

- 4 Hirose T., Okezaki E., Kato H. et al. In vitro and in vivo activity of NY-198, a new difluorinated quinolone // Antimicrob. Agents Chemother.— 1987.— Vol.31.— P.854—859.
- 5 Holt A., Bywater M.J., Revers D.S. Comparative in vitro activity of lomefloxacin and other agents against clinical bacterial isolates // Rev. Infect. Dis.— 1989.— Vol.11, Suppl.5.— P.S 933—S 934.
- 6 Jones R.N. Fluoroquinolone (Lomefloxacin) international surveillance trial: a report of 30 months of monitoring in vitro activity // Am. J. Med.— 1992.— Vol.92, N 4 A.— P.52 S—58 S.
- 7 Neu H.C. Summary Lomefloxacin: development of a once-a-day quinolone // Ibid.— P.136 S—137 S.
- 8 Rizk E. The U.S. clinical experience with lomefloxacin, a new once— daily fluoroquinolone // Ibid.— P.130 S— 135 S.
- 9 Robbins M.J., Baskerville A.J., Sanghrajka M. et al. Comparative in vitro activity of lomefloxacin, a difluoro-quinolone // Diagn. Microbiol. Infect. Dis.— 1989.— Vol.12.— P.65 S—76 S.
- 10 Sun Z.M., Maskell J.P., Sehgal S.C., Williams J.D. In vitro activity of Lomefloxacin (SC-47111) and other quinolones // Infection.— 1989.— Vol.17.— P.165—169.
- 11 Wadwarth A.N., Goa K.L. Lomefloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use // Drugs.— 1991.— Vol.42, N 6.— P.1018—1060.

Поступила 14.07.93.

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

Е. Н. Падейская, Л. Ф. Стебаева

ВЛИЯНИЕ МАКСАКВИНА НА МОРФОЛОГИЮ И УЛЬТРАСТРУКТУРУ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Центр по химии лекарственных средств — Всероссийский
научно-исследовательский химико-фармацевтический институт, Москва

Изучение вопросов механизма действия антибактериальных препаратов на морфологическом уровне (в дополнении к биохимическим исследованиям) представляет большой интерес [1,6]. Электронно-микроскопические исследования позволяют определить повреждения структуры нуклеоида. В этом случае регистрируется дезинтеграция нуклеоида, формирование розеткообразных структур, хлопьевидной ядерной субстанции и др. Изменения в структуре клеточной стенки, в мембране клеточной стенки (разрывы мембраны) и в цитоплазме (отек, плазморея, гомогенизация) позволяют определить степень повреждающего действия препарата и степень чувствительности клеточных структур в зависимости от вида бактерий. Механизм антибактериального действия фторхинолонов интенсивно изучается, и определены многие стороны этого процесса [2,4,5,7]. Морфологические исследования в этом направлении касаются ряда препаратов. Достаточно подробно охарактеризованы изменения в клетках *E. coli* под действием ципрофлоксацина [3]. Морфологические и ультраструктурные изменения в клетках под действием Максаквина практически не изучены.

Задачей настоящей работы было изучение морфологических изменений в клетках грамотрицательных бактерий под действием Максаквина. В качестве объектов исследования были взяты различные по своим свойствам бактерии: *Kl. pneumoniae* (как представитель капсульных бактерий), *S. typhi* и *E. coli*. Сравнительный аспект исследований представляет особый интерес. Штаммы *Ps. aeruginosa*, *Kl. pneumoniae*, *S. typhi* были чувствительны к Максаквину и высоковирулентны для животных. В опытах *in vivo* на моделях экспериментальных инфекций, воспроизводимых этими штаммами, Максаквин оказывал высокий химиотерапевтический эффект. Штаммы *E. coli* KL 16 и KL 166 также были чувствительны к Максаквину (МПК методом серийных разведений на мясопептонном бульоне 0,125—0,25 мкг/мл соответственно). Штаммы различались

по характеристике ДНК-гиразы — основной мишени хинолонов: KL 16 гур А⁺ и KL 166 гур А⁻ (мутантный штамм с измененной ДНК-гиразой).

