

УДК 576.852.22

К.В. Типлинська, О.В. Советова,
В.Ю. Горчаков

АДАПТАЦІЯ ДИСКОВОГО МЕТОДУ ДЛЯ ЕКСПРЕС-ОЦІНКИ СТІЙКОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО ЦИТОСТАТИКІВ

Вступ

Побічні реакції лікарських засобів займають важливе місце в структурі захворюваності та смертності. Щорічно ускладнення лікарської терапії онкохворих лише в США розвиваються більше ніж у 1 млн госпіталізованих хворих та є причиною смерті близько 180 тис. [1]. Ускладнення при протипухлинній терапії зумовлені передусім потенційною токсичністю протипухлинних засобів і антибіотиків [2]. Висока частка їх при лікуванні онкохворих з боку шлунково-кишкового тракту поряд з постійним зростанням захворюваності (щорічний приріст рівня захворюваності становить 0,6 % [3]) зумовлюють актуальність пошуку ефективних засобів корекції і лікування цих порушень. Одними з перспективних препаратів є пробіотики. На сьогодні, на жаль, проводяться тільки окремі спостереження за позитивним впливом пробіотичних препаратів на стан онкохворих. Системні ж дослідження використання пробіотиків в онкології лише розпочинаються. Досі не визначено ані оптимальних доз препаратів, ані стійкості продуцентів цих препаратів до різних курсів хіміотерапії. При відборі штамів для створення пробіотичних препаратів актуальним є використання методик швидкої оцінки багатьох штамів до певних параметрів. Тому при створенні препаратів для супроводжувальної терапії онкохворих при проведенні хіміотерапії необхідно є розробка методу швидкої оцінки великої кількості штамів на чутливість до цитостатиків.

Постановка задачі

Основною метою дослідження є створення методики швидкої оцінки великої кількості штамів мікроорганізмів до цитостатиків.

Матеріали і методи експериментальних досліджень

За об'єкти дослідження взято штами лактобактерій з музею культур кафедри промисло-

вої біотехнології ФБТ НТУУ "КПІ" та штами, виділені з промислових пробіотичних препаратів: *L. acidophilus* A, *L. acidophilus* EP317/402, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB51 IMB B-2700, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКПМ-B-5788, *L. delbrueckii subsp. lactis* LE, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* B-2671, *L. murinus* DSM20452, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* LB3, *L. rhamnosus* R, *L. rhamnosus* DIV-US. Досліджувалися також сапрофітні і умовно патогенні штами: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* УКМ B-906 (ATCC 25922), *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* УКМ B 4001 (ATCC 65388), *Candida tropicalis*. При дослідженні були використані найбільш вживані в онкологічній практиці препарати доксорубіцин-КМП (Київмедпрепарат, Україна, Київ), цисплатин "Ебеве" (Ebewe Pharma, Австрія), метотрексат "Ебеве" (Ebewe Pharma, Австрія).

Визначення мінімальної пригнічувальної концентрації (МПК) цитостатиків для культур проводилось у мікрокількостях на планшетах. Для кожного досліджуваного препарату створювався індивідуальний градієнт концентрацій розведенням у середовищі MRS. Далі 0,1 мл досліджуваних розчинів вносились у лунки планшета. У кожену лунку додавалось 0,01 мл суспензії культури стандарту мутності 0,5 McFarland. Планшети герметизувались парафільмом і термостатувались при 37 °C 72 год.

При визначенні МПК цитостатиків використовувались такі концентрації, як доксорубіцин 15 ТЕК–120 ТЕК, метотрексат 7 ТЕК–48 ТЕК та цисплатин 27 ТЕК–128 ТЕК. Проводилось визначення у 96-лункових культуральних мікропланшетах.

