

Шитов Леонид Николаевич

Влияние цитостатиков на биологические свойства
условно-патогенных бактерий микрофлоры кишечника
в эксперименте

03.02.03 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Ярославская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук,
профессор

Романов Виталий Александрович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук,
профессор

Митрохин Сергей Дмитриевич

Доктор медицинских наук,
профессор

Царёв Виктор Николаевич

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита состоится «___» _____ 2010 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном Государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан «___» _____ 2010 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук

О.Ю. Борисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Препараты, обладающие цитостатическим действием, являются эффективными противоопухолевыми средствами; кроме того, обладая иммуносупрессивным эффектом, цитостатики находят широкое применение в терапии аутоиммунных заболеваний и в трансплантологии.

К наиболее опасным и часто встречающимся осложнениям, развивающимся на фоне иммуносупрессии, возникающей при цитостатической терапии, относятся инфекции (Балабанова Р.М., 2006; Белов Б.С. и соавт., 2006; Jallouli M., 2008), возбудителями которых являются, главным образом, условно-патогенные представители микрофлоры организма (Соколов А.А., 2009; Garbino J. et al., 2005; Lee P.P.W., 2007). При этом в ряде исследований было показано, что при заболеваниях, требующих назначения цитостатиков, имеют место изменения в микробиоценозах пациентов, выражающиеся, главным образом, в избыточном росте условно-патогенных микроорганизмов (Привалова Т.Ю., 2006; Гульнева М.Ю. и соавт., 2007, Stringer A.M. et al., 2009).

Одним из наименее изученных вопросов является прямое воздействие цитостатиков на биологические свойства микроорганизмов и состояние микрофлоры макроорганизма. Вместе с тем, препараты с цитостатическим механизмом действия являются ДНК-тропными агентами, проявляют выраженные мутагенные свойства и, следовательно, потенциально способны вызвать изменения свойств микроорганизмов. Отмечено, что биологические характеристики бактерий, выделенных на фоне введения рассматриваемых лекарственных средств, отличаются от аналогичных свойств бактерий, встречающихся у людей или лабораторных животных, не подвергавшихся воздействию препаратов с цитотоксическими свойствами (Бельский В.В. и соавт., 2008; Гульнева М.Ю. и соавт., 2007). Публикации о прямом влиянии цитостатиков на биологические свойства условно-патогенных бактерий единичны (Шаповал О.Г., 2008).

В соответствии с рассмотренными выше обстоятельствами, актуальным является исследование, позволяющее установить характер эффектов цитостатиков в отношении условно-патогенных бактерий микрофлоры организма в контексте возникновения инфекционных осложнений и микробиологических нарушений при применении данных препаратов.

В реальной практике данные о состоянии и свойствах микрофлоры до назначения цитостатической терапии, как правило, отсутствуют, а учесть все факторы, влияющие на микрофлору организма больного, крайне затруднительно, поэтому получение объективных данных в рамках клинического исследования представляется весьма сложным. Можно предположить, что в условиях живого организма воздействие цитостатиков на микрофлору может реализовываться не напрямую, а за счёт влияния на различные системы макроорганизма, прежде всего, на иммунную систему. В соответствии с изложенным, обоснованным подходом к достижению поставленной цели является исследование воздействия

широко применяемых в медицине цитостатиков – метотрексата и циклофосфамида – на условно-патогенные микроорганизмы в опытах как *in vitro*, так и *in vivo*, в сравнении с эффектами преднизолона – иммуносупрессивного препарата с нецитостатическим механизмом действия.

Цель исследования – оценка влияния цитостатиков на биологические свойства условно-патогенных бактерий микрофлоры кишечника в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Задачи исследования:

1. Оценить уровни колонизации толстой кишки стафилококками, энтерококками и энтеробактериями при курсовом введении белым мышам цитостатиков – метотрексата и циклофосфамида в сравнении с преднизолоном – иммунодепрессантом с нецитостатическим механизмом действия.