Работа проведена с субстанцией Максаквина фирмы «Searle» (США). Использованы лабораторные штаммы бактерий *Ps. aeruginosa* 165, *Kl. pneumoniae* 444, *S. typhi* Ty2 4446, *E. coli* KL 16 и KL 166 и клинический штамм *Ps. aeruginosa* 5044. Характеристика штаммов по степени чувствительности к Максаквину и по активности Максаквина на модельных инфекциях, вызванных *Ps. aeruginosa*, *Kl. pneumoniae* и *S. typhi*, представлены в табл.1

Опыты проводили на плотной агаризованной среде, в которую вносили различные концентрации Максаквина. Диапазон концентраций определялся

Т а б л и ц а 1

Характеристика антибактериальной активности (*in vitro* и *in vivo*) штаммов, использованных в эксперименте

Микроорганизм, штаммы	МПК, мкг/мл, на мясопептонном бульоне, инокулом — 1×10 ⁶ КОЕ/мл	ЭД ₅₀ , мг/кг, per os на модели септикопиемии мышей; инфицирующая доза — 1LD ₁₀₀ внутрибрюшинно
<i>Ps. aeruginosa</i> 165	1,95—3,9	27,3 (18,9÷39,4)
<i>Ps. aeruginosa</i> 5044	1,95—3,9	56,23 (42,38÷70,08)
<i>Kl. pneumoniae</i> 444	0,015—0,03	17,5 (11,3÷27,3)
<i>S. typhi</i> 4446	0,03—0,06	0,37 (0,23÷0,6)
<i>E. coli</i> KL 16	0,125—0,25	активность <i>in vivo</i> не изучали
<i>E. coli</i> KL 166	0,5	активность <i>in vivo</i> не изучали

П р и м е ч а н и е. По данным Е.Н. Падейской, Л.Д. Шипиловой, В.Э. Мнацканяна, диапазон МПК по результатам 4—6 экспериментов, в опытах при расчете ЭД₅₀ — 20—30 мышей в группе.

степенью чувствительности опытных штаммов к Максаквину на плотной среде и колебался от суб-бактерицидных до концентраций, при которых наблюдался рост культуры через 20—24 ч. при 37°C, соответствующий росту на среде без Максаквина. В зависимости от вида бактерий изучено действие следующих концентраций Максаквина для:

<i>Ps. aeruginosa</i> 165 и 5044	0,1—0,5—1,0—5,0 мкг/мл
<i>Kl. pneumoniae</i> 444	0,005—0,01—0,05—0,1 мкг/мл
<i>S. typhi</i> 4446	0,005—0,01—0,05—0,1 мкг/мл
<i>E. coli</i> KL 16 и KL 166	0,05—0,1—0,25—0,5—1,0 мкг/мл

На чашки с соответствующими концентрациями Максаквина засевали 0,1 мл взвеси (в изотоническом растворе хлорида натрия) суточной культуры бактерий, содержащей 1×10^4 или 1×10^6 КОЕ/мл. Анализ структуры клетки проводили через 20—24 и 48 ч. культивирования при 37°C. Экспозиция 48 ч. была выбрана для медленно растущих культур на агаре с Максаквином (штаммы *E. coli* KL 16 и KL 166) и для экспериментов с наиболее высокими концентрациями.

Феномен элонгации изучали методом световой микроскопии мазков, окрашенных фуксином или по Граму. Учет длины бактерий осуществляли окуляр-микрометром при увеличении микроскопа $\times 1000$. Длина бактерий выражалась в микронах (минимальное значение деления микрометра равно 0,01 мм, или 10 мк). Изменение длины бактерий учитывали в процентном отношении к размерам клеток соответствующего штамма бактерий в контроле.

Подсчет измененных (нежизнеспособных) клеток проводили на электронограммах при расчете 100 клеток в каждой из 10 просмотренных электроног-

Таблица 2

Количество резко измененных клеток в изученной популяции под влиянием Максаквина (экспозиция 20—24 ч.)

