

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ  
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Диссертационный совет Д 03.10.418

На правах рукописи  
УДК 615.015.21

**ЛЕОНОВА НАДЕЖДА ВАСИЛЬЕВНА**

**СИНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НОВОГО АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО  
ПРЕПАРАТА «ФС-1» С АНТИБИОТИКАМИ ШИРОКОГО СПЕКТРА  
ДЕЙСТВИЯ**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнология)

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Бишкек – 2012

Работа выполнена в РГП «Научный центр противомикробных препаратов» Министерства Индустрии и новых технологий Республики Казахстан

**Научный руководитель:** доктор ветеринарных наук, профессор  
**Керимжанова Бахытжан Фазылжановна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Грязнева Татьяна Николаевна**  
кандидат биологических наук  
**Джангалина Эрика Димашевна**

**Ведущая организация:** Кыргызский национальный аграрный университет  
имени К.И. Скрябина

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2012 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 03.10.418 Института биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики по адресу: 720071, Кыргызская Республика, г. Бишкек, проспект Чуй, 265.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Национальной академии наук Кыргызской Республики по адресу: г. Бишкек, проспект Чуй, 265а.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Корчубекова Т.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Антибактериальные препараты занимают в настоящее время одну из важных частей лекарственного арсенала. Однако широкое внедрение антибиотиков в медицинскую и ветеринарную практику привело к тому, что у микроорганизмов сформировались разнообразные механизмы устойчивости, нейтрализующие или снижающие действия антибиотиков [Чернуха М.Ю., 2000; Белобородова Н.В., 2003]. Массивный антибактериальный прессинг является селективирующим фактором и способствует быстрому распространению устойчивости среди микроорганизмов [Saurina G, 2000; Карабак В.И, 2000].

Увеличение удельного веса инфекционных заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами или их ассоциациями, характеризуются выраженным клиническим полиморфизмом, связанным с одновременным воздействием нескольких агентов, что затрудняет интерпретацию результатов, поскольку каждый из возбудителей обладает рядом характеристик, сочетание которых может определять высокий биотический потенциал возбудителей в целом [Габидуллин З.Г., 2006].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) устойчивость к медикаментам первого ряда у патогенных микроорганизмов, вызывающих заболевания, колеблется от нуля почти до 100 %. В некоторых случаях устойчивость к веществам второго и третьего ряда подвергает серьезному риску исхода заболевания [ВОЗ, 2001; ВОЗ, 2010].

Снижение эффективности антимикробной терапии, обусловленное формированием и широким распространением полирезистентных штаммов - возбудителей инфекционных заболеваний, является предпосылкой для разработки новых и эффективных, сохраняющих высокую противомикробную активность, но лишенных побочных действий антимикробных препаратов.

Одним из приоритетных направлений для решения этой сложной задачи является работа по созданию препаратов йода нового поколения. Способность йода с лёгкостью проникать через клеточные мембраны делает его применение особо ценным и при тех инфекциях, основное развитие которых разворачивается во внутриклеточных структурах (туберкулеза, бруцеллёз, хламидиоз и т.д.) [Абраамян А.Г, 2009].

Решению этой задачи посвящен целый цикл научных исследований, проводимых в РГП «Научный центр противомикробных препаратов». Научные изыскания в решении данных вопросов были направлены на создание антибактериальных агентов, представляющих собой ионные наноструктурированные комплексы, образованные полипептидами, карбогидратами, солями щелочных и щелочноземельных металлов интеркалированные йодом.

Настоящая работа посвящена изучению антибактериального действия ионных наноструктурированных комплексов в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

**Связь темы диссертации с крупными программами, основными научно-исследовательскими работами, проводимыми научными учреждениями.** Работа выполнялась в рамках утвержденной Научно-технической программы «Разработка новых противомикробных препаратов» на период 2004-2011 годы согласно Постановлению Правительства Республики Казахстан от 25.06.2004г. за № 703 «Некоторые вопросы разработки новых противомикробных препаратов».

**Цель и основные задачи исследования.** Целью настоящего исследования является определение антибактериального действия ионных наноструктурированных комплексов в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Изучить антибактериальное действие ионных наноструктурированных комплексов в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

2. Определить антимикробную активность наиболее эффективных ионных наноструктурированных комплексов с антибиотиками в отношении метициллин-резистентных и метициллин-чувствительных штаммов *Staphylococcus aureus*.

3. Изучить антибактериальную активность наиболее эффективных ионных наноструктурированных комплексов в отношении возбудителей туберкулеза в опытах *in vitro* и *in vivo*.

**Научная новизна.** Впервые установлена антимикробная активность ионных наноструктурированных комплексов в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, устойчивых к одному или нескольким антибактериальным препаратам.

Выявлено повышение чувствительности микробных клеток к антибиотикам под действием препарата ФС-1.

Впервые установлен синергетический эффект препарата ФС-1 с широко используемыми антибиотиками на модели референтного полирезистентного штамма *Staphylococcus aureus*.

Впервые показано, на модели экспериментального туберкулеза, что препарат ФС-1 проявляет терапевтическую эффективность при монотерапии и выраженный синергетический эффект при комбинированном применении с противотуберкулезным препаратом.

Установлено, что препарат ФС-1 препятствует развитию туберкулезного воспаления в паренхиматозных органах и способствует восстановлению их функции.

**Практическая значимость.** Выявленный эффект синергизма препарата ФС-1 с широко используемыми антибиотиками снижает лечебную дозу каждого компонента в сочетании и улучшает переносимость антибиотика, что особенно существенно при длительном курсе терапии.

Высокий эффект синергизма позволяет исключить низкую эффективность монотерапии.

Полученные результаты явились основанием для составления заявки на изобретение: «Антибактериальный агент для лечения инфекционных

заболеваний бактериальной природы», на которое получено положительное решение формальной экспертизы от 12.12.2011 за № 031421.

Результаты данной работы легли в основу доклинического досье и явились обоснованием проведения клинических испытаний препарата ФС-1 в Республике Казахстан. Препарат ФС-1 в настоящее время проходит II фазу клинических испытаний.

Результаты проявления синергизма препарата ФС-1 с широко используемыми антибиотиками вошли в курс лекций учебного процесса по терапии инфекционных болезней.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Определен спектр антибактериальной активности ионных наноструктурированных комплексов в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов *in vitro*.

2. Выявлен синергетический эффект препарата ФС-1 с антибиотиками широкого спектра действия на метициллин-резистентном штамме *Staphylococcus aureus*.

3. Установлено повышение терапевтической эффективности при комбинированном применении препарата ФС-1 с противотуберкулезным препаратом.

