к нему форм *M. tuberculosis* с различными мутациями, наиболее эффективные концентрации – от 3,1 до 12,5 мкг/мл.

Активная форма изониазида (ацильный радикал) образуется в ферментативной реакции, где в качестве окислителя выступает перекись водорода. Мутации в гене, приводящие к снижению активности каталазы-пероксидазы, не делают *M. tuberculosis* абсолютно устойчивыми к изониазиду. Повышение терапевтических доз изониазида позволяет получить антибактериальный эффект. Иными словами, изониазид в отсутствие активной каталазы-пероксидазы (в случае *M. tuberculosis* с мутациями в гене *katG*) способен вступать в реакцию окисления перекисью водорода внутри микобактерий или в их микроокружении, что приводит к образованию его активной формы. Глутоксим потенцировал действие изониазида, не обладая при этом антимикобактериальной активностью.

Можно предположить, что глутоксим оказывал влияние на образование изоникотиноил радикала в реакции изониазида и перекиси водорода. Возможное влияние глутоксима на реакцию окисления изониазида перекисью водорода было исследовано *in vitro* в контролируемых условиях. Результаты исследований представлены на рис. 3 и 4.

В ходе модельного эксперимента обнаружено, что изониазид и глутоксим в выбранных концентрациях стабильны в водном растворе (т. е. при спонтанном окислении). Уменьшение концентрации как глутоксима, так и изониазида отмечалось в присутствии перекиси водорода. Последняя практически полностью разрушает глутоксим

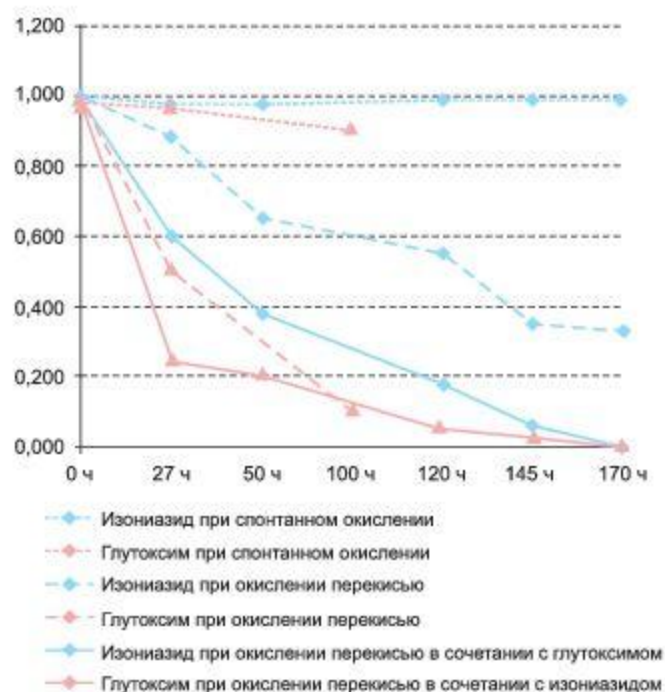


Рис. 3 Изменения концентраций изониазида и глутоксима при различных условиях окисления.