Штамм	Действующая концентрация, мкг/мл	Количество клеток к интактному контролю, %
<i>Ps. aeruginosa</i> шт. 165	5,0	28,5 $\pm$ 4,1
	1,0	36,7 $\pm$ 1,9
<i>Ps. aeruginosa</i> шт. 5044	5,0	44,4 $\pm$ 5,3
	1,0	34,5 $\pm$ 4,6
<i>Kl. pneumoniae</i> шт. 444	0,1	41,4 $\pm$ 5,3
	0,05	44,4 $\pm$ 4,8
<i>S. typhi</i> Ty2 4446	0,1	47,4 $\pm$ 5,3
	0,05	67,4 $\pm$ 7,9
<i>E. coli</i> KL 16	0,5	48,3 $\pm$ 4,8
	0,25	43,3 $\pm$ 1,9
<i>E. coli</i> KL 166	0,5	62,7 $\pm$ 8,2
	0,25	68,1 $\pm$ 4,8



Рис.1 Культура *Ps. aeruginosa* после экспозиции с Максаквином в течение 20—24 часов. $\times 20000$. а — штамм 5044, концентрация Максаквина 1 мкг/мл, б — штамм 165, концентрация Максаквина 0,1 мкг/мл, в — штамм 5044, концентрация Максаквина 5 мкг/мл. Повреждения клеток в виде расслоения мембраны (РМ), подмембранных вакуолей (ПВ), плазморея (ПР), некроз клеток (НК).

