

Н. О. Боброва, О. М. Важнича

Антимікробні властивості метилетилпіридинолуВищий державний науковий заклад України
«Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Ключові слова: емоксипін, метилетилпіридинол, антимікробна дія, чутливість мікроорганізмів

Похідні 3-гідроксипіридину були синтезовані шляхом надання структури вітаміну В₆ (піридоксолу) антиоксидантних властивостей за рахунок екранування алкільними групами фенольного гідроксилу [1]. На їхній основі розроблені й впроваджені в клінічну практику лікарські препарати емоксипін і мексидол, які широко застосовують в медичній практиці завдяки численним ефектам, що визначаються їхнім механізмом дії [2]. Емоксипін (метилетилпіридинолу гідрохлорид) нині є одним з відомих офтальмологічних засобів. Його призначають при внутрішньоочних крововиливах різного генезу, ангіоретинопатії, хоріоретинальній дистрофії, тромбозі центральної вени сітківки, ангіосклеротичній макулодистрофії, травмах та опіках рогівки [2, 3]. Препарат також застосовують для нейрота кардіопротекції в інших галузях медицини [2, 4]. Механізм дії цього похідного 3-гідроксипіридину пов'язують, насамперед, з антиоксидантною та антигіпоксантною активністю, що підтверджено численними експериментальними дослідженнями [5–8]. Останнім часом з'являються роботи, які стосуються використання емоксипіну при інфекційних процесах та порушеннях мікробіоценозу організму [9, 10]. Вони засвідчують антиоксидантні, протизапальні та дезінтоксикаційні властивості препарату за цих умов, але водночас ставлять питання про його власну антимікробну активність та вплив на ефекти традиційних антимікробних засобів. За даними літератури, емоксипін виявляє пригнічуючу дію на кишкову паличку й модифікує вплив гентамі-

цину й цефтазидиму на культури *Klebsiella pneumoniae* та *Escherichia coli*, посилюючи чи послаблюючи його залежно від дози та періоду культивування [11–13]. Така неоднозначність даних потребує поглиблення досліджень у цьому напрямі, оскільки, на думку фахівців, вплив на мікроорганізми неантимікробних засобів може мати як позитивне значення, відкриваючи нові шляхи терапії інфекційних захворювань, так і негативні наслідки – формування резистентності до антибіотиків та хіміотерапевтичних засобів [14].

Мета дослідження – визначити антибактеріальні та антифунгальні властивості емоксипіну (метилетилпіридинолу гідрохлориду) та його вплив на специфічну активність антимікробних засобів.

Матеріали та методи. Для визначення чутливості мікроорганізмів до емоксипіну готували 20 % розчин цієї субстанції на воді для ін'єкцій. Субстанцію препарату було надано для дослідження ПАТ «Лубнифарм» (Україна). Концентрацію основного розчину вибирали згідно з даними літератури [13] таким чином, щоб відома з цього джерела концентрація препарату, яка пригнічує ріст культури *E. coli*, знаходилась у середині діапазону серійних розведень.

Використовували еталонні штами *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990 та *C. albicans* ATCC10231, одержані з ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л. В. Громашевського НАМН України» (м. Київ). Із зазначених штамів бактерій готували добові культури на скошеному поживному агарі (ТОВ «Фармактив», Україна) при температурі +37 °С. *C. albicans* культивували на агарі Сабуро (ТОВ «Фармактив», Україна) 48 год при +30–32 °С.

Одержані культури використовували для приготування інокулятів. Дослідження проводили стандартним методом серійних розведень, визначаючи для кожної тест-культури мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) та мінімальну бактерицидну (або фунгіцидну) концентрацію (МБК або МФК) емоксипіну [15]. У ході роботи з основного розчину препарату готували всі наступні розведення в живильному середовищі (поживний бульйон ТОВ «Фармактив», Україна), після чого до кожного розведення додавали тест-культури *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990 або *C. albicans* ATCC 10231 (10^6 мікробних тіл/1 мл). В останню пробірку вносили 1 мл бульйону та 0,1 мл суспензії бактерій або грибів (контроль культури). Посіви інкубували 24 год при + 37 °С у разі використання еталонних штамів бактерій або 48 год при + 30–32 °С для *C. albicans*, після чого відмічали результати за ступенем помутніння живильного середовища. Остання пробірка з прозорим середовищем вказувала на затримку росту мікроорганізмів під впливом МІК досліджуваного препарату. Для визначення МБК та МФК описане вище визначення МІК доповнювали другим етапом, на якому з пробірок, де немає ознак накопичення бактерійної маси, робили висів на сектори агару чи середовища Сабуро в чашках Петрі й через 24 або 48 год інкубації відмічали наявність росту мікроорганізмів, беручи за МБК найменшу концентрацію препарату, яка показала бактерицидний чи фунгіцидний ефект [15]. Зазначені дослідження повторювали тричі.