За основу розроблюваної методики було покладено метод дифузії в агар. На поверхню чашки Петрі з 25 мл щільного середовища MRS газоном висівались тестові культури, на які накладались диски діаметром 5 мм, змочені досліджуваним цитостатиком. Чашки термостатувались протягом 72 год, після чого вимірювались діаметри зон затримки росту. Для інтерпретації даних було побудовано залежності $\log(V) = f(d)$.

Інтерпретація отриманих даних проводилась методом найменших квадратів у середовищі MathCad. Оскільки з літературних даних відомо, що зменшення концентрації в напрямку дифузії описується логарифмічною функцією, то залежність $\log(V) = f(d)$ має лінійний вигляд.

Результати і обговорення

Для отримання залежностей використовувались такі штами: *L. acidophilus* EP317/402, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB51 IMB B-2700, *L. delbrueckii subsp. lactis* LE та *L. rhamnosus* LB3 IMB B-7038.

Результати визначення МПК подано в табл. 1.

Таблиця 1. Найменша концентрація, яка пригнічувала ріст культур

Досліджуваний штам	Концентрація цитостатику, мкг/мл		
	Доксорубіцин	Метотрексат	Цисплатин
<i>L. acidophilus</i> EP317/402	28,4	3150	90,88
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> LB51 IMB B-2700	71	2450	153,36
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> LE	63,9	5600	164,72
<i>L. rhamnosus</i> LB3 IMB B-7038	78,1	2800	176,08

Далі зіставлялись зони затримки росту культур навколо дисків, змочених цитостатиками, і отриманих МПК препаратів (табл. 2).

Одержані дані оброблялись методом найменших квадратів у середовищі MathCad з отриманням графічних і математичних залежностей.

Для доксорубіцину після обробки даних отримано таку залежність (рис. 1):

$$\log(V) = -0,598 - 0,058d,$$

для метотрексату (рис. 2) –

$$\log(V) = 0,923 - 0,201d,$$

для цисплатину (рис. 3) –

Таблиця 2. Зони затримки росту досліджуваних культур навколо дисків, змочених цитостатиками

Досліджуваний штам	Зона затримки росту, мм	МПК препарату, мкг/мл	Зона затримки росту, мм	МПК препарату, мкг/мл	Зона затримки росту, мм	МПК препарату, мкг/мл
	Доксорубіцин		Метотрексат		Цисплатин	
<i>L. acidophilus</i> EP317/402	16	28,4	28	3150	13,5	90,88
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> LB51 IMB B-2700	10	71	19	2450	8	153,36
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> LE	11	63,9	10	5600	7	164,72
<i>L. rhamnosus</i> LB3 IMB B-7038	8	78,1	23	2800	5	176,08

$$\log(V) = 1,693 - 0,355d,$$

де V – МПК цитостатику; d – зона затримки росту культури навколо диска з досліджуваним цитостатиком.

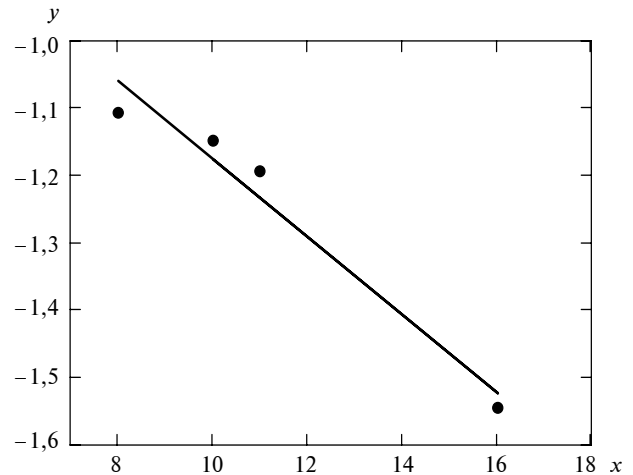


Рис. 1. Залежність $\log(V) = f(d)$ для доксорубіцину: — — $y(x)$; ● — експериментальні дані