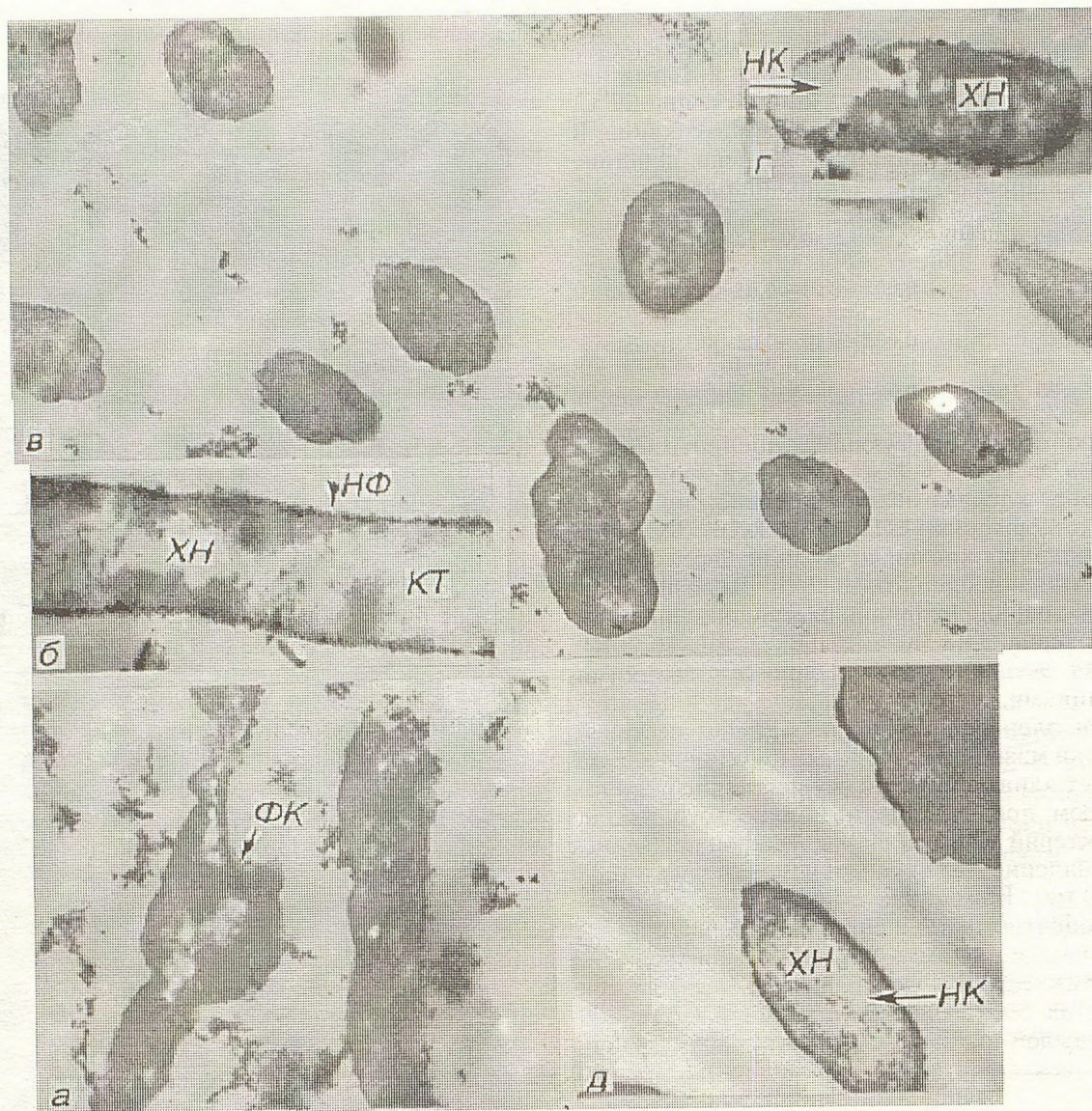


Рис.2. Культура *Kl. pneumoniae* после экспозиции с Максаквином в течение 20—24 часов. $\times 20000$. *а, б, г* — концентрация Максаквина 0,1—0,05 мкг/мл; *в, д* — концентрация Максаквина 0,005 мкг/мл. Нитевидные, слабофиламентированные формы клеток (НФ), некроз клеток, «клетки—тени» (КТ), хлопьевидная структура нуклеоида (ХН), фестончатая форма клеток (ФК).

рамм. Средняя величина выводилась на 1000 просчитанных клеток для каждой изученной концентрации и выражалась также в процентном отношении к контролю без препарата.

Изучение ультраструктуры бактерий проводили методом электронной микроскопии. Клетки с плотной питательной средой с соответствующими концентрациями Максаквина или на среде без препарата (контроль) смывали изотоническим раствором хлорида натрия, промывали в какодилатном буфере (рН 7,2—7,4), фиксировали в 0,2% растворе глutarового альдегида и 1% осмиевой кислоты по 30 минут последовательно в каждом растворе. Отмытые фиксированные клетки заключали в смолы (эпон-аралдит); приготовленные ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе («НІТАСНІ») при исходных увеличениях 10—20 тыс.

Исследования показывают, что суббактерицидные концентрации Максаквина вызывают выраженное удлинение клеток всех четырех видов изученных бактерий.

При световой микроскопии удастся наблюдать удлинение клеток *Ps. aeruginosa* (штамм 165 и 5044) в 3—6 раз при концентрации Максаквина 1—5 мкг/мл, клеток *Kl. pneumoniae* в 2—5 раз при концентрации 0,1—0,05 мкг/мл, клеток *S. typhi* в 7—8 раз при концентрации 0,1—0,05 мкг/мл и клеток *E. coli* (штаммы KL 16 и KL 166) в 4—6 раз и 2—3 раза соответственно штамму при концентрациях препарата 0,5 и 0,25 мкг/мл. Процесс носит дозозависимый характер. При воздействии концентраций, которые не приводили к задержке и изменению характера роста бактерий, эффект элонгации практически отсутствовал.