Комбіновану дію емоксипіну та відомих антимікробних засобів вивчали диско-дифузійним методом [16]. Використовували клінічний штам *E. coli*, який попередньо був перевірений на чутливість до рекомендованих антибіотиків основних класів [16]. За прийнятими критеріями [16], він характеризувався чутливістю до ампіциліну (19 мм), цефазоліну (22 мм), цефтріаксону (25 мм), амікацину (20 мм), доксацикліну (19 мм), хлорамфеніколу (23 мм), норфлоксацину (30 мм), ципрофлоксацину

(31 мм), ко-тримоксазолу (20 мм), нітрофурантоїну (22 мм) та проміжною чутливістю до цефтазидиму (15 мм) і тетрацикліну (17 мм).

На порожні стерильні паперові диски діаметром 6 мм (Munktell, Швеція) наносили 50 мкл 20 % розчину емоксипіну – 1000 мкг/диск. Антисептик хлоргексидину біглюконат у вигляді 0,05% водного розчину (Хімфармзавод «Червона зірка», Україна) наносили на порожні диски – 25 мкг/диск. Також використовували стандартні паперові диски з антибіотиками та синтетичними хіміотерапевтичними засобами («Система Оптимум», Україна), які обирали з урахуванням спектра дії: цефтазидим (30 мкг/диск), тетрациклін (30 мкг/диск), норфлоксацин (10 мкг/диск), нітрофурантоїн (300 мкг/диск). На частину дисків з антимікробними засобами додатково наносили по 50 мкл 20 % розчину емоксипіну – 1000 мкг/диск. Диски висушували при кімнатній температурі й застосовували для визначення чутливості вказаного вище штаму *E. coli*. Зони затримки росту мікроорганізмів визначали через 24 год. Результати статистично обробляли за стандартними комп'ютерними програмами Microsoft Excel. Вірогідність різниці між групами визначали з використанням критерію *t* Стьюдента з поправкою Бонферроні [17] при порівнянні трьох груп (емоксипін – антимікробний засіб – антимікробний засіб + емоксипін), граничний рівень $p < 0,017$.

Результати та їх обговорення. При вивченні впливу емоксипіну на еталонні штами кишкової палички, стафілококу та дріжджоподібних грибів показано здатність препарату пригнічувати ріст цих культур мікроорганізмів у рідкому середовищі, що повністю співпадало в трьох повторних визначеннях (табл. 1).

Видиме накопичення бактерійної маси тест-культури *E. coli* ATCC 25922 було відсутнє за концентрацій емоксипіну 10 000 та 5000 мкг/мл, тобто МІК досліджуваного препарату становила 5000 мкг/мл. Пересів обох цих розведень на тверде середовище продемонстрував повну відсутність росту мікроорганізмів. Це означало, що МБК емокс-

Таблиця 1

Антимікробна активність емоксипіну щодо музейних штамів мікроорганізмів

Музейний штам мікроорганізму	Концентрація емоксипіну, мкг/мл								
	10 000	5000	2500	1250	625	312	156	78	39
<i>E. coli</i> ATCC 25922	–	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	–	–	–	–	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	–	–	–	–	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	–	–	+	+	+	+	+	+	+

Примітка. «–» – відсутність росту мікроорганізмів; «+» – наявність росту мікроорганізмів.

сипіну стосовно *E. coli* ATCC 25922 співпадало з МІК.

При дослідженні дії препарату на музейний штам *S. aureus* було встановлено відсутність росту тест-культури за концентрацій емоксипіну 10 000–1250 мкг/мл, МІК становила 1250 мкг/мл (табл. 1), а МБК – 5000 мкг/мл.

Чутливість музейного штаму *S. epidermidis* до досліджуваного препарату була подібна до такої в *S. aureus* ATCC 25923 і відрізнялася лише нижчим значенням МБК, яка дорівнювала 2500 мкг/мл.

Під впливом емоксипіну пригнічення росту *C. albicans* спостерігалось за концентрацій 10 000–5000 мкг/мл, тобто МІК дорівнювала 5000 мкг/мл (табл. 1). При пересіві на тверде живильне середовище цих розведень росту грибів не було. Це вказує, що МФК емоксипіну стосовно *C. albicans* ATCC10231 становила 5000 мкг/мл.