**Личное участие автора.** Все основные разделы представленной работы выполнены автором лично.

**Апробация работы.** Основные положения работы доложены и обсуждены на Научных Советах в РГП «Научный центр противоинфекционных препаратов» (2006 – 2011 гг), первом международном конгрессе студентов и молодых ученых «Мир науки» (Алматы, 2007), втором международном конгрессе студентов и молодых ученых «Мир науки» (Алматы, 2008), Международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности НЦИ МОН РК «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития» (Алматы, 2008), VI международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2009), расширенном совещании кафедры биотехнологии и биологии Кыргызского Национального аграрного университета им. К.И. Скрябина МОН КР (Бишкек, 2012).

#### **Полнота отражений результатов диссертации в публикациях.**

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 9 статей.

**Структура и объем и диссертации.** Диссертация изложена на 142 страницах компьютерного текста, содержит 40 рисунков, 33 таблицы. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы собственных исследований, выводов, списка использованной литературы, включающего 167 источника и приложения.

#### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Глава 1.** В первой главе приведен обзор литературы по теме диссертации.

**Глава 2.** Изложены материалы и методы исследования.

Объектами исследования служили ионные наноструктурированные комплексы (ИНСК), образованные полипептидами, карбогидратами, солями щелочных и щелочноземельных металлов интеркалированные йодом.

В работе были применены микробиологические, биохимические, серологические, патологоанатомические, гистологические методы.

Математическую обработку результатов и графическое представление числовых экспериментальных данных осуществляли с помощью стандартного пакета статистических программ Microsoft Office Excel.

### Глава 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение.

#### Изучение антибактериального действия ИНСК в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов

Скрининг по изучению антимикробной активности 60 ИНСК осуществляли на музейном штамме *S.aureus* ATCC 6538-Р и клинических изолятах: *E.coli* O<sub>55</sub> № 12, *S.aureus* № 3, *P.aeruginosa* № 4/32.

Каждое ИНСК тестировали в следующих концентрациях: 1000 мкг/мл, 500 мкг/мл, 250 мкг/мл, 125 мкг/мл, 63 мкг/мл, 31 мкг/мл, 16 мкг/мл и 8 мкг/мл. Полученные результаты в виде диаграмм представлены на рисунках 1-6.

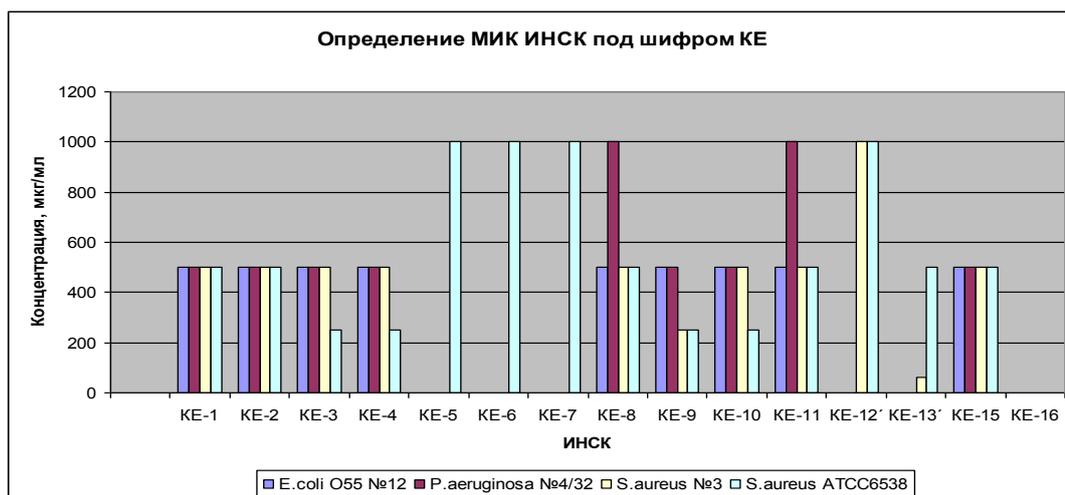


Рис. 1 Сравнительная антибактериальная активность ИНСК КЕ

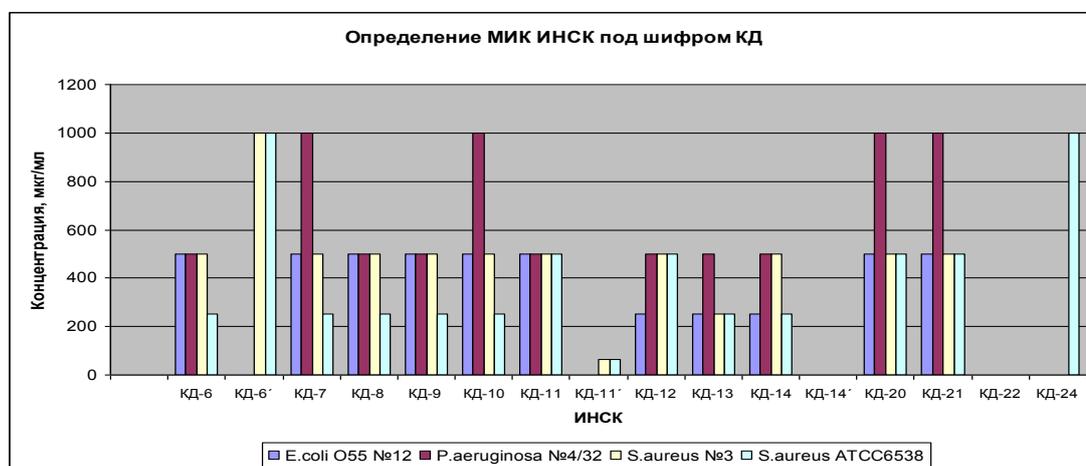
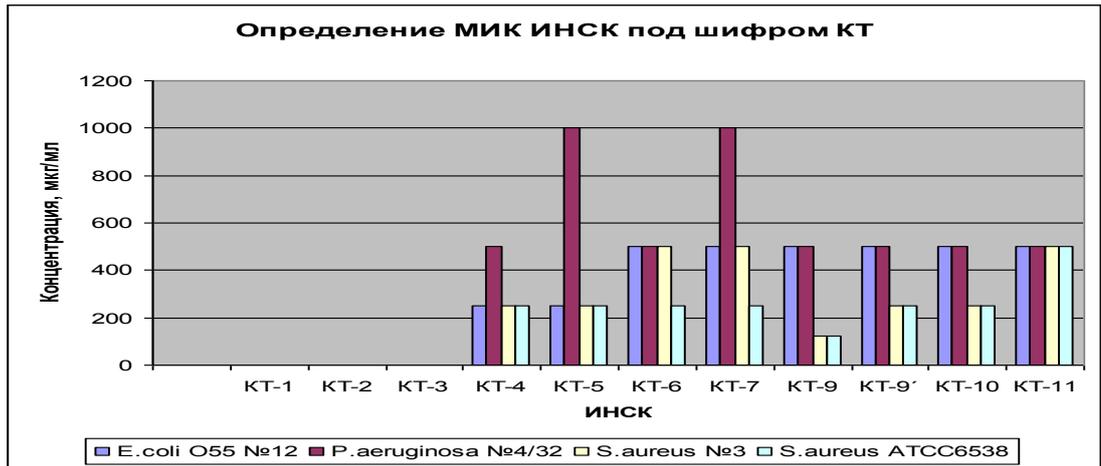
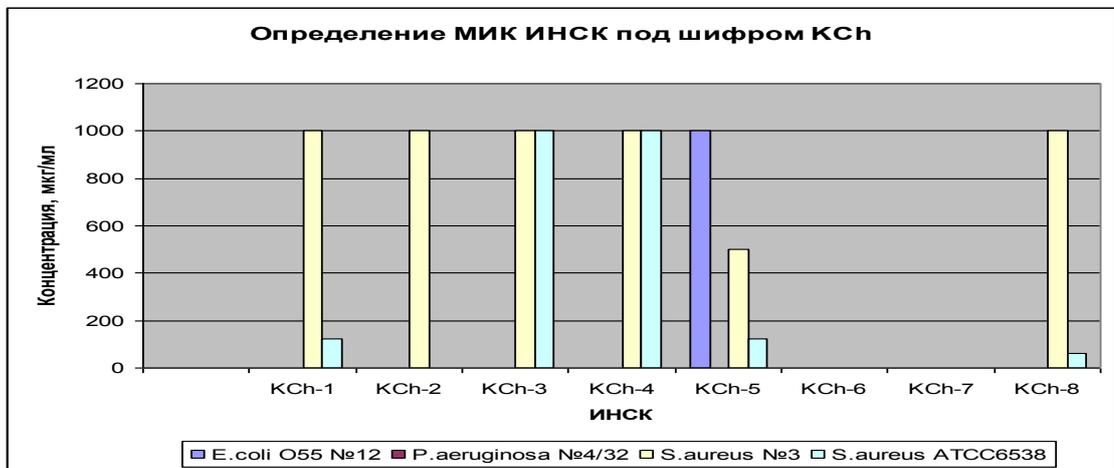