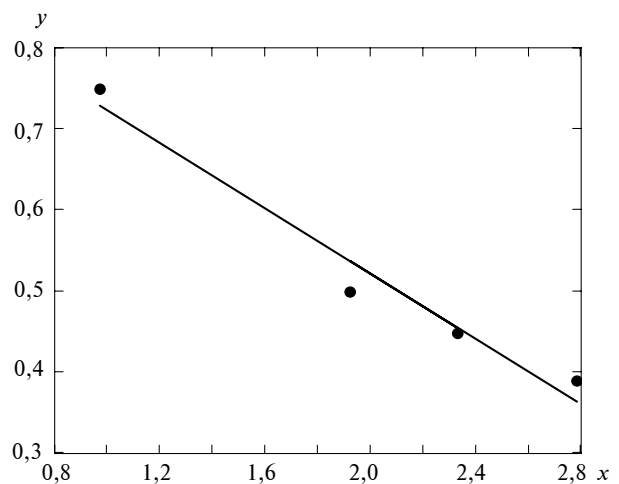


Рис. 2. Залежність $\log(V) = f(d)$ для метотрексату; позначення такі, як на рис. 1

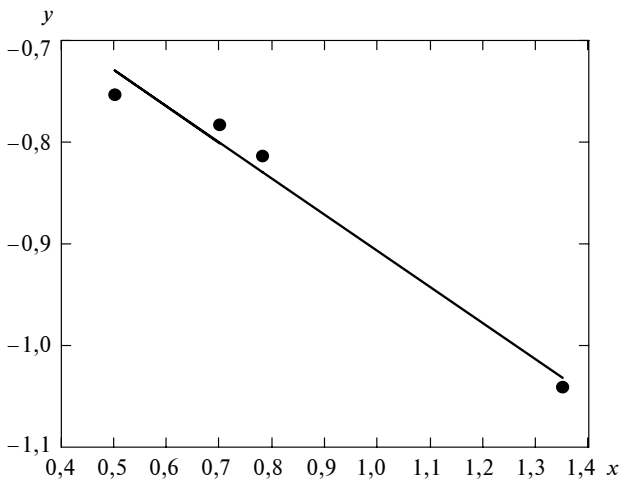


Рис. 3. Залежність $\log(V) = f(d)$ для цисплатину; позначення такі, як на рис. 1

Отримані залежності мають лінійний характер, що підтверджується літературними даними.

Далі визначалась правильність одержаних залежностей, а отже, й працездатність методики. Для цього було визначено зони затримки росту для інших штамів. Після цього обчислю-

вались їх МПК за допомогою отриманих залежностей. Потім для трьох штамів (*L. acidophilus* А, *L. rhamnosus* R і *L. plantarum* ЛБ) визначалась точність обрахунку МПК. З цією метою культури висівались у середовища з цитостатиками в концентраціях, вищих за обчислені МПК, які приблизно дорівнювали обрахованим МПК або були нижчі за обраховані МПК. Культури вирощувались протягом 72 год, після чого визначалась наявність росту.

За допомогою розробленої методики було визначено чутливість до трьох досліджуваних препаратів інших штамів лактобактерій з музею кафедри промислової біотехнології ФБТ (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКПМ-В-5788 і *L. delbrueckii subs. delbrueckii* ІМВ В-2671) та продуцентів пробіотичних препаратів (*L. acidophilus* EP317/402, *L. acidophilus* А, *L. rhamnosus* R, *L. plantarum* ЛБ, *L. rhamnosus* DIV-US). Визначались зони затримки росту і для деяких умовно патогенних штамів. Отримані дані наведено на рис. 4.