По оси абсцисс – время в часах, по оси ординат – концентрация в мМ

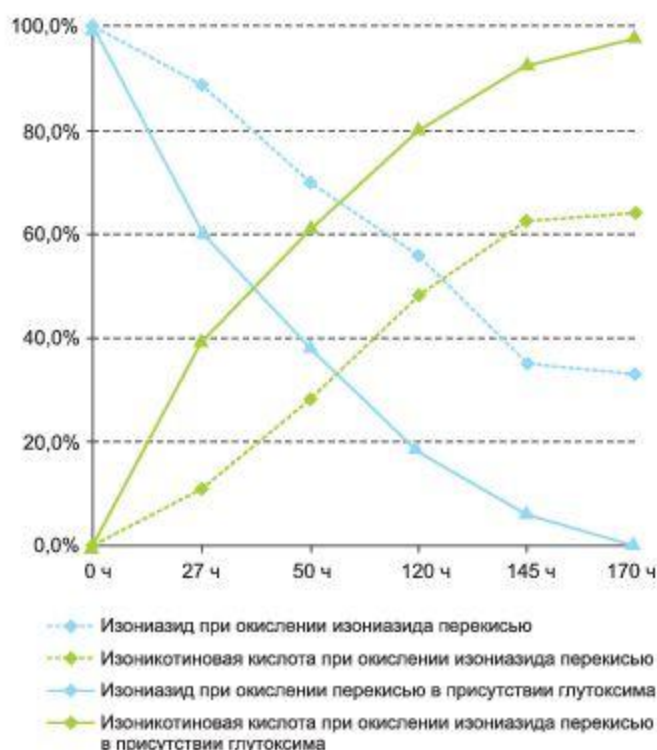


Рис. 4. Динамика трансформации изониазида в изоникотиновую кислоту

По оси абсцисс — время в часах, по оси ординат содержание реагентов в реакционной смеси в процентах от суммарного содержания изониазида и изоникотиновой кислоты в реакционной смеси

через 100 ч инкубации при 37°C. Изониазид в этих условиях проявляет большую стабильность (рис. 3). Трансформация части изониазида в изоникотиновую кислоту (*in vitro* конечным продуктом реакции является изоникотиновая кислота) завершается примерно за это же время, несмотря на присутствие перекиси водорода в реакционной смеси.

Таким образом, окисление изониазида до изоникотиновой кислоты возможно, но подчиняется определенным ограничениям: реакция не проходит до полного окисления изониазида. Иными словами, существуют определенные критические концентрации изониазида и/или перекиси водорода, ниже которых реакция останавливается. В химии один из приемов, используемых для получения большего количества продуктов таких реакций, — это увеличение исходной концентрации реагирующих веществ. В клинической практике использования изониазида при лечении различных форм туберкулеза прибегают к увеличению дозы изониазида, что позволяет добиваться антибактериального эффекта. Полученные в модельном эксперименте данные указывают на то, что при воздействии изониазида на устойчивые к изониазиду *M. tuberculosis* (мутации в гене *katG*) лишь часть изониазида будет трансформироваться в активную форму. Чтобы увеличить выход актив-

ной формы изониазида необходимо значительно увеличивать дозу вводимого пациенту препарата. Однако это сопряжено с комплексом серьезных побочных реакций, ограничивающих такой терапевтический подход.

В реакционной среде, включающей перекись водорода, глутоксим и изониазид, последний претерпевал полную трансформацию в изоникотиновую кислоту, что выражалось в уменьшении его концентрации в реакционной смеси практически до нулевых значений (рис. 4). Эти изменения идут с более высокой скоростью в присутствии глутоксима, в сравнении с окислением изониазида перекисью водорода. Полученный результат указывает на то, что глутоксим способен обеспечить возможность полного перевода изониазида в его активную форму. Применительно к результатам бактериологических исследований такой эффект объясняет снижение МИК изониазида в случае лекарственных-устойчивых форм *M. tuberculosis* с мутациями в гене *katG*.

Хромато-масс-спектроскопический анализ продуктов окисления изониазида перекисью водорода в присутствии глутоксима выявил в реакционной среде три ключевых соединения, с которыми связывают фармакологическую активность изониазида — изоникотинамид, образующийся в результате разрыва связи азот-азот гидразидной группы изониазида; ацильный радикал и ацильный катион (*in vitro* конечным продуктом реакции является изоникотиновая кислота) (рис. 5). Задача обнаружения радикалов азота в реакционной смеси не была поставлена, но теоретически они являются промежуточным продуктом реакции.

Образование изоникотинамида в реакции окисления изониазида (рис. 5) является косвенным свидетельством того, что в реакции образуются активные формы азота (АФА). АФА могут определять бактерицидный эффект изониазида в дополнение к его бактериостатическому действию, обусловленному ингибированием синтеза миколовых кислот при участии ацильного радикала. Косвенным подтверждением образования АФА являются результаты бактериологических исследований.

Мутации в гене *inhA* обеспечивают устойчивость *M. tuberculosis* к изониазиду за счет изменений свойств синтазы жирных кислот, которая становится нечувствительной к ингибирующему воздействию комплекса ацильного радикала и НАД. Данные о снижении МИК изониазида при сочетанном с глутоксимом воздействии на штаммы 5307 с мутацией *inhA* (T15) и штамм 2067 с мутацией *ahpC* (T9) свидетельствуют о том, что повышение антимикобактериальной активности связано, скорее всего, с образованием АФА. Этим же механизмом (в дополнение к основному) можно объяснить повышение эффективности изониазида в 2 раза при сочетанном с глутоксимом