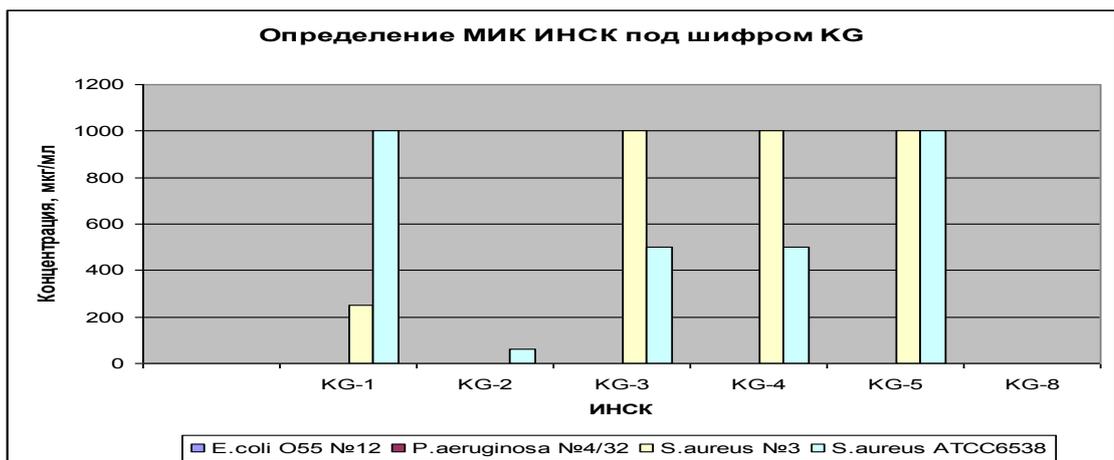
Рис. 2 Сравнительная антибактериальная активность ИНСК КД



**Рис. 3** Сравнительная антибактериальная активность ИНСК КТ



**Рис. 4** Сравнительная антибактериальная активность ИНСК КСч



**Рис. 5** Сравнительная антибактериальная активность ИНСК КГ

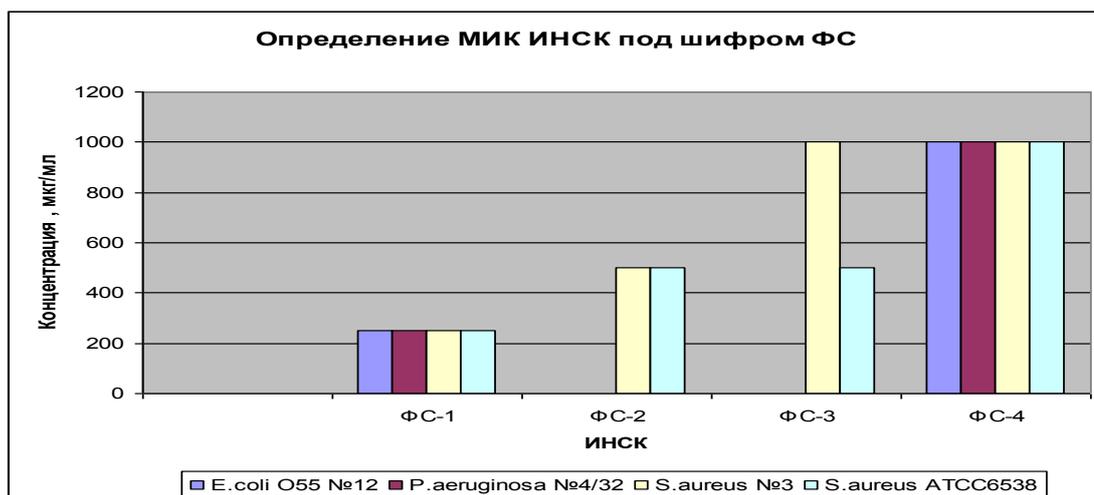


Рис. 6 Сравнительная антибактериальная активность ИНСК ФС

Проведенные скрининговые исследования *in vitro* показали, что из 60-ти ИНСК у 35 выявлена антимикробная активность в концентрации от 500 мкг/мл до 63 мкг/мл. При этом антимикробная активность проявлялась как к музейному штамму *S. aureus* ATCC 6538, так и к клиническим изолятам *E. coli* O<sub>55</sub> №12, *P. aeruginosa* №4/32, *S. aureus* №3.

Активность в исходном разведении (1000 мкг/мл) к разным штаммам зафиксирована у 13 ИНСК: KE-12', КД-6', КCh-1, КCh-2, КCh-3, КCh-4, КCh-8, KG-3, KG-4, KG-5, ФС-2, ФС-3, ФС-4.

Отсутствие антимикробной активности в исходном виде с концентрацией 1000 мкг/мл ко всем культурам, как к музейному штамму, так и к клиническим изолятам, выявлено у 12 ИНСК из 60, а именно у KE-5, KE-6, KE-7, KE-16, КД-22, КД-24, КТ-1, КТ-2, КТ-3, КCh-6, КCh-7, KG-2.