2. Изучить биологические свойства штаммов, выделенных у животных, получавших метотрексат, циклофосфамид и преднизолон.

3. Исследовать влияние различных концентраций метотрексата на развитие популяции музейных штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* в опытах *in vitro*.

4. Изучить биологические свойства условно-патогенных бактерий, подвергшихся воздействию различных концентраций метотрексата в опытах *in vitro*.

Научная новизна

В экспериментальном исследовании, исключая влияние комплекса дополнительных факторов, действующих на микрофлору пациента в клинических условиях, получены новые данные о самостоятельной роли цитостатиков в изменении показателей кишечного микробиоценоза и свойств его представителей.

Новые данные о влиянии курсового введения цитостатиков разных групп (метотрексата и циклофосфамида) и иммунодепрессанта с нецитостатическим механизмом действия (преднизолона) на уровни колонизации толстой кишки белых мышей стафилококками, энтерококками и энтеробактериями показывают, что все препараты повышают общее количество условно-патогенных микроорганизмов, однако имеются некоторые различия в характере воздействия препаратов на популяционные уровни отдельных бактерий.

Впервые установлено, что цитостатики вызывают разнонаправленные изменения антибиотикорезистентности условно-патогенных бактерий, а также их адгезивности; при этом выявлена прямая корреляция между показателями адгезии и популяционными уровнями энтеробактерий в содержимом толстой кишки экспериментальных животных; под влиянием метотрексата *in vitro* происходит замедление развития популяции условно-патогенных бактерий и изменение культуральных свойств золотистого стафилококка.

Практическая значимость работы

Данные о способности цитостатиков вызывать микрoэкологические нарушения и влиять на антибиотикорезистентность условно-патогенных бактерий в эксперименте являются основой рекомендаций для совместной работы с клиницистами при проведении цитостатической терапии, в частности, при лечении инфекционных осложнений, развившихся на её фоне.

Результаты выполненной работы необходимы для дальнейшего развития исследований, направленных на формирование концепции самостоятельной роли цитостатической терапии в изменении показателей микрофлоры и биологических свойств её отдельных представителей.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты работы внедрены в работу межкафедральной научно-исследовательской лаборатории на базе кафедры микробиологии ГОУ ВПО ЯГМА Росздрава, полученные данные используются при проведении занятий и чтении лекций для интернов, ординаторов, слушателей факультета последипломного образования и студентов всех факультетов ГОУ ВПО ЯГМА Росздрава.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Применение цитостатиков является самостоятельной причиной микрoэкологических нарушений и изменения биологических свойств условно-патогенных бактерий *in vivo*; сходные эффекты реализуются также при введении преднизолона – иммунодепрессанта с нецитостатическим механизмом действия.

2. Введение циклофосфида и метотрексата экспериментальным животным влияет на антибиотикорезистентность и адгезивные свойства условно-патогенных бактерий микрофлоры кишечника.

3. Прямое воздействие метотрексата в опытах *in vitro* характеризуется изменениями антибиотикорезистентности, показателей адгезии, культуральных свойств и динамики развития популяции условно-патогенных бактерий.

Апробация работы

Апробация диссертационной работы состоялась на межкафедральной научной конференции кафедр микробиологии с вирусологией и иммунологией, фармакологии и патологической анатомии с курсом судебной медицины Ярославской государственной медицинской академии, протокол № 1 от 5 мая 2010 года.