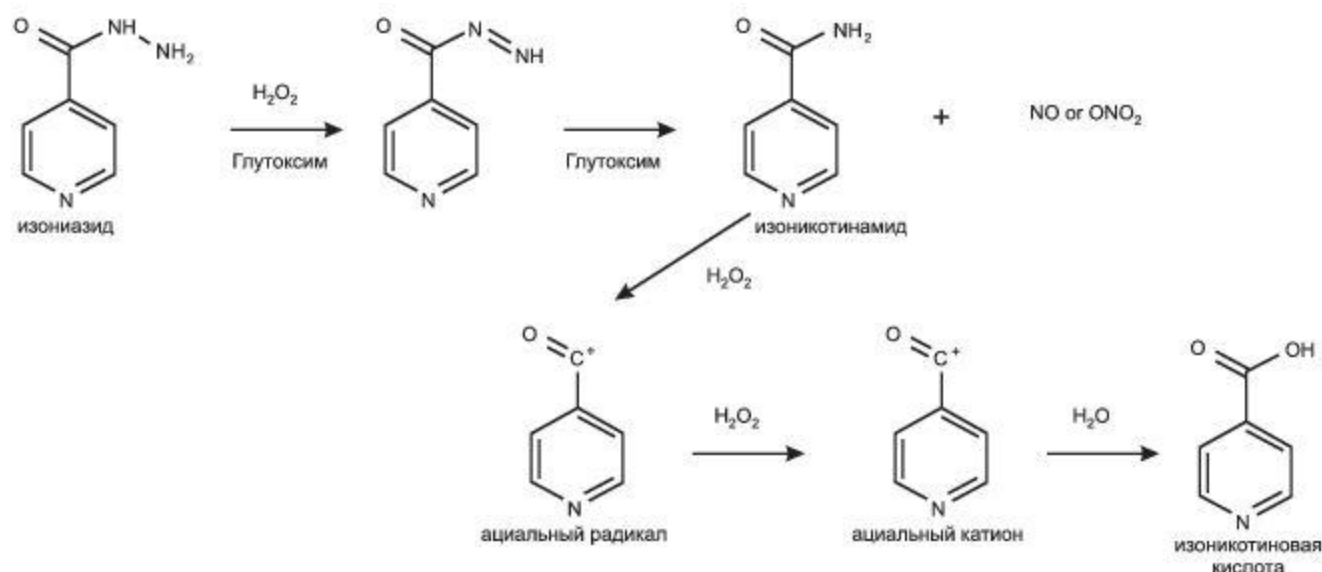


Рис. 5. Реакция окисления изониазида перекисью водорода в присутствии глутоксима

воздействию на штамм 2712, несущего в геноме мутации *katG* (Ser315→Thr), *katG* (Ile335→Val), *ahpC* (T10), комплекс которых, вероятно, и обеспечивает высокую степень устойчивости штамма к изониазиду (20 мкг/мл).

Таким образом, полученные экспериментальные данные указывают на то, что при воздействии на лекарственно-устойчивые штаммы *M. tuberculosis* (мутация в гене *katG*) глутоксим способен обеспечить полноту трансформации изониазида в активную форму – ацильный радикал, который образуется независимо от активности фермента каталаза-пероксидаза. Эффект препарата – потенцирование бактерицидного действия изониазида – может быть также усилен образованием АФА, что теоретически объясняет его эффект в отношении штаммов *M. tuberculosis* с мутациями в гене *inhA* и с комплексом мутаций, а также отмеченное в эксперименте [4] и клинической практике многократное усиление эффективности изониазида [6]. Подобный характер активности глутоксима при сочетанном применении с изониазидом позволяет избежать высоких доз изониазида при лечении различных форм туберкулеза и, соответственно, обусловленных этим побочных реакций.

Антибиотические адьюванты – новый термин, относящийся к стратегии лечения комбинациями препаратов, использования синергических эффектов антибиотиков и неантибиотических препаратов (например, пенициллинов и клавулановой кислоты, антибиотиков грамотрицательного спектра действия и лоперамида), применения препаратов, преодолевающих лекарственную устойчивость или изменяющих физиологию резистентных микроорганизмов, например препятствующих образованию биопленок [7, 8, 10]. Глутоксим, не обладающий

антимикобактериальной активностью и при этом способный усиливать противомикробный эффект изониазида, по своим характеристикам подпадает под дефиницию антибиотического адьюванта.