Согласно руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, для дальнейших исследований могут быть рекомендованы ИНСК с МИК ниже 1000 мкг/мл [Хабриев Р.У., 2005]. Исходя из этого, нами были исключены 25 ИНСК из дальнейших исследований.

### Изучение фенотипических свойств у исследуемых микроорганизмов

Для характеристики биологических особенностей штаммов были использованы следующие методики: изучение тинкториальных, культуральных и биохимических свойств в зависимости от родовой принадлежности, а так же антигенной структуры.

При изучении морфологических свойств у исследуемых микроорганизмов установлены изменения только у *S. aureus*. После обработки 34 из 35 ИНСК штамм менял свое типичное морфологическое расположение на небольшие скопления или в виде отдельных клеток. Тогда как 1 ИНСК - ФС-1 не оказывал влияние на морфологию *S. aureus*.

Культуральные модификации наблюдались у штаммов *S. aureus* № 3, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* O<sub>55</sub> № 12, у *P. aeruginosa* № 4/32 после воздействия

ИНСК, проявившиеся в исчезновении гемолитической активности. Изменение гемолитической активности косвенно свидетельствует о снижении вирулентности штаммов, т.к. гемолизины, обуславливающие гемолиз эритроцитов, являются экзотоксинами микробных клеток.

У культуры *S. aureus* наблюдалось ещё одно изменившееся свойство – более раннее (по времени) проявление лецитовителлазной активности на желточно-солевом агаре. До воздействия ИНСК на данный штамм проявление лецитовителлазной активности регистрировалось через 58 часов, то после обработки время регистрации составило 17-48 часов, т.е. в 1,2-3,5 раза быстрее. Ускорение реакции дает возможность говорить о влиянии ИНСК на метаболические процессы, приводящие к снижению патогенных свойств возбудителей.

При изучении действия соединения КД-20 на *E. coli* O55 № 12 было выявлено изменение цвета колоний, что указывает на замедленную ферментацию лактозы. Данный факт позволяет предположить, что штамм *E. coli* O55 № 12 становится более уязвимым к воздействию представителей аутофлоры *in vivo*.

При оценке биохимической активности у штамма *P. aeruginosa* № 4/32 не установлено изменений. У штамма *E. coli* O55 № 12 в ходе исследования отмечены следующие изменения: появление способности ферментации дульцита, дезаминирования мочевины, декарбоксилирования аргинина и потерю ферментации триптофана, сахарозы, трегалозы, сорбитола. У штаммов *S. aureus* происходит выраженное замедление сроков проявления реакции плазмокоагуляции до 18 раз.

Полученные результаты указывают, что данные признаки приводят к резкому снижению степени вирулентности штаммов, т.е. патогенных свойств возбудителей.

### **Определение факторов естественной резистентности у исследуемых клинических изолятов**

В ходе проведения исследований по определению факторов естественной резистентности у клинических изолятов под воздействием КЕ-4, КЕ-11, КЕ-13, ФС-1, КД-7, КТ-9, КТ-11, КГ-8 было установлено уменьшение среднего показателя адгезии (СПА), что определяет снижение абсорбции патогена на поверхности клеток-мишеней, тем самым ослабляется звено в развитии инфекционного процесса.

Определена антилизосимная активность (АЛА) у всех клинических изолятов, которая участвует в защите патогена в условиях его внутриклеточного паразитирования. Следует выделить КЕ-1, КЕ-2, КЕ-3 и ФС-1, которые действуют на бактериальные механизмы ингибирования лизоцима, за счет чего значения АЛА снижаются. Данный факт свидетельствует о припятствии колонизации макроорганизма, бактерицидном влиянии на возбудителя и снижении развития инфекционного процесса в организме. Таким образом, на основании проведенных исследований, показано, что только препарат ФС-1 приводит к совместному снижению СПА и АЛА.

Суммируя полученные результаты культурально-морфологических, биохимических свойств и факторов естественной резистентности, установлено, что воздействие ФС-1 на клинические штаммы приводит к исчезновению гемолитической активности, удлинению реакции плазмокоагуляции, снижению факторов естественной резистентности, что свидетельствует о потере вирулентности у культур, приводящей к купированию инфекционного процесса в организме. Это послужило основанием заключить, что ионный наноструктурированный комплекс ФС-1 может проявить себя как фармацевтическое антибактериальное средство нового поколения.

### **Изучение влияния препарата ФС-1 на метициллин-резистентные и метициллин-чувствительные штаммы *Staphylococcus aureus* в комбинации с антибактериальными препаратами**

Проведенные скрининговые исследования по определению устойчивости к оксациллину/метициллину установили, что из 114 клинических изолятов *S. aureus* 58 штаммов относятся к метициллин-резистентным штаммам (MRSA), а 56 штаммов - к метициллин-чувствительным (MSSA).

При определении антимикробной активности препарата ФС-1 установлена, его бактериостатическая и бактерицидная активность как против изолятов MSSA, так и против изолятов MRSA. При этом минимальная бактериостатическая активность была зафиксирована при концентрации 620 мкг/мл. Наибольшая антибактериальная активность составляла 2540 мкг/мл, хотя для подавляющего числа протестированных стафилококковых штаммов минимальная бактериостатическая активность проявилась в концентрации 1270 мкг/мл. При сравнении метициллин-резистентных и метициллин-чувствительных клинических изолятов установлено, что у 45 (77,6 %) штаммов MRSA минимальная бактериостатическая активность выявлена в концентрации 1270 мкг/мл против 51 (88 %) штаммов MSSA. Бактерицидная активность установлена в концентрациях 2540 мкг/мл для 13 (22,4 %) штаммов MRSA и 28 (50,0 %) штаммов MSSA и 1270 мкг/мл для 45 (77,6 %) штаммов MRSA и 28 (50,0 %) штаммов MSSA (таблица 1).

**Таблица 1** - Суммарная характеристика бактериостатической и бактерицидной активности препарата ФС-1 при воздействии на *S. aureus*

Концентрация ФС-1, мкг/мл	Минимальная бактериостатическая активность		Минимальная бактерицидная активность	
	Количество изолятов (абсолютное количество, %)			
	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA
2540	2 (3,4 %)	2 (3,6 %)	13 (22,4 %)	28 (50,0 %)
1270	45 (77,6 %)	51 (91,0 %)	45 (77,6 %)	28 (50,0 %)
620	11 (19,0 %)	3 (5,4 %)	-	-

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) препарата ФС-1 варьировала в пределах 2540 - 1270 мкг/мл (таблица 2). Причем ФС-1 в равной степени был эффективен как в отношении музейных культур, так и клинических изолятов, в том числе резистентных.

**Таблица 2** – Минимальная ингибирующая концентрация препарата ФС-1 при воздействии на стафилококковые клинические изоляты в сравнении с референтными штаммам

<b>Бактериальные штаммы</b>	<b>Разброс МИК ФС-1, мкг/мл</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	2540
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (MSSA)	2540
MRSA n=58	2540 - 1270
MSSA n=56	2540 - 1270

Таким образом, препарат ФС-1 обладает выраженным антимикробным действием и проявляет одинаковую эффективность в отношении референтных и клинических штаммов MSSA и MRSA.