Основные положения работы были представлены на 57–60-й научных студенческих конференциях ГОУ ВПО ЯГМА Росздрава (г. Ярославль, 2003–2006), IX съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (г. Москва, 2007), научно-практической конференции «Современные возможности клинической лабораторной диагностики в клинико-диагностическом процессе» (г. Ярославль, 2008), V съезде Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (г. Москва, 2008), V съезде ревматологов России (г. Москва, 2009), X международном конгрессе «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии» (г. Казань, 2009).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 2 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, 3 – в других периодических изданиях, 6 – в материалах конференций, 6 – в сборниках научных трудов.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на русском языке на 166 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы методы исследования», четырёх глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов и выводов. Указатель литературы включает 211 источников: 103 отечественных и 108 иностранных. Диссертация иллюстрирована 46 таблицами, 20 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Препараты. В работе использованы коммерческие препараты «Веро-метотрексат», 1%-ный раствор натриевой соли метотрексата для инъекций (ЗАО «Верофарм», Москва); «Циклофосфан», порошок для приготовления инъекционных растворов (ОАО «Биохимик», Саранск); «Преднизолон Никомед», раствор для внутривенного и внутримышечного введения («Nycomed», Австрия).

Штаммы микроорганизмов. Эксперименты *in vitro* выполнены на музейных штаммах *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. haemolyticus* 107, *K. pneumoniae* 119 (два последних – из музея кафедры микробиологии с вирусологией и иммунологией ГОУ ВПО ЯГМА Росздрава).

Лабораторные животные. Исследование микрофлоры толстой кишки выполнено на 60 беспородных белых мышах обоих полов массой 30 ± 3 г. Контрольные и опытные группы состояли из 15 животных. Все животные находились в стандартных условиях содержания и кормления.

Исследование микрофлоры толстой кишки экспериментальных животных. Препараты вводили внутрижелудочно с помощью атравматического зонда. Схемы введения выбирали исходя из режимов дозирования, применяемых у человека, пересчёт доз осуществляли в соответствии с действующими рекомендациями («Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», М.; 2000). Циклофосфамид (ЦФ) вводили в дозе 35,4 мг/кг ежедневно; метотрексат (МТ) – 2,5 мг/кг в неделю за 2 приёма с интервалом 24 часа; преднизолон (ПЗ) – 2,5 мг/кг ежедневно. Продолжительность введения всех препаратов составляла 6 недель. Животным контрольной группы вводили стерильную дистиллированную воду.

Исследование содержания микроорганизмов с аэробным и факультативно-анаэробным типом дыхания в фекалиях мышей выполняли через 2, 4 и 6 недель после начала введения препаратов. Выделение, идентификацию и количественную оценку содержания микроорганизмов осуществляли общепринятыми методами на основе изучения морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств. Культуры, выделенные на 6-й неделе ис-

следования, использовали для определения биологических свойств и антибиотикорезистентности. Исследовано 120 культур стафилококков, 130 культур энтерококков, 360 культур энтеробактерий.

Исследование влияния метотрексата на развитие популяции и биологические свойства условно-патогенных бактерий. Для оценки влияния МТ на развитие популяции условно-патогенных бактерий стерильный раствор натриевой соли МТ добавляли в МПБ в концентрациях 0,1; 1,0; 10; 100 и 1000 мг/л; число параллельных образцов каждой из концентраций равнялось 7. Суспензию тест-культуры вносили в пробирки до концентрации $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Культивирование осуществляли при 37°C в течение 18 часов; концентрацию бактериальных клеток в суспензии оценивали фотометрическим методом на планшетном фотометре ЭФОС 9305 (светофильтр 450 нм). Интенсивность роста выражали в процентах от контроля, не содержащего препарат (100%). Для микроорганизмов, интенсивность роста которых значимо менялась под воздействием препарата, построены кинетические кривые роста.