На рис. 4 препарати позначені так: 1 – *L. acidophilus* EP317/402; 2 – *L. acidophilus* А;

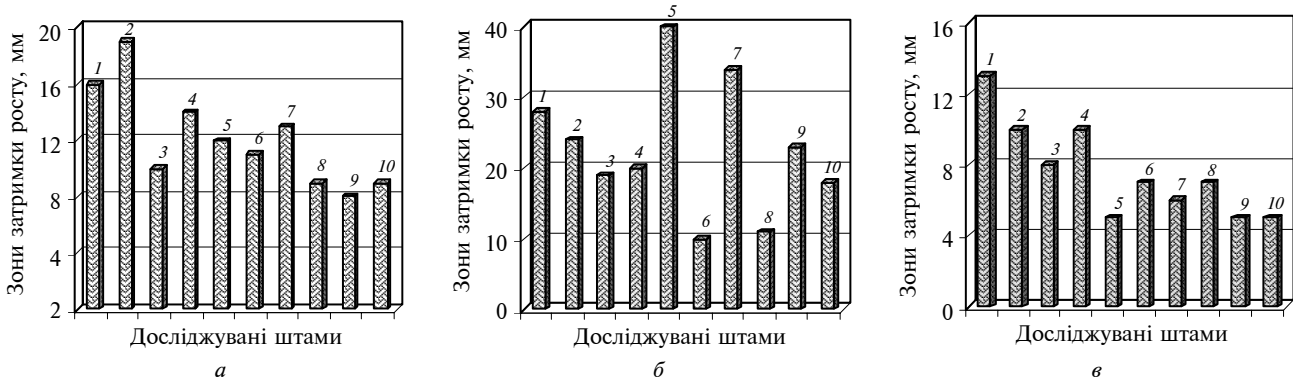


Рис. 4. Зони затримки росту досліджуваних лактобактерій навколо дисків, змочених цитостатиками: а – доксорубіцином; б – метотрексатом; в – цисплатином

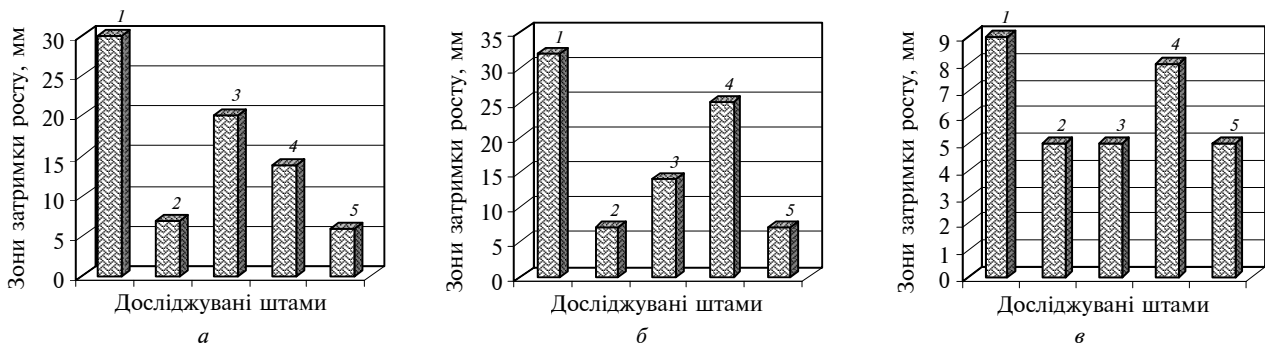


Рис. 5. Зони затримки росту досліджуваних умовно патогенних штамів навколо дисків, змочених цитостатиками: а – доксорубіцином; б – метотрексатом; в – цисплатином; 1 – *Bacillus subtilis*; 2 – *Escherichia coli* УКМ В-906; 3 – *Pseudomonas fluorescens*; 4 – *Staphylococcus aureus* УКМ В 4001; 5 – *Candida tropicalis*

3 – *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB51 IMB B-2700; 4 – *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКПМ-В-5788; 5 – *L. delbrueckii subs. delbrueckii* IMB B-2671; 6 – *L. delbrueckii subsp. lactis* LE; 7 – *L. plantarum*; 8 – *L. rhamnosus* DIV-US; 9 – *L. rhamnosus* LB3 IMB; 10 – *L. rhamnosus* R.