Следующий этап нашего исследования заключался в изучении противомикробной активности препарата ФС-1 в комбинации с антибиотиками и оценки возможного синергетического действия на модели референтного метициллин-резистентного штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Для первой серии эксперимента был выбран ванкомицин (гликопептид), как антибиотик, используемый при лечении инфекций вызванных MRSA. Для тестирования использованы концентрации ванкомицина от 0,125 мкг/мл до 8 мкг/мл и ФС-1 в концентрациях: от 310 мкг/мл до 5080 мкг/мл.

Для второй серии опытов был выбран бета-лактамный антибиотик, к которому MRSA устойчивы – цефамандол (цефалоспорин второго поколения) в концентрациях от 0,125 мкг/мл до 128 мкг/мл и ФС-1 в концентрациях: от 310 мкг/мл до 5080 мкг/мл.

Для третьей серии опытов был выбран препарат группы хинолонов – ципрофлоксацин (хинолон) в концентрациях от 0,015 мкг/мл до 8 мкг/мл и ФС-1 в концентрациях: от 310 мкг/мл до 5080 мкг/мл.

Для четвертой серии опытов был выбран бета-лактамный антибиотик, к которому MRSA устойчивы – оксациллин (пенициллиназа-устойчивый пенициллин) в концентрациях от 0,25 мкг/мл до 1024 мкг/мл и ФС-1 в концентрациях: от 310 мкг/мл до 5080 мкг/мл.

Для пятой серии опыта был выбран антибиотик группы линкозамидов - линкомицин в концентрациях от 0,03 мкг/мл до 8 мкг/мл и ФС-1 в тех же концентрациях, что и в предыдущих опытах.

Обобщенные результаты экспериментов представлены в таблице 3.

**Таблица 3** – Комбинированное действие препарата ФС-1 и антибиотиков на модели *S. aureus* ATCC 43300

Тестируемая комбинация	МИК при отдельном тестировании, мкг/мл	МИК при совместном тестировании, мкг/мл	Снижение МИК, в раз
ФС-1 / ванкомицин	2540/2	1270/2	2/-
ФС-1 / цефамандол	2540/64	1270/8	2/8
ФС-1 / ципрофлоксацин	2540/2	2540/2	-/-
ФС-1 / оксациллин	2540/256	1270/64	2/4
ФС-1 / линкомицин	2540/2	2540/2	-/-

В таблице 3 показаны результаты тестов по изучению совместного действия. Установлено, что при комбинированном применении препарата ФС-1 и бета-лактамовых антибиотиков (на примере оксациллина), а также цефалоспоринов II поколения (на примере цефамандола) проявляется синергетический эффект в отношении метициллин-резистентного штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Совместное использование препарата ФС-1 и гликопептидов (на примере ванкомицина), а также хинолонов (на примере ципрофлоксацина) и линкозамидов (на примере линкомицина) приводит к индифферентности.

Таким образом, по результатам проведенных работ установлена антимикробная активность препарата ФС-1 к клиническим изолятам и контрольным референтным штаммам MRSA и MSSA. При совместном применении ФС-1 с оксациллином и ФС-1 с цефамандолом установлен эффект синергизма.

### **Оценка эффективности противотуберкулезного действия препарата ФС-1 в опытах *in vitro* и *in vivo***

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, устойчивый к пипразинамиду.

Антибактериальное действие препарата ФС-1 изучали по динамике роста микобактериальных штаммов в обогащенной жидкой среде в присутствии следующих концентраций: 3380 мкг/мл; 1840 мкг/мл; 1500 мкг/мл; 780 мкг/мл; 390 мкг/мл; 200 мкг/мл; 125 мкг/мл; 100 мкг/мл; 60 мкг/мл; 50 мкг/мл; 30 мкг/мл.

В качестве контроля использовали рост данных штаммов на среде, не содержащей ФС-1, а также на среде, содержащей препарат 1-го ряда изониазид в концентрации 0,1 мкг/мл.

Результаты исследования бактерицидной активности препарата ФС-1 по отношению к штаммам микобактерий туберкулеза представлены в таблицах 4-6.

**Таблица 4** - Бактерицидная активность препарата ФС-1 в отношении штамма *M. tuberculosis* H37Rv

Препарат – Концентрация, мкг/мл	Начало роста (сутки)	Начало плато (сутки)	Продолжительность фазы активного деления (сутки)
Без препарата	6,00	12,33	6,33
Изониазид - 0,1	Нет роста		
ФС-1 - 3380	Нет роста		
ФС-1 - 1840	Нет роста		
ФС-1 - 1500	Нет роста		
ФС-1 - 780	Нет роста		
ФС-1 - 390	Нет роста		
ФС-1 - 200	5,96	11,83	5,87
ФС-1 - 125	5,92	11,75	5,83
ФС-1 - 100	5,88	11,67	5,79
ФС-1 - 60	5,88	11,83	5,95
ФС-1 - 50	5,75	11,58	5,83
ФС-1 - 30	5,71	11,54	5,83

**Таблица 5** - Бактерицидная активность препарата ФС-1 в отношении штамма *M. bovis* An-2

Препарат – Концентрация, мкг/мл	Начало роста (сутки)	Начало плато (сутки)	Продолжительность фазы активного деления (сутки)
Без препарата	5,92	12,58	6,66
Изониазид - 0,1	Нет роста		
ФС-1 - 3380	Нет роста		
ФС-1 - 1840	Нет роста		
ФС-1 - 1500	Нет роста		
ФС-1 - 780	Нет роста		
ФС-1 - 390	Нет роста		
ФС-1 - 200	6,33	12,46	6,13
ФС-1 - 125	6,29	12,38	6,09
ФС-1 - 100	6,29	12,46	6,17
ФС-1 - 60	5,92	11,96	6,04
ФС-1 - 50	5,58	11,54	5,96
ФС-1 - 30	5,62	11,58	5,96

**Таблица 6** - Бактерицидная активность препарата ФС-1 в отношении штамма *M. tuberculosis* MS-115

Препарат – Концентрация, мкг/мл	Начало роста (сутки)	Начало плато (сутки)	Продолжительность фазы активного деления (сутки)
Без препарата	6,5	12,96	6,46
Изониазид - 0,1	6,42	12,71	6,29
ФС-1 - 3380	Нет роста		
ФС-1 - 1840	Нет роста		
ФС-1 - 1500	Нет роста		
ФС-1 - 780	Нет роста		
ФС-1 - 390	Нет роста		
ФС-1 - 200	6,83	13,04	6,21
ФС-1 - 125	6,63	12,79	6,16
ФС-1 - 100	6,63	12,79	6,16
ФС-1 - 60	6,46	12,58	6,12
ФС-1 - 50	6,38	12,46	6,08
ФС-1 - 30	6,42	12,54	6,12

Из представленных в таблицах 4-6 данных видно, что на протяжении всего срока исследования наблюдалось под воздействием ФС-1 полное подавление размножения микобактерий в диапазоне концентраций от 3380 мкг/мл до 390 мкг/мл включительно, независимо от вида возбудителя туберкулеза.