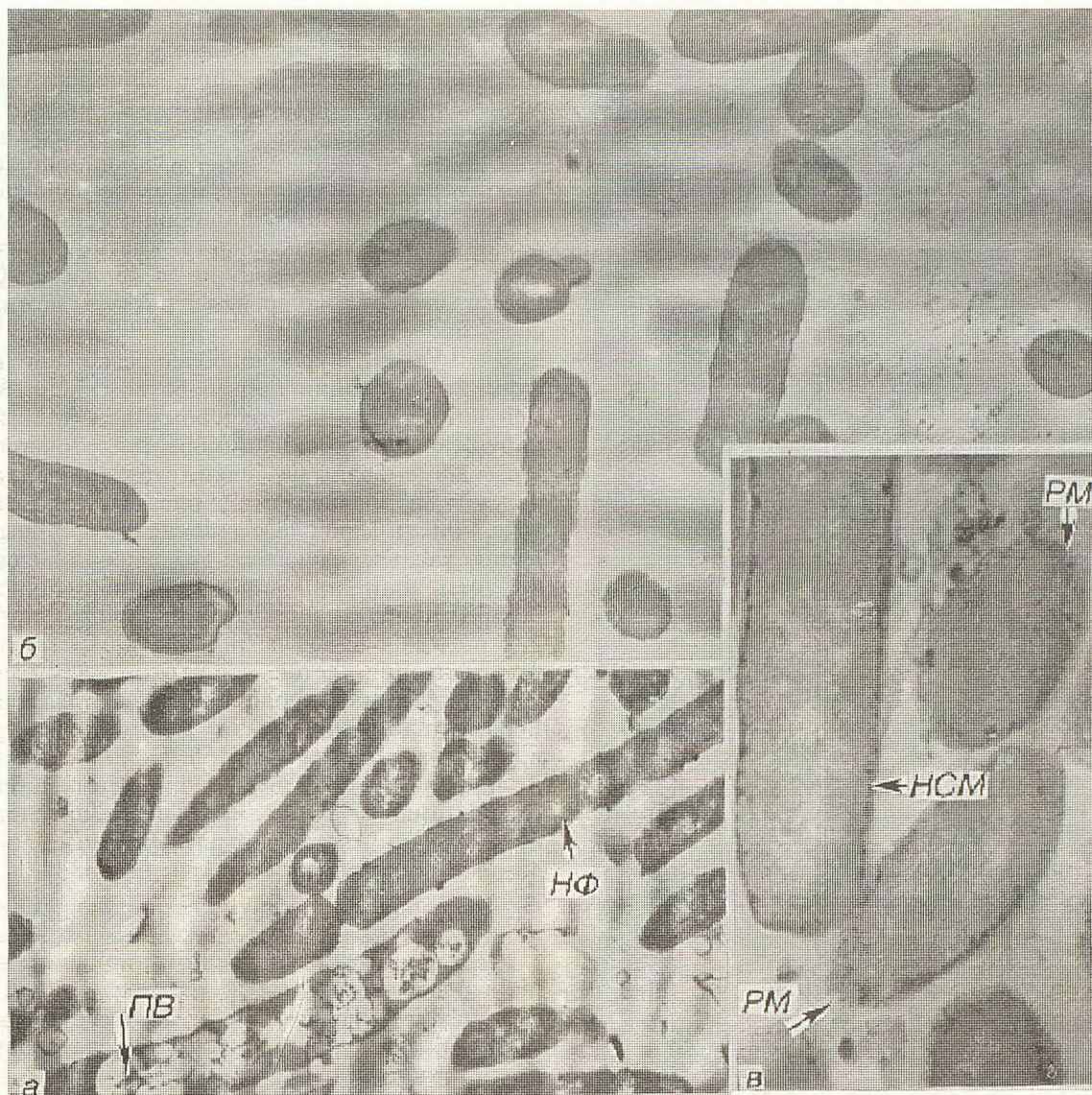


Рис.3. Культура *S. typhi* после экспозиции с Максаквином в течение 20—24 часов. $\times 20000-40000$. а — экспозиция с Максаквином в концентрации 0,1 мкг/мл, б — концентрация Максаквина 0,01 мкг/мл, в — концентрация Максаквина 0,05 мкг/мл. Нитевидные, слабофиламентированные формы клеток (НФ), вакуолизация цитоплазмы, подмембранные вакуоли (ПВ), нарушение структуры клеточной стенки и внутренней мембраны (НСМ), расслоение мембраны (РМ).

Установлен ряд особенностей морфологических и ультраструктурных изменений в клетках под действием Максаквина в зависимости от вида бактерий. Электронно-микроскопические исследования позволили выявить, наряду с элонгацией, феномен филаментаций в большей степени в клетках *Ps. aeruginosa*, *E. coli* и в меньшей — в клетках *S. typhi* и *Kl. pneumoniae*. В опытах с *Ps. aeruginosa*, в равной степени со штаммами 165 и 5044 (клинический, устойчивый к гентамицину), при концентрации Максаквина 1 и 5 мкг/мл регистрировались нитевидные формы клеток и филаментация большей части клеток. Обнаруживались клетки овоидной формы, описанные также при действии высоких концентраций ципрофлоксацина в опытах с *E. coli* [3]. В поврежденных клетках отмечалось рассло-

ение мембраны, формирование подмембранных вакуолей и явления плазморексиса (рис.1,а,б,в). Более глубокие изменения с большим числом поврежденных клеток отмечались для штамма 5044 (табл.2). Характерной была также дезинтеграция нуклеоида с образованием отдельных «мелких» розеткоподобных структур.