Заключение

Глутоксим – инновационный препарат, обладающий способностью в низких концентрациях (3,1-12,5 мкг/мл) усиливать в 1,6-2,0 раза антимикобактериальную активность изониазида в отношении как лекарственно-устойчивых к препарату клинических штаммов *M. tuberculosis* с мутациями в гене *katG* (Ser315→Thr; Ile335→Val), *ahpC* (T9, T10), *inhA* (T15), так и чувствительного музейного штамма H37Rv, при этом глутоксим в концентрациях 1,6-100 мкг/мл не влиял на рост *M. tuberculosis*. Модельный эксперимент с реакционной смесью доказал способность глутоксима обеспечивать полноту трансформации изониазида (при окислении его перекисью водорода) в активную форму – ацильный радикал, что может объяснить изониазид-потенцирующую активность глутоксима в отношении штаммов *M. tuberculosis* с мутациями в гене *katG*. Способность глутоксима усиливать антимикобактериальную активность изониазида в отношении штаммов *M. tuberculosis* с мутациями в генах *ahpC* и *inhA*, вероятно, обусловлена бактерицидным эффектом АФА, являющихся промежуточными продуктами реакции окисления изониазида.

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет отнести глутоксим к группе антибиотических адьювантов – соединений, усиливающих действие антимикробных препаратов (изониазида), использование которых является новым направлением в лечении туберкулеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ангушевич А. Е., Антонов В. Г., Василешко К. П. и др. Возможный механизм устранения антибиотикорезистентности микобактерий туберкулеза препаратом Глутоксим: Материалы первого всероссийского научного форума «Инновационные технологии медицины XXI в.». – 2005. – С. 405-407.
2. Васильева С. Н. Экспериментальное обоснование использования Глутоксима в качестве средства сопровождения этиотропной терапии генерализованного туберкулеза легких: Автореф. дис. ... канд. мед. наук – СПб., 2004. – 24 с.
3. Дымова М. А., Храпов Е. А., Филипенко М. Л. Лекарственная устойчивость у *Mycobacterium tuberculosis*: молекулярные аспекты // Лаб. медицина. – 2012-2013. – Т. 1-2, № 4. – С. 41-46.
4. Куничан А. Д., Соколова Г. Б., Сишцын М. В. и др. Влияние Глутоксима на рост лекарственно-резистентных микобактерий туберкулеза и на активность основных противотуберкулезных препаратов в культуре легочной ткани // Бол. цел. ж. о туберкулезе. – 2002. – № 15. – С. 22-24.
5. Сишцын М. В., Богадельникова И. В., Перельман М. И. Глутоксим – 10 лет во фтизиатрии (опыт применения при лечении туберкулеза) // Туб. – 2010. – № 10. – С. 3-10.
6. Соколова Г. Б., Сишцын М. В., Кожемякин Л. А., Перельман М. И. Глутоксим в комплексной терапии туберкулеза // Антибиотики и химиотерапия. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 20-23.
7. Bernal P., Molina-Santiago C., Daddaoua A. et al. Antibiotic adjuvants: identification and clinical use // Microbial biotechnology. – 2013. – Vol. 6. – P. 445-449 doi/10.1111/1751-7915.12044/pdf.
8. Kalan L., Wright G. D. Antibiotic adjuvants: multicomponent anti-infective strategies // Expert. Rev. Mol. Med. – 2011. – Vol. 13: e5 doi: 10.1017/S1462399410001766.
9. Orhan G., Bayram A., Zer Y. et al. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucellamelitensis* // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 4, № 1. – P. 140-143 doi10.1128/JCM.43.1.140-143.
10. Pieren M., Tigges M. Adjuvant strategies for potentiation of antibiotics to overcome antimicrobial resistance // Curr. Opin. Pharmacol. – 2012. – Vol. 12. – P. 551-555 http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2012.07.005
11. Zhang Y., Yew W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2009. – Vol. 13, № 11. – P. 1320-1330.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Матичева Ольга Алексеевна

Санкт-Петербургский НИИ фтизиатрии и пульмонологии

Минздрава РФ,

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник.

194064, г. Санкт-Петербург, Политехническая улица, д. 32.

Тел. 297-86-31.

E-mail: olgamaricheva@ambler.ru

Поступила 11.06.2014