В остальных тестируемых концентрациях препарата ФС-1 рост культур начинался от 5,62 до 6,83 суток.

Культивирование *M. tuberculosis* H37Rv и *M. bovis* An-2 на среде с изониазидом показало отсутствие микобактериальных клеток на протяжении всего срока эксперимента, тогда как в отношении штамма с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* MS-115 активность изониазида не проявлялась и характеризовалась типичным ростом в среде.

Для изучения терапевтической эффективности препарата ФС-1 на модели экспериментального туберкулеза использовали 50 самок морских свинок-альбиносов, весом 300 – 350 г. Заражение животных осуществляли аэрогенным путем в дозе 150 колониеобразующих единиц (КОЕ) *M. tuberculosis* H37Rv на легкое. Лечение животных в опытных группах (2, 3 и 4) начинали через 14 дней после заражения. ФС-1 вводили в дозе из расчета 5 мг/кг, а изониазид – 10 мг/кг массы тела. В группе животных, получавших комбинированное лечение препаратом ФС-1 с изониазидом, антибиотик вводили через 30 минут после ФС-1. Через 1 месяц после заражения проводили анализ процесса инфицирования и лечения путем макроскопирования и гистологических исследований. Через 2,5 месяца все животные 5-ти групп были подвергнуты эвтаназии и патологоанатомическому вскрытию. Эффективность лечения в

опытных группах определяли по микробиологическим и гистологическим исследованиям.

Для определения количества микобактерий в легких у зараженных животных был произведен посев. Результаты высеваемости *M. tuberculosis* H37Rv представлены в таблице 7.

**Таблица 7** - Количество колониеобразующих единиц *M. tuberculosis* H37Rv из легких морских свинок через 2,5 месяца после заражения

Группа животных	КОЕ на легкое, (M±m)
Контрольные животные	$(8,5 \pm 0,22) \times 10^9$
Животные получавшие ФС-1	$(3,4 \pm 0,74) \times 10^7$
Животные получавшие изониазид	$(5,4 \pm 0,54) \times 10^4$
Животные получавшие изониазид+ФС-1	$(1,4 \pm 0,81) \times 10^4$

Согласно приведенным, в таблице 7 данным, количество высеваемых микобактерий из ткани легкого контрольной группы морских свинок было почти в 100 раз больше, чем у животных, получавших в течение 2 месяцев монотерапию препаратом ФС-1. У животных, получавших в аналогичный период изониазид и изониазид совместно с ФС-1, микобактерий в легком обнаружено на пять порядков меньше, чем у животных контрольной группы.

Гистологическими исследованиями у морских свинок контрольной (1-ой) группы установлены в легких множественные очаги казеозного некроза различных размеров, окруженные специфической грануляционной тканью, ограниченной по периферии тонкой фиброзной капсулой. Стенки бронхов всех генераций утолщены за счет отека, инфильтрации клеточными элементами воспаления; просветы сужены, содержат клетки слущенного эпителия и нейтрофильные лейкоциты (НЛ), участки внутриальвеолярного отека, кровоизлияния, зоны дистелектаза. Легочная ткань у таких животных сохраняет воздушность не более чем на 30-35 % площади среза. Межалвеолярные перегородки значительно утолщены за счет кровенаполнения, отека, обширной инфильтрации моно- и полинуклеарами. Кровеносные сосуды с признаками стаза, в просветах определяются НЛ. В печени имеют место периваскулярные инфильтраты со значительным количеством НЛ, формирующих микронекрозы. Гепатоциты с признаками выраженной белковой дистрофии, особенно в периваскулярных зонах. В селезенке фолликулярная гиперплазия сочетается с обеднением реактивных центров лимфоидными элементами. Сосуды всех генераций с выраженными признаками стаза, кровенаполнения, максимально выраженном в мозговом веществе. Паренхима органа неравномерно инфильтрирована клеточными элементами воспаления, среди которых встречается много НЛ, в том числе формирующих микронекрозы. У одного животного обнаружены отдельные очаги казеоза.

Таким образом, полученные результаты показывают, что через 2,5 месяца в организме аэрогенно зараженных контрольных животных за счет микобактериальной диссеминации развился прогрессирующий туберкулезный

процесс во всех паренхиматозных органах.

У инфицированных животных (2-я группа), получавших изониазид в течение эксперимента в легких очаги казеоза или другие признаки туберкулезного воспаления не выявлены, легочная паренхима имеет наиболее близкое к норме гистологическое строение, сохраняет воздушность до 90-95 % площади среза. Небольшие периваскулярные или перибронхиальные рыхлые инфильтраты с преобладанием мононуклеаров, небольшим числом НЛ, без микронекрозов, сохраняются у отдельных животных. Межальвеолярные перегородки несколько утолщены за счет умеренной инфильтрации мононуклеарами с примесью НЛ. Кровенаполнение менее выражено, чем в других группах. В печени сосуды расширены, сохраняются участки белковой дистрофии гепатоцитов, замещение их соединительной тканью. В селезенке в красной пульпе небольшие скопления клеточных элементов воспаления, в том числе НЛ.

В третьей экспериментальной группе животных, получавших монотерапию препаратом ФС-1, путем гистологических исследований установлено, что введение препарата на всем протяжении эксперимента оказало выраженное противотуберкулезное действие. Хотя очаги казеозного некроза в легких сохраняются, однако они единичны и меньших размеров, имеют более плотную организацию, в том числе зоны казеоза. На гистологических срезах в легких морских свинок, заметно сокращена площадь инфильтративных изменений, благодаря чему участки воздушной паренхимы составляют до 50-60 % площади среза. Определяются небольшие клеточные инфильтраты, содержащие НЛ. Вокруг бронхов формируется рыхлая соединительная ткань, много лимфоузлов. Изменения в печени и селезенке, характеризуются небольшими клеточными скоплениями с умеренным содержанием НЛ, инфильтративные изменения менее выражены, но имеются единичные очаги казеоза и микронекрозов. Количество фолликулов в селезенке намного меньше, чем в контроле, они имеют плотные центры.

У инфицированных морских свинок (4-я группа), получавших комплексную терапию препаратом ФС-1 совместно с изониазидом, изучение не выявило гистологических нарушений в строении паренхиматозных органов. Признаки туберкулезного воспаления так же не были выявлены. Легочная паренхима имеет нормальное гистологическое строение, сохраняет воздушность до 90-95 % площади среза. У отдельных животных межальвеолярные перегородки полнокровны, инфильтрированы мононуклеарами, среди которых определяются единичные эозинофильные лейкоциты. Имеются небольшие участки кровоизлияний. В печени и селезенке макрофагальные элементы образуют заметные периваскулярные скопления, в составе которых определяются клетки крови.