За отриманими даними, найбільшу стійкість до доксорубіцину проявили штами *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB51 IMB B-2700, *L. rhamnosus* DIV-US, *L. rhamnosus* LB3 IMB, *L. rhamnosus* R, найменшу – *L. acidophilus* EP317/402, *L. acidophilus* A. До метотрексату найстійкішими виявились *L. delbrueckii subsp. lactis* LE, *L. rhamnosus* DIV-US, а найчутливішими – *L. acidophilus* EP317/402, *L. delbrueckii subs. delbrueckii* IMB B-2671, *L. plantarum*. До цисплатину майже всі штами проявили високу стійкість. Найбільш чутливими були *L. acidophilus* EP317/402, *L. acidophilus* A, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКПМ-В-5788. Отже, найчутливішими до всіх досліджуваних цитостатиків виявились культури виду *L. acidophilus*, а найменш чутливими – *L. rhamnosus*. Серед штамів виду *L. delbrueckii* спостерігалась значна варіабельність як у чутливості до різних груп цитостатиків, так і в чутливості представників різних штамів до певного препарату.

Визначення МПК для умовно патогенних штамів. Важливим є вивчення стійкості до ци-

тостатиків умовно патогенних мікроорганізмів (див. рис. 5), адже саме їх розвиток спричиняє велику кількість супутніх захворювань онкохворих. Дослідження проводилось методом дифузії в агар.

З отриманих даних можна зробити висновок, що найстійкішими до досліджуваних цитостатиків є культури *Escherichia coli* і *Candida tropicales*. Опосередковано це також підтверджується літературними даними, адже найчастішими збудниками діареї в онкохворих є гемолітичні штами *Escherichia coli* [4] і генералізовані кандидози [5].

Для перевірки адекватності отриманих математичних залежностей було проведено обрахунок МПК цитостатиків за визначеними зонами затримки росту. Отримані результати містяться в табл. 3 і 4.

Для трьох штамів (*L. acidophilus* A, *L. rhamnosus* R і *L. plantarum* ЛБ) проводились визначення точності обрахунку. Отримані результати подані в табл. 5–7. Вони підтверджують правильність обрахунку МПК.

Отже, можна дійти висновку, що методика, яка розроблялась, працює адекватно.

Оскільки умовно патогенні штами вирощувались на інших середовищах (МПА і МПА з додаванням глюкози), ніж лактобактерії, то необхідною була перевірка отриманих МПК.

Таблиця 3. Визначення МПК цитостатиків для досліджуваних культур лактобактерій за зонами затримки росту

Препарат	Дані	Досліджуваний штам									
		<i>L. acidophilus</i> EP317/402	<i>L. acidophilus</i> A	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> LB51 IMB B-2700	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> LB86 ВКПМ-В-5788	<i>L. delbrueckii subs. delbrueckii</i> IMB B-2671	<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> LE	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i> DIV-US	<i>L. rhamnosus</i> LB3 IMB	<i>L. rhamnosus</i> R
Доксорубіцин	D, мм	16	19	10	14	12	11	13	9	8	9
	log(V)	-1,53	-1,7	-1,18	-1,41	-1,29	-1,24	-1,35	-1,12	-1,06	-1,12
	V, мкг	29,79	19,95	66,37	38,90	50,82	58,08	44,46	75,86	86,70	75,86
Метотрексат	D, мм	28	24	19	20	40	10	34	11	23	18
	log(V)	0,36	0,44	0,54	0,52	0,12	0,72	0,24	0,70	0,46	0,56
	V, мкг	2307	2773	3491	3334	1327	5284	1750	5047	2904	3656
Цисплатин	D, мм	13	10	8	10	5	7	6	7	5	5
	log(V)	-1,04	-0,91	-0,84	-0,91	-0,73	-0,81	-0,77	-0,81	-0,73	-0,73
	V, мкг	95,28	122,18	144,21	122,18	184,93	156,68	170,22	156,68	184,93	184,93

Результати визначення МПК для цих культур наведено в табл. 8–11.

