

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 Падейская Е.И., Тюрин В.С., Першин Г.И., 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<sup>-</sup> (Hfr P.O. 45, thi1 thy A24), штамм KL 166 (Hfr P.O. 45 thi1 rell thy A24 drml3 nal13), штамм EC1000/pIE47 (F<sup>+</sup>, Δ(proB-lac) thi1 supE44 strA/colE1 μdAp-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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,04M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01M KCl, 0,001M MgSO<sub>4</sub>, 0,05M 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 <sup>3</sup>H-тимидина (2x10<sup>6</sup> Бк) в кислотонерастворимую фракцию бактериальных клеток в опытах с культурой

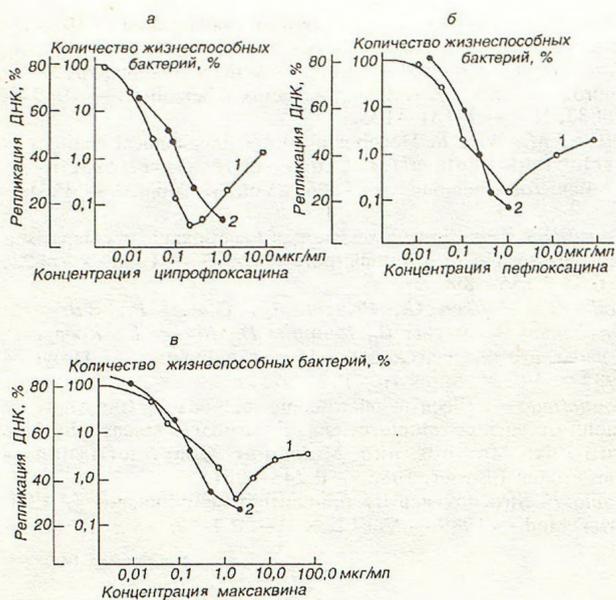


Рис.1. Бактерицидное действие и ингибирование репликации ДНК фторхинолонами в опытах с *E. coli* KL 16 *thy*<sup>-</sup>  
 а — ципрофлоксацин, б — пefлоксацин, в — Максаквин.  
 1 — выживаемость бактерий,  
 2 — ингибирование репликации ДНК.

бактерий, находящихся в середине логарифмической фазы роста в течение 20 минут (питательная среда — бульон «Difco»,  $t=37^{\circ}\text{C}$ ). Реакцию останавливали добавлением ледяной трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 5%. Сформировавшийся в течение 2 часов на холоде осадок отделяли на фильтрах Владипор (МФА—МА—3), промывали двухкратным объемом трихлоруксусной кислоты, сушили и определяли их радиоактивность.

Индукцию *SOS*-ответа определяли у штамма *E. coli* EC1000/pIE47, несущего мультикопийную плазмиду pIE47 со структурным геном  $\beta$ -галактозидазы, сшитым с промотором *colE*-оперона, одного из оперонов *SOS*-ответа. С помощью этого штамма можно судить об уровне индукции *SOS*-ответа по индукции  $\beta$ -галактозидазы. Стационарную культуру EC1000/pIE47 в L-бульоне с 150 мг/мл ампицилина разводили в 10 раз той же средой и подрашивали при  $37^{\circ}\text{C}$  до оптической плотности 0,6 при  $\lambda=650$  нм. Затем пробы разводили L-бульоном в 4—5 раз и определяли активность  $\beta$ -галактозидазы по стандартной методике. В качестве контроля на ДНК-повреждающее действие мы использовали облучение культуры ультрафиолетом ( $\lambda=254$  нм, 30 сек). Для определения  $\beta$ -галактозидазы к 0,2 мл культуры добавляли 1,8 мл Z-буфера, 4 капли хлороформа и 2 капли 0,1% додецилсульфата натрия. Пробы тщательно встряхивали в течение 10 секунд. Затем добавляли 0,4 мл о-нитрофенилгалактозида (4 мг/мл, «Serva») и помещали в водяную баню при  $28^{\circ}\text{C}$ . Время инкубации фиксировали. Реакцию останавливали после пожелтения раствора добавлением 2 мл 0,5 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Измеряли оптиче-