Отже, емоксипін демонстрував пригнічуючу дію на еталонні штами грам-позитивних коків, кишкової палички та дріжджоподібних грибів, що свід-

чить про наявність у нього антимікробних властивостей та певну широту спектра дії. МІК препарату залежала від виду мікроорганізму й була в діапазоні 1250–5000 мкг/мл. Такі результати узгоджуються з даними літератури про виразний антимікробний ефект емоксипіну стосовно штаму *E. coli* ATCC 25922 за концентрацій препарату 2–4 ммоль/л (315–730 мкг/мл) [13]. Деякі вищі значення бактеріостатичних концентрацій в нашому дослідженні, вочевидь, можуть пояснюватись візуальною оцінкою результату, тоді як у зазначеній роботі було використано апаратне денситометричне визначення оптичної густини бактерійних суспензій [13]. Ці автори вважають ефект емоксипіну бактеріостатичним і припускають, що його механізм полягає в інгібуванні синтезу білка [12, 13], однак, бактерицидність певних концентрацій препарату та його вплив як на бактерії, так і на гриби не дозволяє повністю прийняти таке припущення. На нашу думку, скоріше за все, у

Таблиця 2

Чутливість *E. coli* до антимікробних засобів та емоксипіну, $M \pm m$, ($n = 5$)

Препарат на диску	Діаметр зони затримки росту, мм		
	емоксипін	антимікробний засіб	антимікробний засіб + емоксипін
Емоксипін, 1000 мкг/диск	19,2 ± 4,0	–	–
Хлоргексидину біглюконат, 25 мкг/диск.	–	19,2 ± 3,3	25,8 ± 2,0
Норфлоксацин, 10 мкг/диск	–	29,6 ± 2,9	35,2 ± 0,8*
Нітрофурантоїн, 300мкг/диск	–	22,4 ± 2,1	30,0 ± 3,3
Цефтазидим, 30 мкг/диск	–	14,8 ± 2,5	28,2 ± 3,0**
Тетрациклін, 30 мкг/диск	–	17,0 ± 2,1	32,4 ± 3,4**

Примітка. *Вірогідно порівняно з емоксипіном, **вірогідно порівняно з антимікробним засобом без емоксипіну.

мікробній клітині емоксипін діє на ті самі мішені, що й у клітинах макроорганізму – енергетичні процеси, структуру й функції мембран.

Емоксипін не тільки виявляв власну протимікробну дію, а й збільшував чутливість мікроорганізмів до інших антимікробних засобів, що було показано на прикладі штаму *E. coli* (табл. 2).

Після 24 год інкубації зони відсутності росту бактерій навколо дисків з норфлоксацином були більші на 10,4 мм ($p < 0,1$), а навколо дисків з хлоргексидином, нітрофурантоїном, цефтазидимом і тетрацикліном не мали відмінностей порівняно з такими з емоксипіном. Діаметр зони затримки бактерійного росту при поєднанні норфлоксацину з емоксипіном перевищував аналогічний показник при застосуванні окремо взятого емоксипіну в середньому на 16 мм ($p < 0,005$). У всіх інших випадках чутливість тест-культури кишкової палички до комбінацій антимікробних засобів з емоксипіном вірогідно не відрізнялася від такої до окремо взятого емоксипіну (табл. 2).

При цьому комбінована дія хлоргексидину та емоксипіну не викликала збільшення зони інгібування росту *E. coli* порівняно з цим антисептиком без додавання досліджуваного засобу (табл. 2). Комбінування з емоксипіном сприяло тенденції до збільшення ефектів фторхінолону на 5,6 мм ($p < 0,1$) та нітрофурантоїну на 7,6 мм ($p < 0,1$). При поєднанні емоксипіну з цефтазидимом і

тетрацикліном зони інгібування росту культури *E. coli* збільшувалися відповідно на 13,4 мм ($p < 0,01$) та на 15,4 мм ($p < 0,005$) порівняно з такими для самих цих антибіотиків.

Як бачимо, емоксипін був здатний посилювати чутливість *E. coli* до антибіотиків різного механізму дії, що узгоджується з даними інших дослідників [11, 13]. З огляду на власну антимікробну активність емоксипіну такий синергізм можна розцінювати як сумачію. Вочевидь антимікробну дію широкого спектра й синергізм з певними антибіотиками можна вважати закономірними складовими фармакодинаміки емоксипіну (метилетилпіридинолу гідрохлориду), які слід враховувати при клінічному застосуванні препарату, особливо в комбінованій терапії інфекцій.