Таким образом, проведенные *in vivo* исследования на модели морских свинок показали, что препарат ФС-1 оказывает выраженное противовоспалительное действие на течение экспериментального туберкулеза. Повышает воздушность легочной паренхимы более, чем в два раза. В сочетании

с изониазидом препарат сохраняет свое действие и вызывает более заметное, чем при монотерапии, повышение проницаемости микроциркуляторного русла.

## ВЫВОДЫ

1. Ионные наноструктурированные комплексы (ИНСК) проявляют выраженную антибактериальную активность, одинаково подавляя рост как грамположительных, так и грамотрицательных условно-патогенных и патогенных бактерий. МИК антимикробной активности у 35 ИНСК проявлялась в концентрации от 500 мкг/мл до 63 мкг/мл как к референтным штаммам, так и к клиническим полирезистентным изолятам микроорганизмов.

2. Воздействие ионных наноструктурированных комплексов на исследуемые микроорганизмы оказывает выраженное влияние на их культурально-морфологические, биохимические свойства; снижает вирулентность возбудителя инфекции путем утери гемолитической активности и резкого замедления реакции плазмокоагуляции, а также ускоряет сроки лецитовителлазной активности, свидетельствующей о более раннем наступлении гибели микробной клетки.

3. Под воздействием ионных наноструктурированных комплексов у исследуемых микроорганизмов снижаются адгезивные и антилизоцимные свойства культур, что приводит к потере факторов резистентности и их вирулентности.

4. Впервые установлена бактерицидная активность ФС-1 на 114 метициллин-резистентных и метициллин-чувствительных штаммах *Staphylococcus aureus* как к клиническим изолятам, так и к референтным штаммам.

5. Комбинированное применение ФС-1 и бета-лактамов (на примере оксациллина), а также цефалоспоринов II поколения (на примере цефамандола) приводит к синергетическому эффекту в отношении метициллин-резистентного *S.aureus* ATCC 43300.

6. Впервые в опытах *in vitro* и *in vivo* установлена выраженная антибактериальная активность ФС-1 против музейных, клинических и эпизоотических штаммов возбудителей туберкулеза.

7. ФС-1 оказывает терапевтическую эффективность при монотерапии, и выраженный синергетический эффект при комбинированном применении с изониазидом на модели экспериментального туберкулеза. Установлено, что ФС-1 препятствует развитию туберкулезного воспаления в паренхиматозных органах и способствует быстрому восстановлению их функции.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Изучение антибактериального действия «ФС-1» на полирезистентные клинические изоляты [Текст] / [Скрынникова Н.В., Баймуратова М.А.] // Материалы первого международного конгресса студентов и молодых ученых «Мир науки». – Алматы, 2007. – С. 63.

2. Ұй қояндарындағы туберкулезді процеске ФС-1 препаратының әсері [Текст] / [Нұрымбетов К.Д., Плазун А.А., Искакбаева Ж.А., Енин Е.А., Леонова Н.В.] // Материалы второго международного конгресса студентов и молодых ученых «Мир науки». – Алматы, 2008. – С. 65-67.
3. Влияние ФС-1 на клинические и референсные штаммы *Staphylococcus aureus* [Текст] / [Н.В. Леонова, А.Б. Кудобаев, Д.Г. Нашев] // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности НЦИ МОН РК. Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития. – Алматы, 2008. – С. 279-280.
4. Изучение противотуберкулезной активности ФС-1 по отношению к *Mycobacterium tuberculosis H<sub>37</sub>Rv* [Текст] / [С.С. Касымбекова, Н.В. Леонова] // Сборник тезисов VI международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность». – Москва, 2009. – С.108-110.
5. К вопросу по изучению степени обсемененности и антибиотикорезистентности клинических изолятов [Текст] / [М.А. Баймуратова, Н.В. Леонова, Т.Б. Есенаманова, Г.А. Ислямова, Г.М. Маликова] // Гигиена, эпидемиология и иммунология. – 2010. - №1. - С. 153-155.
6. Изучение комплексообразующих свойств (N-метилглюкозамино-1-карбонотиоил)-4-бромбенз-амида и анти-бактериальная активность хелатного комплекса с сульфатом меди (2<sup>+</sup>) [Текст] / [Н.В. Леонова, И.В. Кулаков, А.И.Ильин, С.С. Касымбекова, Д.В.Баринов, О.В. Щукина] // IV Международная научная конференция молодых ученых «Инновационное развитие и востребованность науки в современном Казахстане». – Алматы, 2010. – С. 107-112.
7. Синтез и антибактериальная активность хелатного комплекса (n-метилглюкозамино-1-карбонотиоил)-4-бромбензамида с сульфатом меди (II) [Текст] / [Ильин А.И., Кулаков И.В., Леонова Н.В., Касымбекова С.С., Щукина О.В., Баринов Д.Ю.] // Журнал общей химии. - 2011. - Т.81.-№ 6. – С. 978-982.
8. Патоморфологическая характеристика действия препарата ФС-1 на течение туберкулеза в организме зараженных животных [Текст] / [Керимжанова Б.Ф., Ильин А.И., Леонова Н.В.] // Гигиена, эпидемиология и иммунология. – 2011. - №1. – С. 61-64.
9. Определение антибактериальной активности препарата ФС-1 на микобактерии туберкулеза в эксперименте *in vitro* [Текст] / [Ильин А.И., Керимжанова Б.Ф., Леонова Н.В.] // Известия НАН РК Серия Биологическая и Медицинская. – 2011. -Т.4. -№286. – С. 26-35.
10. Изучение факторов естественной резистентности у клинических изолятов под влиянием ионно наноструктурированных комплексов [Текст] / [Леонова Н.В.] // Научно-практический журнал «Ветеринария». – 2012. - № 1 (23). – С.55-56.
11. Комбинированное действие лекарственного средства ФС-1 и антибиотиков широкого спектра действия против *Staphylococcus aureus* [Текст] / [Леонова Н.В.] // Научно-практический журнал «Ветеринария». 2012. - № 1 (23). – С.57-58.

12. Антибактериальная активность лекарственного средства ФС-1 в отношении метициллин-резистентных и метициллин-чувствительных *Staphylococcus aureus* [Текст] / [Леонова Н.В.] // Известия НАН КР. – 2012. - №1. – С. 65-68.
13. Study of the combined effect of antibacterial/antiviral agent FS-1 and antibiotics on *Staphylococcus aureus* in experiments *in vitro* [Text] / [Leonova N.] // Meditsinskii vestnik Erebuni. – 2012. - №1 (49). – С. 54-60.

**Леонова Надежда Васильевнанын 03.01.06 – биотехнология (жана ошондой эле бионанотехнология) адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты илимий даражасы үчүн “Кеңири таасир берүүчү антибиотиктери бар “ФС-1” антибактериалдык дарысынын синергетикалык эффекти” темасындагы диссертациясына**

## **КОРТУНДУ**

*Түйүндүү сөздөр:* антибактериалдык жана кургак учукка каршы активдүүлүгү, фенотиптүү өзгөчөлүктөрү, синергетикалык эффект, терапевтикалык эффект, иондуу нанотүзүмдөлгөн комплекс, йод.