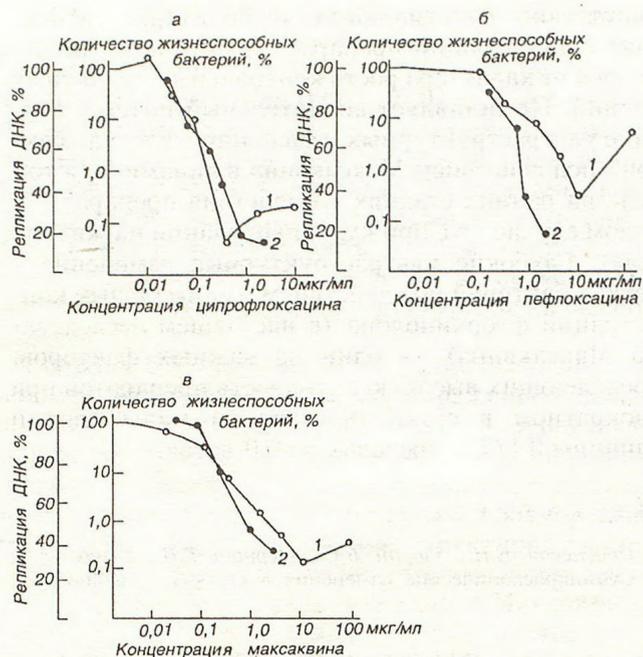


Рис.2. Бактерицидное действие и ингибирование репликации ДНК фторхинолонами в опытах *E. coli* KL 166.  
 а — ципрофлоксацин, б — пefлоксацин, в — Максаквин.  
 1 — выживаемость бактерий,  
 2 — репликация ДНК.

скую плотность проб при длинах волн 420 нм и 550 нм. Активность фермента вычисляли по формуле:

$$A = 1000 \cdot \frac{E_{420} - 1,75 \cdot E_{550}}{t \cdot v \cdot E_{600}}$$

где  $E_{420}$  и  $E_{550}$  — оптическая плотность реакционной смеси при длинах волн 420 и 550 нм,  $E_{600}$  — оптическая плотность клеточной суспензии перед определением,  $t$  — время реакции в минутах,  $v$  — отношение объемов взятой в определение культуры (в нашем случае 0,2 мл) и объема культуры и Z-буфера (2 мл). Оценивали степень индукции  $\beta$ -галактозидазы, принимая за единицу активность  $\beta$ -галактозидазы в необработанных клетках.

Бактерицидный эффект. Полученные данные показывают, что все изученные фторхинолоны обладали выраженным бактерицидным действием (рис.1.) Количество жизнеспособных бактерий у бактерий дикого типа начинает убывать при концентрациях ципрофлоксацина — 0,01 мг/мл, пefлоксацина — 0,05 мг/мл, Максаквина — 0,075 мг/мл, которые соответствуют минимальным подавляющим концентрациям (МПК). У бактерий, мутантных по А субъединице ДНК-гиразы, значения МПК возрастают в 5 раз (0,05 мг/мл) для ципрофлоксацина и в 2—5 раз для пefлоксацина и Максаквина (0,1 и 0,5 мг/мл соответственно). Концентрации, вызывающие максимальный бактерицидный эффект у мутантных бактерий, также в 5—10 раз выше, чем у бактерий дикого типа для пefлоксацина и Максаквина и незначительно возрастали для ципрофлоксацина (см.рис.1,2). Значения МПК и МБК для ципрофлоксацина в наших