Висновки

1. Емоксипін (метилетилпіридинолу гідрохлорид) виявляє антибактеріальну дію стосовно еталонних штамів *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990 та антифунгальний ефект стосовно *C. albicans* ATCC 10231 з МІК 1250–5000 мкг/мл, МБК 2500–5000 мкг/мл та МФК 5000 мкг/мл.
2. Емоксипін діє синергічно з антибіотиками, підвищуючи чутливість *E. coli* до цефтазидиму й тетрацикліну при 24 год інкубації.

1. Дюмаев К. М. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС / К. М. Дюмаев, Т. А. Воронина, Л. Д. Смирнов. – Москва, 1995. – 272 с.
2. Машковский М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский; под ред. Н. А. Литвина. – [16-е изд., перераб., испр. и доп.]. – Москва: АО «Издательство Новая волна», 2012. – 1216 с.
3. Офтальмология: национальное руководство / [Егоров Е. А., Алексеев В. Н., Аклаева Н. и др.]; под ред. Е. А. Егорова, С. Э. Аветисова, Л. К. Мошетовой. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 944 с.
4. Опыт применения эмоксипина в комплексном лечении полиорганной недостаточности у новорожденных детей / П. И. Миночкин, И. А. Волчегорский, Д. К. Волосников [и др.] // Педиатрия. – 2011. – Т. 90, № 4. – С. 98–103.
5. Пасевич С. П. Антиоксидантный потенциал похідних 3-оксипіридину за умов хронічної гіпоксичної гіпоксії / С. П. Пасевич, І. І. Заморський // Український біофармацевтичний журнал. – 2014. – № 5 (34). – С. 9–11.
6. Механизмы восстановления коронарного протока изолированного сердца в период реперфузии при кардиопротекции липосомальной формой эмоксипина / Я. Г. Торопова, Л. В. Антонова, Р. А. Мухамадияров [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2013. – № 6 (99). – С. 755–761.
7. Ясенявская А. Л. Влияние антиоксидантов на нейроэндокринный статус в условиях иммобилизационного стресса / А. Л. Ясенявская, М. А. Самотруева, С. А. Лужнова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014 – № 8. – С. 57–59.

8. Пашкевич И. В. Динамика показателей перекисного окисления липидов в сыворотке крови под влиянием производных 3-оксипиридина при индуцированных и перевиваемых неоплазиях / И. В. Пашкевич, Е. О. Букаева, Н. А. Плотникова // Современные технологии в медицине. – 2011. – № 3. – С. 110–112.
9. Изменение состава микробиоценоза толстого кишечника и антиоксидантных свойств колоноцитов в условиях экспериментального дисбиоза и профилактики эмоксипином / А. В. Агейченко, П. В. Калущий, О. А. Медведева [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2015. – № 4. – С. 84–88.
10. Влияние некоторых антиоксидантов на течение экспериментального перитонита / А. Г. Мирошниченко, В. М. Брюханов, Л. Ю. Бутакова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 9. – С. 1057–1060.
11. Фармакологические и микробиологические аспекты влияния метилэтилпиридинола на активность цефтазидима *in vitro* / А. Г. Мирошниченко, В. М. Брюханов, Л. Ю. Бутакова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2. – С. 124–130.
12. Антиоксидантная модуляция чувствительности *Klebsiella pneumoniae* к цефтазидиму / А. Г. Мирошниченко, В. М. Брюханов, Л. Ю. Бутакова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 3. – С. 337–341.
13. Влияние антиоксидантов на развитие чистой культуры *Escherichia coli* и ее чувствительность к гентамицину / А. Г. Мирошниченко, В. М. Брюханов, Л. Ю. Бутакова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 5. – С. 339–343.
14. Максимов Ю. Н. Ятрогенный фактор в формировании резистентности микроорганизмов к химиотерапевтическим средствам / Ю. Н. Максимов, Н. А. Врынчану // Современные проблемы токсикологии. – 2008. – № 3. – С. 58–60.
15. Практична мікробіологія: Посібник / С. І. Климнюк, І. О. Ситник, М. С. Творко, В. П. Широбоков. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 440 с.
16. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04) / С. А. Семина, С. В. Сидоренко, С. П. Резван и др.; утв. главн. гос. сан. врачом РФ Г. Г. Онищенко 04.03.2004 // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2004. – Т. 6, № 4. – С. 306–359.
17. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – [пер. с англ. Ю. А. Данилова]. – Москва: Практика, 1999. – 459 с.

Боброва Н. О., Важнича О. М.