Влияние МТ на рост условно-патогенных бактерий оценивали также с помощью диско-диффузионного метода и метода серийных разведений в агаре. В диско-диффузионном методе использовали агар Мюллера-Хинтон и стандартизированные бумажные диски, содержащие 50, 250, 750 и 1000 мкг натриевой соли МТ. Тестирование осуществляли согласно методическим указаниям «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (МУК 4.2. 1890-04). Для исследований методом серийных разведений на агаре готовили агар Мюллера-Хинтон и МПА с концентрациями натриевой соли МТ 100, 500 и 1000 мг/л. На поверхность агара наносили 0,1 мл бактериальной суспензии, содержащей 500-2000 клеток в 1 мл (одинаковое число клеток наносили на чашки с разными концентрациями метотрексата). Осуществляли инкубацию при 37°C в течение 48-72 часов. Отмечали наличие роста, сравнивали число колоний, выросших на образцах агара, содержащих различные концентрации МТ и не содержащих препарата (контроль); изучали культуральные и морфологические свойства.

С целью оценки влияния МТ на биологические свойства и антибиотикорезистентность условно-патогенных бактерий осуществляли посев инокулюма, приготовленного аналогично вышеописанной методике, в пробирки с 5 мл МПБ, содержащего натриевую соль МТ в концентрациях 1, 10, 100 и 500 мг/л, а также с МПБ, не содержащим препарата (контроль). Культивирование осуществляли в течение 5 суток при 37°C с периодическим встряхиванием. По окончании периода культивирования у бактерий определяли адгезивные свойства, чувствительность к антибактериальным препаратам (АБП), некоторые факторы патогенности.

Адгезивные свойства микроорганизмов оценивали по методике, предложенной Брилис В.И. с соавт. (1986) с определением среднего показателя адгезии (СПА – среднее число микробных клеток, прилипших к поверхности одного эритроцита), коэффициента участия эритроцитов в адгезивном процессе (К, % – процент эритроцитов, участвующих в адгезивном процессе), индекса адгезивности микроорганизма (ИАМ, вычисляемый по формуле

ИАМ=(СПА·100)/К). Адгезивность считали нулевой при СПА от 0 до 1,0; низкой – при СПА от 1,01 до 2,0; средней – от 2,01 до 4,0; высокой – свыше 4,0.

Чувствительность условно-патогенных бактерий к АБП оценивали с помощью диско-диффузионного метода и метода серийных разведений в бульоне. У культур, выделенных от мышей контрольной и опытных групп, определяли чувствительность к основным клинически значимым АБП. Музейные штаммы, подвергшиеся воздействию различных концентраций метотрексата, тестировали на чувствительность к расширенному спектру АБП.

Активность плазмокоагулазы определяли по методике Трояшкина А.А. и Ивановой С.П. (1968), гемолитической и лецитиназной активности использовали методики Чистовича Г.Н. (1961), а также упрощённую методику, описанную Ходаковой Н.Г. (2008).

Программное обеспечение. Хранение и обработку полученных данных осуществляли на IBM PC совместимом компьютере с помощью программ Microsoft® Office Excel 2003, STATISTICA® (StatSoft, Inc.) релиз 7.0, Primer of Biostatistics (Stanton A. Glantz, McGraw Hill) версия 4.03 в среде WINDOWS™. Для графического оформления работы использованы программы Microsoft® Office Excel 2003 и Adobe® Photoshop CS2.

Статистическая обработка данных. Нормальность распределения данных оценивали по W-тесту Шапиро-Уилка; при нормальном распределении выполняли дисперсионный анализ и множественные сравнения по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони; в случае распределения, отличного от нормального, осуществляли непараметрический дисперсионный анализ по критерию Крускалла-Уоллиса и множественные сравнения по критерию Данна. При анализе качественных признаков применяли критерий χ^2 . Для оценки тесноты взаимосвязи между анализируемыми показателями вычисляли коэффициент корреляции Пирсона (при нормальном распределении) или коэффициент ранговой корреляции Спирмена (при распределении, отличном от нормального). При анализе повторных измерений применяли критерий Фридмана (распределение, отличное от нормального) и множественные сравнения по критерию Ньюмена-Кейлса (Гланц С., 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Популяционные уровни некоторых условно-патогенных бактерий в составе микрофлоры толстой кишки белых мышей, получавших цитостатики и преднизолон

У всех животных, получавших исследуемые препараты, отмечались статистически достоверные изменения показателей микрофлоры, выраженность которых, как правило, возрастала по мере увеличения продолжительности введения препаратов (таблица 1).