В цілому отримані результати підтверджують теоретично розраховані. Отже, методика

виявилась працездатною і для визначення чутливості культур до цитостатиків та на інших середовищах.

Таблиця 4. Визначення МПК цитостатиків для досліджуваних умовно патогенних культур за зонами затримки росту

Препарат	Дані	Досліджуваний штам				
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> УКМ В-906	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> УКМ В 4001	<i>Candida tropicalis</i>
Доксорубіцин	<i>D</i> , мм	30	7	20	14	6
	$\log(V)$	-2,34	-1,00	-1,76	-1,41	-0,946
	<i>V</i> , мкг	4,59	99,08	17,46	38,9	113,24
Метотрексат	<i>D</i> , мм	32	7	14	25	7
	$\log(V)$	0,28	0,78	0,64	0,42	0,78
	<i>V</i> , мкг	1919	6067	4395	2649	6067
Цисплатин	<i>D</i> , мм	9	5	5	8	5
	$\log(V)$	-0,88	-0,73	-0,73	-0,84	-0,73
	<i>V</i> , мкг	132,74	184,93	184,93	144,21	184,93

Таблиця 5. Визначення точності обрахунку МПК для доксорубіцину

Характеристика	Культура								
	<i>L. rhamnosus</i> R			<i>L. plantarum</i>			<i>L. acidophilus</i> A		
Концентрація цитостатику, мкг/мл	85,2	78,1	71	56,8	49,7	42,6	24,85	21,3	19,53
Наявність росту	-	-	+	-	-	+	-	-	+

Таблиця 6. Визначення точності обрахунку МПК для метотрексату

Характеристика	Культура								
	<i>L. rhamnosus</i> R			<i>L. plantarum</i>			<i>L. acidophilus</i> A		
Концентрація цитостатику, мкг/мл	4200	3850	4200	3150	2800	2450	1925	1750	1575
Наявність росту	-	-	+	-	-	+	-	+	+

Таблиця 7. Визначення точності обрахунку МПК для цисплатину

Характеристика	Культура								
	<i>L. rhamnosus</i> R			<i>L. plantarum</i>			<i>L. acidophilus</i> A		
Концентрація цитостатику, мкг/мл	306,72	244,24	181,76	176,08	170,4	164,72	153,36	122,12	90,88
Наявність росту	-	-	+	-	-	+	-	+	+

Таблиця 8. Визначення точності обрахунку МПК цитостатиків для *Escherichia coli*

Характеристика	Препарат								
	Доксорубіцин			Метотрексат			Цисплатин		
Концентрація цитостатику, мкг/мл	113,6	99,4	85,2	7000	6300	5600	306,72	244,24	181,78
Наявність росту	-	-	+	-	-	+	-	-	+

Таблиця 9. Визначення точності обрахунку МПК цитостатиків для *Pseudomonas fluorescens*

Характеристика	Препарат								
	Доксорубіцин			Метотрексат			Цисплатин		
Концентрація цитостатику, мкг/мл	24,85	21,3	19,53	4900	4550	4200	306,72	244,24	181,78
Наявність росту	-	-	-	-	-	+	-	-	+

Таблиця 10. Визначення точності обрахунку МПК цитостатиків для *Staphylococcus aureus*

Характеристика	Препарат								
	Доксорубіцин			Метотрексат			Цисплатин		
Концентрація цитостатику, мкг/мл	42,6	39,05	35,53	3150	2800	2450	164,72	153,36	90,88
Наявність росту	–	–	+	–	–	+	–	–	+

Таблиця 11. Визначення точності обрахунку МПК цитостатиків для *Candida tropicalis*

Характеристика	Препарат								
	Доксорубіцин			Метотрексат			Цисплатин		
Концентрація цитостатику, мкг/мл	127,8	113,6	99,43	7000	6300	5600	306,72	244,24	181,76
Наявність росту	–	–	+	–	–	+	–	–	+

Працездатність методики на інших середовищах можна пояснити наявністю агару в усіх досліджуваних середовищах, тобто на швидкість дифузії цитостатиків у середовище впливає переважно діаметр пор, які утворюються агаром. Компонентний склад поживних середовищ відіграє менш важливу роль, тому при проведенні подальших досліджень чутливості культур до цитостатиків особливу увагу слід приділяти підготовці поживних середовищ, тобто внесенню необхідної кількості агару (2 %).