Антимікробні властивості метилетилпіридинолу

Мета дослідження – вивчення антибактеріальних та антифунгальних властивостей емоксипіну (метилетилпіридинолу гідрохлориду) та його впливу на специфічну активність антимікробних засобів. Ефект препарату стосовно розвитку культур *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990 та *C. albicans* ATCC10231 визначали стандартним методом серійних розведень. Комбіновану дію емоксипіну та антимікробних засобів (хлоргексидину, норфлоксацину, нітрофурантоїну, цефтазидиму, тетрацикліну) на культуру *E. coli* вивчали диско-дифузійним методом. Показано, що емоксипін має пригнічуючу дію на еталонні штами стафілококів, кишкової палички та дріжджоподібних грибів, що свідчить про наявність у нього антимікробних властивостей та їхній широкий спектр. Мінімальні інгібуючі концентрації препарату знаходяться в діапазоні 1250–5000 мкг/мл. Емоксипін також здатний посилювати чутливість *E. coli* до антибіотиків різного механізму дії і виявляє синергізм з цефтазидимом та тетрацикліном.

Ключові слова: емоксипін, метилетилпіридинол, антимікробна дія, чутливість мікроорганізмів

Н. А. Боброва, Е. М. Важнича

Антимикробные свойства метилэтилпиридинола

Цель исследования – изучение антибактериальных и антифунгальных свойств эмоксипина (метилэтилпиридинола гидрохлорида) и его влияния на специфическую активность антимикробных средств. Эффект препарата в отношении развития культур *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990 и *C. albicans* ATCC10231 определяли стандартным методом серийных разведений. Комбинированное действие эмоксипина и антимикробных средств (хлоргексидина, норфлоксацина, нитрофурантоина, цефтазидима, тетрациклина) на культуру *E. coli* изучали диско-диффузионным методом. Показано, что эмоксипин оказывает угнетающее действие на эталонные штаммы стафилококков, кишечной палочки и дрожжеподобных грибов, что свидетельствует о наличии у него антимикробных свойств и их широком спектре. Минимальные ингибирующие концентрации препарата находятся в диапазоне 1250–5000 мкг/мл. Эмоксипин также способен усиливать чувствительность *E. coli* к антибиотикам и проявляет синергизм с цефтазидимом и тетрациклином.

Ключевые слова: эмоксипин, метилэтилпиридинол, антимикробное действие, чувствительность микроорганизмов

N. A. Bobrova, E. M. Vazhnichaya
Antimicrobial properties of methylethylpyridinol

Emoxypine (methylethylpyridinol hydrochloride) is well known 3-hydroxypyridine derivative used in ophthalmology, cardiology and other branches of medicine due to its antioxidant and antihypoxic properties, but data on antimicrobial effects of the drug are limited and contradictory. Presented article is devoted to studying the antibacterial and antifungal properties of emoxypine and its influence on the specific activity of antimicrobial agents. The effect of the drug on the development of cultures of *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990 and *C. albicans* ATCC 10231 was determined by the standard serial dilution method. Combined action of emoxypine and other antimicrobials (chlorhexidine, norfloxacin, nitrofurantoin, ceftazidime, and tetracycline) on the culture of *E. coli* was studied by disc diffusion method. It is shown that emoxypine has an inhibitory effect on the reference strains of staphylococci, coli bacillus and Candida fungi, suggesting that it has antimicrobial properties of wide spectrum. Minimal inhibitory concentrations of the drug range between 1250–5000 µg/ml. Among the studied strains, *S. epidermidis* ATCC 14990 is the most susceptible to the drug. Emoxypine also is able to enhance the susceptibility of *E. coli* strain to antibiotics. This synergism is clearly manifested in the combination with ceftazidime or tetracycline, when emoxypine adding the growth inhibition zone of test culture increases by 1,9 times as compared with the parent antibiotic. Changes in the activity of fluorquinolone, nitrofurantoin, or detergent antiseptic combined with emoxypine are not significant. It is supposed that cell membrane and energy processes in the microbial cell are targets for bactericidal or fungicidal action of emoxypine. The data obtained indicate that antimicrobial action is a characteristic part of methylethylpyridinol's pharmacodynamics that should be taken into account when the drug is used in the combined therapy of infections.

Key words: emoxypine, methylethylpyridinol, antimicrobial action, microorganisms' susceptibility

Надійшла: 21 січня 2016 р.

Контрактна особа: Важнича Олена Митрофанівна, доктор медичних наук, професор, кафедра експериментальної та клінічної фармакології, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», Тел.: + 38 0 66 634 72 73. Електронна пошта: vazhnichaya@ukr.net