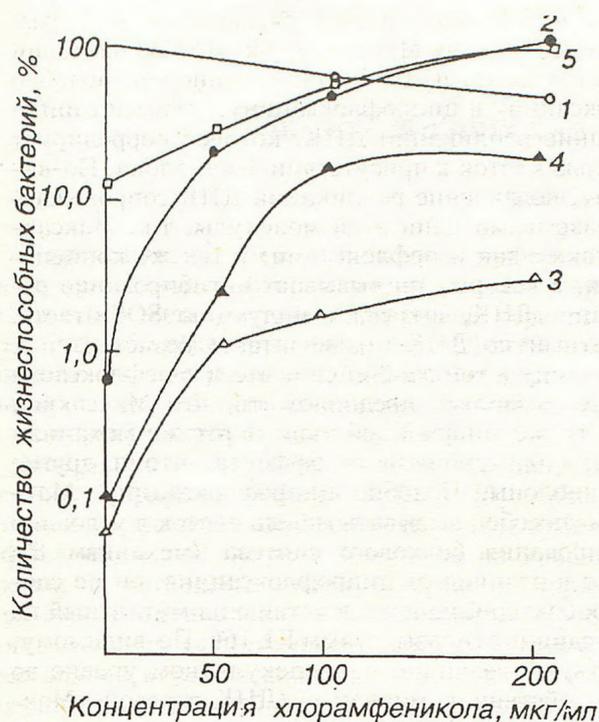


Рис.3. Влияние хлорамфеникола на бактерицидный эффект фторхинолонов в опытах с *E. coli* KL 16  $\text{thy}^-$ .

- 1 — хлорамфеникол,
- 2 — ципрофлоксацин 0,25 мкг/мл,
- 3 — пифлоксацин 1 мкг/мл,
- 4 — налидиксовая кислота 90 мкг/мл,
- 5 — Максаквин 3 мкг/мл.

наблюдениях совпадают с литературными данными [8]. Концентрации фторхинолонов, вызывающие подавление репликации ДНК на 10—20%, близки к МПК для чувствительного и резистентного к хинолонам штаммов *E. coli*. Для чувствительного и резистентного штаммов значения МБК в 5—10 раз превышают концентрации, вызывающие подавление репликации ДНК на 80%. Таким образом, ингибирование биосинтеза ДНК на 10—20% сопровождается бактериостатическим эффектом. Ингибирование степени репликации ДНК различными концентрациями хинолонов коррелировало с выживаемостью бактерий, при этом Максаквин близок к пифлоксацину по значениям МПК, МБК и степени бактерицидного эффекта (см.рис.1 и 2). Зависимость бактерицидного действия хинолонов от их концентрации имеет парадоксальный характер [8]. При увеличении концентрации хинолона от значений, равных МПК, до значений МБК происходит падение числа жизнеспособных бактерий. Однако при увеличении концентрации хинолонов выше значений МБК происходит возрастание количества выживших бактерий. Предполагается, что при высоких концентрациях хинолоны ингибируют биосинтез белка, ослабляя тем самым свой бактерицидный эффект. Описанный парадоксальный эффект наблюдается в опытах *in vitro* и, по-видимому, не имеет существенного значения при терапии инфекций в макроорганизме [8].

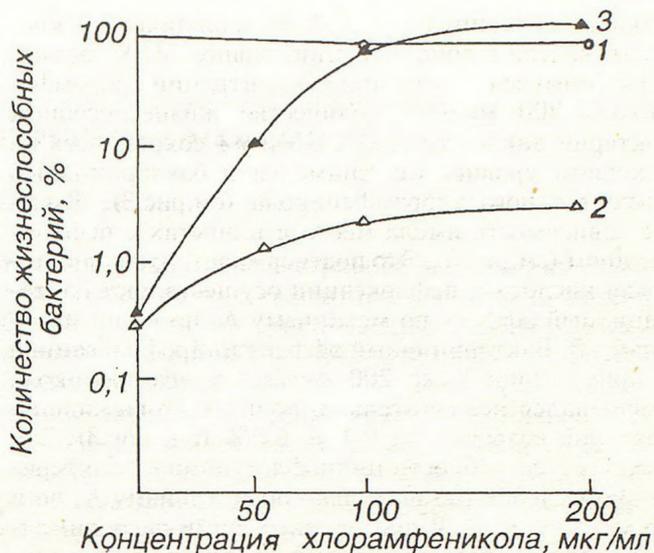


Рис.4. Влияние хлорамфеникола на бактерицидный эффект фторхинолонов в опытах с *E. coli* KL 166.

- 1 — хлорамфеникол,
- 2 — ципрофлоксацин 0,3 мкг/мл,
- 3 — Максаквин 10 мкг/мл.

В наших экспериментах наблюдалась парадоксальная зависимость бактерицидного действия от концентрации препарата (см. рис.1). У бактерий дикого типа при МБК ципрофлоксацина 0,2 мкг/мл выживало лишь 0,08% бактерий от исходного количества, а при концентрации 10 мкг/мл — 0,88%. Для пифлоксацина количество жизнеспособных бактерий при концентрации 1 мкг/мл составляло 0,33%, а при концентрации 100 мкг/мл — 3,3%. Для Максаквина при концентрации 3 мкг/мл выжило 0,23% бактерий, а при концентрации 100 мкг/мл — 6,8%.