Введение циклофосамида вызывало статистически достоверное повышение высеваемости стафилококков на 2-й и 4-й неделях ($p < 0,05$), а также лактозонегативных энтеробактерий (ЛНЭБ) в течение всего срока наблюдения и кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью (КПСФА) на

Таблица 1. Содержание некоторых микроорганизмов в фекалиях экспериментальных животных

Группа	Общее число АФАМ	Стафилококки	Энтерококки	КП типичные	КПСФА	ЛНЭБ	Содержание ГМ
	млн КОЕ/г						% от общего числа АФАМ
Показатели через 2 недели (медиана; [25-й процентиль; 75-й процентиль])							
К ¹	43,92 [18,65; 59,54]	1,23 [1,09; 1,41]	2,66 [2,34; 6,03]	5,20 [2,14; 21,76]	2,27 [1,08; 5,27]	0,86 [0,69; 1,46]	7,10 [6,05; 8,10]
ЦФ	193,24 [123,54; 249,54]*	39,00 [30,31; 58,04]*	7,82 [4,38; 11,93]	9,20 [2,45; 16,49]	8,93 [4,48; 10,45]	55,16 [17,04; 732,76]*	4,07 [3,33; 6,00]
МТ	227,68 [201,71; 296,54]*	105,51 [63,21; 156,47]*	17,75 [6,62; 40,13]*	0,42 [0,22; 0,61]*	9,90 [0,32; 15,18]	11,41 [5,26; 13,86]	5,73 [2,62; 6,90]
ПЗ	127,66 [110,31; 135,54]*	60,21 [50,24; 76,60]*	9,22 [6,41; 30,15]	1,57 [0,83; 2,62]	0,56 [0,11; 10,28]	1,16 [0,18; 5,78]	6,90 [5,11; 8,10]
Показатели через 4 недели							
К	44,76 [22,32; 51,20]	1,14 [0,56; 2,01]	3,65 [3,13; 4,20]	6,60 [2,01; 18,28]	2,39 [1,02; 7,00]	1,20 [0,76; 1,75]	5,56 [3,70; 6,42]
ЦФ	295,75 [178,30; 340,78]*	7,71 [5,90; 15,06]*	6,48 [4,49; 8,82]	31,47 [16,93; 54,73]	167,26 [72,80; 339,19]*	10,78 [6,30; 905,32]*	7,10 [4,18; 8,17]
МТ	53,71 [31,71; 67,33]	7,93 [5,34; 10,34]*	6,18 [5,62; 8,25]	0,61 [0,17; 1,07]*	6,39 [2,41; 8,87]	1,06 [0,62; 2,12]	3,70 [2,86; 5,87]
ПЗ	151,48 [119,23; 171,77]*	57,10 [7,21; 89,28]*	18,73 [9,95; 20,72]*	3,65 [1,86; 7,28]	6,67 [2,26; 9,91]	5,22 [2,41; 8,20]	5,90 [3,87; 7,45]
Показатели через 6 недель							
К	42,76 [18,31; 50,14]	1,48 [0,79; 2,00]	1,34 [0,30; 5,92]	5,99 [2,05; 31,12]	2,65 [1,67; 5,87]	1,37 [0,78; 1,61]	6,79 [3,33; 7,58]
ЦФ	1570,47 [1273,14; 1831,76]*	0,67 [0,58; 0,71]	1,12 [1,02; 1,21]	68,37 [38,02; 146,58]	822,27 [571,30; 2156,31]*	574,67 [79,68; 4952,42]*	6,21 [5,71; 6,90]
МТ	61,24 [49,11; 71,35]	22,11 [9,56; 77,47]*	3,24 [0,20; 12,50]	1,25 [0,98; 2,02]*	0,18 [0,12; 0,25]	0,13 [0,12; 0,17]	5,71 [3,33; 6,90]
ПЗ	306,08 [276,31; 382,83]*	190,88 [55,93; 220,15]*	1,69 [0,74; 3,75]	3,66 [3,33; 7,46]	3,95 [2,54; 16,01]	25,31 [2,74; 56,50]	6,00 [4,07; 7,40]