*Изилдөөнүн объектилери:* полипептиддер, карбогидраттар, щелочтуу туздар жана йод менен интеркалирленген щелочтуу жер металлдарынан жаралган иондуу нанотүзүмдөлгөн комплекстер. Микроорганизмдердин 122 штамдары: *M. tuberculosis* H37Rv, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300, MRSA жана MSSA штамдары, *S. aureus* № 3, *P. aeruginosa* № 4/32, *E. coli* O<sub>55</sub> № 12 *M. tuberculosis* MS-115, *M. bovis* An-2. Жаныбарлар (деңиз чочколору-альбиностордун ургаачылары).

*Изилдөөнүн ыкмалары:* микробиологиялык, биохимиялык, серологиялык, патологоанатомиялык, гистологиялык ыкмалар.

*Алынган жыйынтыктар жана алардын жаңылыктары:* ИНСК шарттуу патогендик жана патогендик микроорганизмдердин штамдарына, референттүү жана MSSA жана MRSA клиникалык штамдарына каршы ачык антибактериалдык активдүүлүктү көрсөтөөрү аныкталды. ФС-1 дарысын жана бета-лактамуу антибиотиктерди (оксациллиндин мисалында), ошондой эле II муундагы цефалоспориндерди (цефамандолдун мисалында) аралаштыра колдонуу MRSA ATCC 43300 карата синергетикалык эффекттиге алып келет. ФС-1 дарысынын кургак учуктун микробактерияларына карата бактерициддик активдүүлүгү бар. *M. tuberculosis* H37Rv менен ооруган деңиз чочкоруна эксперимент жүргүзүлгөндө ФС-1 дарысын монотерапияда колдонгондо терапевтикалык эффективдүүлүгүн, жана кургак учукка каршы дарылар менен бирге колдонгондо ачык синергетикалык эффектисин көрсөткөн. Патологоанатомиялык жана гистологиялык изилдөөлөрдүн жыйынтыгында паренхиматоздуу органдарда кургак учуктун жайылып-өнүгүшүнө тоскоол болуп жана ал органдардын функцияларын калыбына келтирүүгө жардам берээри белгилүү болду.

*Жайылтуунун деңгээли, практикалык мааниси жана экономикалык натыйжалуулугу:* диссертациялык иштин негизги жоболору клиникага чейинки досьенин негиздерине киргизилди, бул болсо өз учурунда Казактан Республикасында ФС-1 дарысын клиникалык изилдөөгө негиз болду.

*Колдонуу чөйрөсү:* медицина, фармакология, биотехнология.

## РЕЗЮМЕ

диссертации Леоновой Надежды Васильевны на тему: «Синергетический эффект нового антибактериального препарата «ФС-1» с антибиотиками широкого спектра действия» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология)

*Ключевые слова:* антибактериальная и противотуберкулезная активность, фенотипические свойства, синергетический эффект, терапевтический эффект, ионный наноструктурированный комплекс, йод.

*Объекты исследования:* ионные наноструктурированные комплексы, образованных полипептидами, карбогидратами, солями щелочных и щелочноземельных металлов интеркалированные йодом. 122 штамма микроорганизмов: *M. tuberculosis* H37Rv, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300, штаммы MRSA и MSSA, *S. aureus* № 3, *P. aeruginosa* № 4/32, *E. coli* O<sub>55</sub> № 12 *M. tuberculosis* MS-115, *M. bovis* An-2. Животные (самки морских свинок-альбиносов).

*Методы исследования* микробиологические, биохимические, серологические, патологоанатомические, гистологические методы.

*Полученные результаты и их новизна:* Установлено, что ИНСК, проявляют выраженную антибактериальную активность против условно-патогенных и патогенных штаммов микроорганизмов, против референтных и клинических штаммов MSSA и MRSA. Комбинированное применение ФС-1 и бета-лактамных антибиотиков (на примере оксациллина), а также цефалоспоринов II поколения (на примере цефамандола) приводит к синергетическому эффекту в отношении MRSA ATCC 43300. ФС-1 обладает бактерицидной активностью в отношении микобактерий туберкулеза. В эксперименте на морских свинках, зараженных *M. tuberculosis* H37Rv установлено, что ФС-1 оказывает терапевтическую эффективность при монотерапии, и выраженный синергетический эффект при сочетании с противотуберкулезными препаратами. Патологоанатомическими и гистологическими исследованиями показано, что ФС-1 препятствует развитию туберкулезного воспаления в паренхиматозных органах и способствует восстановлению их функции.

*Степень внедрения, практическая значимость и экономическая эффективность:* основные положения диссертационной работы легли в основу доклинического досье, что явилось обоснованием проведения клинических испытаний ФС-1 в Республике Казахстан.

*Область применения:* медицина, фармакология, биотехнология.

## SUMMARY

**Of the thesis of Leonova N.V. under the title: «The synergistic effect of the new antibacterial preparation "FS-1" with broad-spectrum antibiotics» submitted by for the degree of candidate of biological sciences on specialty 03.01.06 – biotechnology (including bionanotechnology)**

*Key words:* antibacterial and anti tuberculosis activity, phenotypic properties, synergistic and therapeutic effect, ion nanostructured complex, iodine.

*Research subject:* ion nanostructured complex, 122 strains of microorganisms: *M. tuberculosis* H37Rv, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300, MRSA и MSSA, *S.aureus* № 3, *P. aeruginosa* № 4/32, *E. coli* O<sub>55</sub> № 12, *M. tuberculosis* MS-115, *M. bovis* An-2 and animals (female-albinos of guinea pigs).

*Research methods:* microbiological, biochemical, serological, pathological, histological methods.

*Results of work:* Was determined that INSC reveal of antibacterial activity against the opportunistic and pathogenic strains of microorganisms, against reference and clinical strains of MSSA and MRSA. Combined use of preparation FS-1 with beta-lactam antibiotics (for example, oxacillin) and cephalosporins II generation (for example, cefamandole) leads to a synergistic effect against MRSA ATCC 43300. FS-1 has a bactericidal activity against *Mycobacterium tuberculosis*. In the experiment on guinea pigs which was infected with *M. tuberculosis* H37Rv was revealed that FS-1 has therapeutic efficacy in monotherapy, and a pronounced synergistic effect combine with anti tuberculosis drugs. Pathological and histological studies have shown that FS-1 prevents the development of tuberculous inflammation in parenchymal organs and helps to restore their function.

*Implementation extent, practical significance and economic effectiveness:* the main regulations of the thesis formed the basis of pre-clinical profile and has been rationale for conducting clinical trials of FS-1 in the Republic of Kazakhstan.

*Field of application:* medicine, pharmacology and biotechnology.