В опытах с *Kl. pneumoniae* характерным было формирование одновременно нитевидных форм со слабо выраженной филаментацией и образование полиморфных клеток с преобладанием раздутых, фестончатых форм и «клеток-теней» (рис.2,а,б,в). В «клетках—тенях» была сохранена только клеточная стенка, а цитоплазма представлена бесструктурным гомогенным образованием. В клетках *Kl. pneumoniae* дезинтегрированный нуклеоид носил характер хлоп-

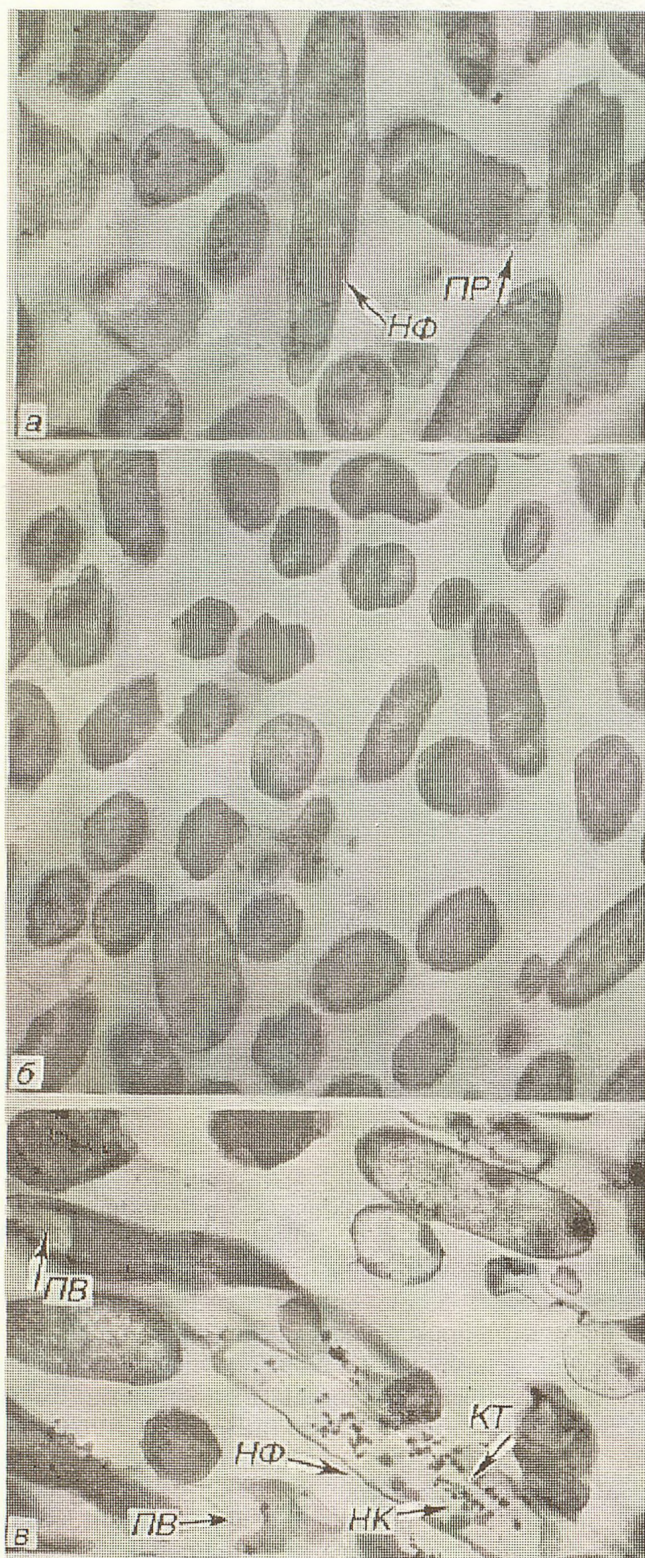


Рис. 4. Культура *E. coli* после экспозиции с Максаквином в течение 48 часов. а, в — штамм KL 166 экспозиция с Максаквином в концентрации 0,25—0,5 мкг/мл; б — штамм KL 16, экспозиция с Максаквином в концентрации 0,05 мкг/мл. Нитевидные формы клеток (НФ), образование подмембранных вакуолей (ПВ), явления плазморея, клетки-тени (КТ), распад структуры нуклеоида.