* - статистически достоверные различия с контрольной группой, p<0,05

¹ – средний исходный уровень показателей для всех групп

4-й и 6-й неделях эксперимента ($p < 0,05$). В группе животных, получавших ПЗ, отмечено наиболее выраженное по сравнению с другими группами повышение высеваемости стафилококков на протяжении всего периода введения препарата ($p < 0,05$) и энтерококков на 4-й неделе. Введение МТ вызывало статистически достоверное снижение высеваемости типичных кишечных палочек (КП) на протяжении всего периода введения препарата ($p < 0,05$). На протяжении всего периода введения МТ отмечено достоверное повышение высеваемости стафилококков, на 4-й неделе – энтерококков ($p < 0,05$).

Таким образом, введение экспериментальным животным МТ, ЦФ и ПЗ приводит к увеличению содержания условно-патогенных бактерий в фекалиях. В ходе введения ЦФ и ПЗ наблюдается увеличение выраженности происходящих изменений. Повышение общего числа условно-патогенных микроорганизмов при использовании ЦФ происходит, преимущественно, за счёт энтеробактерий, а при введении ПЗ, главным образом, за счёт стафилококков. МТ вызывает повышение общего числа условно-патогенных микроорганизмов с последующим снижением их уровня при выраженном дисбалансе соотношения анализируемых показателей по сравнению с контрольной группой: повышение численности стафилококков и снижение – энтеробактерий.

2. Биологические свойства условно-патогенных бактерий, выделенных из фекалий экспериментальных животных

Плазмокоагулаза и лецитиназа не были выявлены ни у одной из исследованных культур.

Частоты встречаемости гемолитических условно-патогенных бактерий (УПБ) у опытных групп мышей преимущественно не претерпевали статистически значимых изменений по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы. Достоверные изменения отмечены только на фоне введения ПЗ: снижение частоты высеваемости β -гемолитических стафилококков и повышение – α -гемолитических ЛНЭБ.

Исследование адгезивных свойств микроорганизмов показало (таблица 2), что типичные КП, КПСФА и ЛНЭБ, выделенные у животных, получавших МТ, отличались более низкими показателями адгезии по сравнению со штаммами, изолированными у мышей контрольной группы (ИАМ у типичных КП; СПА, К и ИАМ у КПСФА; СПА у ЛНЭБ; $p < 0,05$).

Штаммы ЛНЭБ, полученные от мышей, которым вводили ПЗ, характеризовались более высокими показателями адгезии (СПА, К; $p < 0,05$). Установлена статистически значимая взаимосвязь между адгезивными свойствами исследованных представителей семейства *Enterobacteriaceae* и их количественным содержанием в фекалиях (СПА и IgКОЕ/г на 6-й неделе исследования; коэффициент ранговой корреляции Спирмена $r = 0,73$, $p < 0,01$).

Стафилококки, выделенные у животных, получавших ЦФ, отличались сниженными по сравнению с контрольной группой показателями адгезии (СПА и ИАМ, $p < 0,05$); при исследовании адгезивных свойств стафилококков, полученных от мышей, которым вводили ПЗ, было отмечено уменьшение значения коэффициента участия эритроцитов в адгезивном процессе.

При оценке показателей адгезии энтерококков, выделенных у мышей, которым вводили ЦФ, установлено более высокое, по сравнению с контрольной группой, значение К ($p < 0,05$).