А- и В- механизмы антибактериального действия. Показано, что ингибирование белкового синтеза на уровне транскрипции (рифампицин) или на уровне трансляции (хлорамфеникол) приводит к полному снятию бактерицидного эффекта налидиксовой кислоты, но лишь частично ослабляет действие ципрофлоксацина и офлоксацина [8]. На основании этих экспериментов предположили существование двух различных механизмов, определяющих бактерицидное действие хинолонов. Механизм А свойственен всем известным хинолонам, связан с белковым синтезом и требует, по-видимому, для своего осуществления индукции синтеза каких-то ферментов. Механизм В не чувствителен к ингибиторам белкового синтеза и, наряду с механизмом А, присущ двум наиболее активным препаратам этого ряда — ципрофлоксацину и офлоксацину [8]. Мы изучали зависимость бактерицидного действия Максаквина от белкового синтеза в сравнении с налидиксовой кислотой, пифлоксацином и ципрофлоксацином. В качестве ингибитора белкового синтеза мы использовали ингибитор трансляции — хлорамфеникол, который в концентрации 100—200 мкг/мл и сам вызывал снижение числа жизнеспособных бактерий (рис.3). В присутствии хлорамфе-

никала бактерицидный эффект налидиксовой кислоты, взятой в концентрации, равной МБК, полностью снимался и даже при концентрации хлорамфеникола 200 мкг/мл количество жизнеспособных бактерий дикого типа (KL 16 thy<sup>-</sup>) сохранялось на исходном уровне, т.е. снимался и бактерицидный эффект самого хлорамфеникола (см.рис.3). Такая же зависимость имела место и в опытах с пefлоксацином (см.рис.3). Это подтверждает, что налидиксовая кислота и пefлоксацин осуществляют бактерицидный эффект по механизму А, но не по механизму В. Бактерицидный эффект ципрофлоксацина в присутствии даже 200 мкг/мл хлорамфеникола уменьшался незначительно: количество выживших бактерий возрастало с 0,1 до 6,0% (см. рис.3). Это говорит о способности ципрофлоксацина к бактерицидному действию не только по механизму А, но и по механизму В. В проведенных нами экспериментах хлорамфеникол не снимал полностью бактерицидный эффект Максаквина. При концентрации хлорамфеникола 200 мкг/мл количество жизнеспособных бактерий возрастало с 0,2 до 16%. Это свидетельствует о том, что Максаквин подобно ципрофлоксацину способен к бактерицидному действию и по механизму В. Бактерицидное действие по механизму В у Максаквина менее выражено, чем у ципрофлоксацина.

Мы изучали также способность к независимому от белкового синтеза бактерицидному действию Максаквина и ципрофлоксацина у бактерий, мутантных по А субъединице ДНК-гиразы. Ранее было показано, что способность ципрофлоксацина к бактерицидному механизму В связана с участком в районе 83 аминокислоты А субъединицы ДНК-гиразы. Мутации, затрагивающие эту область фермента, делали несущие их бактерии нечувствительными к действию ципрофлоксацина в присутствии хлорамфеникола [4]. Оказалось, что изучаемый нами мутантный штамм KL 166 (мутация gug A13) сохраняет чувствительность к бактерицидному механизму В ципрофлоксацина (рис.4). Тем не менее, он приобрел резистентность к независимому от белкового синтеза бактерицидному эффекту Максаквина (см.рис.4). Это позволяет предположить существование двух различных сайтов бактерицидного действия по механизму В для Максаквина и ципрофлоксацина.