свидных структур. Клетки *Kl. pneumoniae* можно характеризовать как особенно высоко чувствительные к Максаквину. Даже при использовании минимальных концентраций 0,005—0,01 мкг/мл в клетках регистрировались ультраструктурные изменения. При экспозиции 20—24 ч. и концентрации Максаквина 0,05—0,1 мкг/мл около половины клеток характеризовались изменениями, которые определяют нежизнеспособность клетки (см. табл. 2). При удлинении экспозиции до 48 часов 90—93% клеток были с точки зрения структуры нежизнеспособными.

В опытах с *S. typhi* наиболее резко был выражен феномен элонгации при слабо выраженной филаментации клеток. Характерным для *S. typhi* было нарушение внутренней мембраны клеточной стенки и распад мембраны на мелкие субъединицы, а также явления внутреннего отека плазмы и плазморея (рис. 3, а, б, в). Наиболее глубокие структурные изменения, характеризующие нежизнеспособность клетки, отмечены при концентрациях Максаквина 0,05—0,1 мкг/мл и составляли ≥60% клеток.

В опытах с *E. coli* регистрировались элонгация и филаментация клеток, достаточно часто имело место образование вакуолей и явление плазморея. Более резко указанные изменения были выражены в клетках штамма KL 166 гуг А⁻ (рис. 4, а, б, в). Количество измененных клеток при действии суббактерицидных и минимальных бактерицидных концентраций составляет для штамма *E. coli* KL 16 43—48%, для штамма KL 166 62—68%.

Заключение

Проведенные исследования показывают, что Максаквин вызывает в клетках *E. coli* и *Ps. aeruginosa* морфологические ультраструктурные изменения, сходные с описанными в литературе для других хинолонов, в том числе фторхинолонов (ципрофлоксацин). Увеличение длины клеток *E. coli* и *Ps. aeruginosa* при воздействии Максаквина идет преимущественно по пути филаментации бактерий с резким нарушением процесса деления клеток.

Одновременно следует отметить, что в зависимости от вида бактерий и степени чувствительности определенного штамма к препарату наблюдаются и определенные специфические особенности морфологических изменений, включая глубокие изменения клеточной структуры, определяющие нежизнеспособность клетки. Наиболее демонстративным примером таких специфических изменений в наших исследованиях были изменения в клетках *Kl. pneumoniae* и *S. typhi*. В значительно меньшей степени формируются филаментозные формы, хотя эффект элонгации был резко выражен. Характерным для *Kl. pneumoniae* было формирование «фестончатых клеток» и «клеток-теней», полная дезинтеграция нуклеоида до «хлопьевидной субстанции». Интересно также, что глубокие ультраструктурные изменения регистрировались и в клетках бактерий, характер роста которых на агаризованной среде в

присутствии минимальных (суббактериостатических) концентраций препарата практически не отличался от характера роста контрольных интактных колоний. Представляет значительный интерес изучение ультраструктурных изменений в клетках бактерий под действием Максаквина в динамике, в том числе на ранних стадиях воздействия препарата (в данном случае уже при культивировании на жидкой среде). Глубокие ультраструктурные изменения в клетках бактерий под действием минимальных концентраций фторхинолона (в настоящем исследовании Максаквина) — один из важных факторов, определяющих высокую активность препаратов при однократном в сутки применении малых доз и величины $T_{1/2}$ в пределах 8—10 часов.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Падеевская Е.И., Тюрин В.С., Першин Г.Н., Быков А.С. Субмикроскопические изменения в клетках кишечной па-