Висновки

Методика швидкого визначення чутливості мікроорганізмів до цитостатиків на основі методу дифузії в агар та перевірка її працездат-

ності виявились дієвими для напівсинтетичних поживних середовищ з вмістом агару 2 %.

З лактобактерій найстійкішими до дії всіх досліджуваних цитостатиків виявились штами виду *L. rhamnosus*, а найчутливішими – *L. acidophilus*. З умовно патогенної флори найбільшу стійкість мали *Escherichia coli* і *Candida tropicalis*, а найменшу – *Bacillus subtilis*. Чутливість до різних груп цитостатиків була видоспецифічною, а в деяких випадках навіть штамоспецифічною.

Дослідження проводилось при підтримці гранту НТУУ “КПІ” для фінансової підтримки студентської науково-дослідної роботи № 3/14-ГР “Розробка методики експрес-оцінки стійкості пробіотичних бактеріальних клітин до хіміотерапії”.

Е.В. Типлинская, О.В. Советова, В.Ю. Горчаков

АДАПТАЦІЯ ДИСКОВОГО МЕТОДА ДЛЯ ЕКСПРЕСС-ОЦІНКИ УСТОЙЧИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ К ЦИТОСТАТИКАМ

Довольно часто при проведенні хіміотерапії використовують пробіотики. Но устійчивість продуцентів цих препаратів к различным курсам хіміотерапії не определена. Нами было создано методику быстрого определения чувствительности микроорганизмов к цитостатикам на основе метода диффузии в агар. Эта методика работоспособна для полусинтетических питательных сред с содержанием агара 2 %. С помощью созданной методики была определена чувствительность некоторых представителей патогенной и условно патогенной микрофлоры к цитостатикам.

K.V. Typlyns`ka, O.V. Sovetova, V.Yu. Gorchakov

THE ADAPTATION OF DISK METHOD FOR EXPRESS EVALUATION OF RESISTANCE TO CYTOSTATICS

Probiotics are often used for chemotherapy. However, the stability of producers of these products to various chemotherapy courses is not studied. To that end, we devise a rapid method for determining susceptibility of microorganisms to the cytostatics based on the diffusion in agar. Moreover, we show that this method can be utilized for semisynthetic nutrient media with the content of 2% agar. We also determine the sensitivity of some representatives of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms to the cytostatics.

1. *Bates D.W., Cullen D.J., Laird N.* Incidence of adverse drug events and potential adverse drug events. Implications for prevention // *JAMA*. – 1995. – **274**. – P. 29–34.
2. *Leape L.L., Brennan T.A., Laird N.* The nature of adverse events in hospitalized patients. Results of the Harvard Medical Practice Study II // *N Engl J. Med.* – 1991. – **324**. – P. 377–384.
3. *Шендеров Б.О., Манвелова М.О., Степанчук Ю.Б. та ін.* Пробиотики та функціональне харчування // *Антибіотики та хіміотерапія*. – 1997. – **42**, № 7. – С. 30–34.
4. *Ушкалова Е.А.* Менеджмент желудочно-кишечных побочных реакций, индуцированных противоопухолевыми средствами // *Фарматека*. – 2006. – № 12(127). – С. 38–42.
5. *Goldin B.R., Gorbach S.L.* The effect of milk and Lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity // *J. Nat. Cancer Inst.* – 1984. – **73**. – P. 689–695.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
14 квітня 2009 року