Индукция SOS-ответа. Налидиксовая кислота и фторхинолоны способны индуцировать синтез белков SOS-ответа [5]. Предполагается, что индукция SOS-ответа в присутствии хинолонов нерегулируема. Гиперсинтез нуклеаз SOS-системы в условиях ингибирования ДНК-гиразы приводит к разрушению ДНК. Мы изучили способность Максаквина и пefлоксацина индуцировать colE-оперон как один из оперонов SOS-системы. Исследования показали, что Максаквин сравним с пefлоксацином по способности индуцировать SOS-ответ. При концентрации, вызывающей подавление репликации ДНК на 50%, Максаквин вызывает индукцию синтеза β-галакто-

зидазы в 5,6 раза, а пefлоксацин — в 7 раз. Изучение действия Максаквина in vitro на бактерии E. coli показало, что этот дифторхинолон, подобно пefлоксацину и ципрофлоксацину, вызывает ингибирование репликации ДНК, которое коррелирует с гибелью клеток в присутствии 4-хинолона. По-видимому, подавление репликации ДНК сопровождается разрывами цепи этой молекулы, т.к. Максаквин (также как и пefлоксацин) в тех же концентрациях, в которых он вызывает ингибирование репликации ДНК, вызывает индукцию SOS-ответа. Мутантный по ДНК-гиразе штамм резистентен к Максаквину в той же степени, что и к пefлоксацину. Это позволяет предположить, что Максаквин имеет ту же мишень действия и тот же механизм развития бактерицидного эффекта, что и другие фторхинолоны. Подобно ципрофлоксацину, Максаквин способен вызывать гибель клеток в условиях ингибирования белкового синтеза (механизм В). Однако в отличие от ципрофлоксацина, он не способен к бактерицидному действию на мутантный по А субъединице гиразы штамм KL 166. По-видимому, существуют различия на молекулярном уровне во взаимодействии с мишенью (ДНК-гиразой) Максаквина и ципрофлоксацина.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Drlica K. Biology of Bacterial Deoxyribonucleic Acid Topoisomerases // Microbiol.Rev.— 1984.— Vol.48.— P.273—289.
- 2 Drlica K., Coughlin S., Gennaro M.L. Mode of Action of Quinolones: Biochemical Aspects // Infect.Dis.Chemother.— 1990.— Vol.5.— P.45—62.
- 3 Fisher L.M. Molecular Mechanisms of Antibacterial Activity of the 4-Quinolones // Arch.Pharmacol.— 1989.— Vol.340, Suppl.— P.A9.
- 4 Lewin C.S., Smith J.T. Gyr A Gene Alterations Affecting the Second Killing Action of Ciprofloxacin. // Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 31-st.— Chicago, 1991.— P.А—812.
- 5 Piddock L.J.V., Wise R. Induction of the SOS-Response in Escherichia coli by 4-Quinolones Antibacterial Agents // FEMS Microbiol.Lett.— 1987.— Vol.41.— P.289—294.
- 6 Piddock L.J.V., Hall M.C., Wise R. Mechanism of Action of Lomefloxacin // Antimicrob.Agents Chemother.— 1990.— Vol.34.— P.1088—1093.
- 7 Rohatgi K., Courtright J.B. Major Changes in the Structure of the Bacterial Nucleoid after Treatment of Cells with Quinolones // Infect.Dis.Chemother.— 1990.— Vol.5.— P.317—326.
- 8 Smith J.T. The Mode of Action of 4-Quinolones and Possible Mechanisms of Resistance // J.Antimicrob.Chemother.— 1986.— Vol.18, Suppl.D.— P.21—29.
- 9 Sonstein S.A. Mode of Action of Quinolones: Antibacterial Aspects. // Infect.Dis.Chemother.— 1990.— Vol.5.— P.63—78.
- 10 Stein G.E. The 4-Quinolone Antibiotics: Past Present and Future // Pharmacotherapy.— 1988.— Vol.8.— P.301—314.
- 11 Walters R.N., Piddock L.J.V., Wise R. The Effect of Mutations in the SOS-Response on the Kinetics of Quinolone Killing // J.Antimicrob.Chemother.— Vol.24.— P.863—873.
- 12 Wolfson J.S., Hooper D.C. Fluoroquinolones Antimicrobial Agents // Clin.Microbiol.Rev.— 1989.— Vol.2.— P.378—424.
- 13 Wolfson J.S., Hooper D.C., Shih D.J., McHugh G.L., Swartz M.N. Isolation and Characterization of an Escherichia Coli Strain Exhibiting Partial Tolerance to Quinolones // Antimicrob.Agents Chemother.— 1989.— Vol.33.— P.705—709.

Поступила 14.07.93.