- лочки и стафилококка под влиянием диоксилина // Фармакол. и токсикол. — 1974. — N 1. — С. 80—85.
- 2 Chu D.F., Fernandes P.B. Structure-Activity relationships of the fluoroquinolones // Antimicrob. Agents Chemother. — 1989. — Vol. 33, N 2. — P. 131—135.
- 3 Diver J.M., Wise R. Morphological and biochemical changes in *Escherichia coli* after exposure to ciprofloxacin // J. Antimicrob. Chemother. — 1986. — Vol. 18, Suppl. D. — P. 31—41.
- 4 Edwards R. Laboratory assessment of lomefloxacin in comparison with norfloxacin // J. Antimicrob. Chemother. — 1988. — Vol. 22, N 6. — P. 885—890.
- 5 Lode H., Hoffken G., Prinzing C., Glatzel P., Wiley R., Olschewski P., Sievers B., Reimnitz D., Borner K., Koeppel P. Comparative pharmacokinetics of new quinolones // Drugs. — 1987. — Vol. 34, Suppl. 1. — P. 21—25.
- 6 Lounatmaa K. Electron microscopic methods for the study of bacterial surface structures // Enterobacteriaceae: Surface Antigens: Methods and Molecular Characterisation. — Amsterdam: Elsevier, 1985. — P. 243—261.
- 7 Toma E. Structure-activity relationship of quinolones // Clin. Invest. Med. — 1989. — Vol. 12, N 1. — P. 7—9.

Поступила 14.07.93.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

Н. И. Фадеева, М. В. Шульгина

МЕХАНИЗМ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ МАКСАКВИНА В ОПЫТАХ С *Escherichia coli* K 12

Центр по химии лекарственных средств — Всероссийский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт, Москва

Максаквин относится к группе фторхинолонов — современных высокоэффективных антибактериальных препаратов. Механизм антибактериального действия этого препарата связывают с ингибированием активности бактериального фермента ДНК-гиразы [1,3,6,7,9,11—13]. Действие 4-хинолонов специфично: являясь высокоэффективными ингибиторами бактериальной ДНК-гиразы, они не влияют на активность топоизомеразы II эукариотов [8].

В настоящей работе мы провели изучение некоторых сторон механизма антибактериального действия Максаквина: 1) ингибирование репликации ДНК и его соотношение с процессом гибели клеток под действием препарата, 2) изучение А- и В-механизмов бактерицидного эффекта Максаквина, 3) способность Максаквина индуцировать SOS-ответ (используя генетически сконструированный штамм).

Исследования проводились на чувствительном к 4-хинолонам и на мутантном по А субъединице ДНК-гиразы резистентном штаммах вариантах исходного штамма *E. coli* K 12. В качестве препаратов сравнения использовали ципрофлоксацин, пefлоксацин и налидиксовую кислоту. В работе использовались варианты штамма *E. coli* K 12: штамм KL 16 thy^- (Hfr P.O. 45, $thi1\ thy\ A24$), штамм KL 166 (Hfr P.O. 45 $thi1\ rel1\ thy\ A24\ drm13\ nal13$), штамм EC1000/pIE47 (F^- , Δ (proB-lac) $thi1\ supE44\ strA/colE1\ \mu$ dAp-lac). Штаммы KL 16 и KL 166 были предоставлены нам из коллекции лаборатории генетической регуляции биохимических процессов ИЭМ

им. Н.Ф.Гамалеи. Штамм EC 1000/pIE 47 из коллекции института общей генетики РАН (В.А.Тарасов).

Опыты проводили на жидких и агаризованных (2%) питательных средах фирмы «Difco»: питательный бульон, L-бульон, с содержанием 1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта и 1% NaCl. Кроме того, использовали бульон Хоттингера.

Для определения β -галактозидазы использовали Z-буфер (0,06 M Na_2HPO_4 , 0,04 M NaH_2PO_4 , 0,01 M KCl, 0,001 M $MgSO_4$, 0,05 M β -меркаптоэтанол, pH 7,0).

Бактерицидный эффект определяли по описанной методике [8]. 18-часовую культуру бактерий в жидкой питательной среде разводили в 50 раз той же средой; 2 мл культуры сразу же помещали в ледяную баню (контрольная проба). Остальную культуру разливали по 2 мл в пробирки, содержащие определенное количество фторхинолона и (или) хлорамфеникола (в случае определения бактерицидного действия по механизмам А или В). Пробирки с опытными пробами инкубировали 2 час. при 37°C с интенсивным перемешиванием, центрифугировали и два раза отмывали бактерии 0,9% раствором NaCl, затем бактерий суспензировали в этом же растворе в исходном объеме (2 мл). Количество жизнеспособных клеток определяли по количеству колоний, образовавшихся на чашках с агаризованным бульоном Хоттингера.

О репликации ДНК судили по включению 3H -тимидина (2×10^4 Бк) в кислотонерастворимую фракцию бактериальных клеток в опытах с культурой