Таблица 2

Адгезивные свойства микроорганизмов, выделенных у мышей контрольной и экспериментальных групп через 6 недель после начала введения препаратов

Микро-организмы	Группа животных	СПА	К	ИАМ
Стафилококки	Контроль	2,36±0,73	72,51±9,63	3,22±0,77
	ЦФ	1,83±0,61*	69,70±10,63	2,61±0,73*
	МТ	2,66±1,02	73,06±14,78	3,59±0,94
	ПЗ	1,99±0,82	62,44±13,56*	3,14±0,92
Энтерококки	Контроль	2,44±0,69	61,69±9,31	4,02±1,10
	ЦФ	2,63±0,69	68,41±9,92*	3,89±1,05
	МТ	2,43±0,49	65,49±6,68	3,74±0,77
	ПЗ	2,38±0,50	63,86±9,26	3,73±0,67
КП типичные	Контроль	2,06±0,63	63,54±12,74	3,21±0,71
	ЦФ	2,21±0,59	69,01±12,04	3,18±0,62
	МТ	1,74±0,59	66,92±11,07	2,55±0,63*
	ПЗ	2,13±0,88	66,31±14,50	3,10±0,74
КПСФА	Контроль	2,01±1,01	56,00±18,43	3,41±1,04
	ЦФ	2,44±0,99	67,48±14,07*	3,63±1,19
	МТ	1,18±0,36*	42,29±12,77*	2,81±0,53*
	ПЗ	1,93±0,81	63,73±13,83	2,95±0,79
ЛНЭБ	Контроль	2,05±0,88	64,31±14,07	3,20±0,92
	ЦФ	1,95±0,89	69,05±9,45	2,84±1,16
	МТ	1,47±0,56*	53,22±17,53*	2,72±0,60
	ПЗ	2,65±0,81*	75,89±14,82*	3,47±0,64

* - статистически достоверные различия с контрольной группой, $p < 0,05$

Для всех групп животных, получавших препараты, выявлены отличия в антибиотикорезистентности выделенных от них условно-патогенных бактерий по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы. В наибольшей степени это касалось групп мышей, подвергавшихся воздействию ЦФ и ПЗ. Достоверно изменённые уровни чувствительности обнаружены в первую очередь у кишечных палочек. Для типичных КП показано повышение чувствительности к АБП; в отношении КПСФА и ЛНЭБ отмечено как повышение, так и снижение чувствительности к АБП. В ряде случаев, несмотря на достоверно сниженные значения минимальных подавляющих концентраций ($МПК_{50}$) антибиотиков у штаммов, изолированных от мышей, получавших МТ, ЦФ и ПЗ, среди этих культур бактерий обнаруживались резистентные штаммы, не выявленные у животных контрольной группы. Различия в антибиотикорезистентности стафилококков и энтерококков, выделенных от животных контрольной и опытных групп на фоне введения препаратов, носили менее выраженный характер, чем у представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

3. Влияние метотрексата на развитие популяции условно-патогенных бактерий *in vitro*

В диапазоне концентраций МТ 0,1 – 1,0 мг/л не наблюдалось статистически достоверного влияния на рост взятых для исследования штаммов УПБ; при концентрациях 10 – 1000 мг/л метотрексат вызывал частичное угнетение роста всех взятых для исследования микроорганизмов, за исключением *P. aeruginosa ATCC 27853*. Достоверные различия с показателями роста контрольных образцов приходились главным образом на концентрации препарата 1000 и 100 мг/л. Аналогичные результаты были получены при исследовании штаммов, выделенных у мышей (таблица 3).

Таблица 3

Интенсивность роста УПБ в жидкой питательной среде в присутствии различных концентраций метотрексата (в % от контроля, не содержащего препарат)

Микроорганизмы	Концентрации метотрексата, мг/л				
	1000	100	10	1	0,1
Музейные штаммы					
<i>S. aureus ATCC 25923</i>	51,33±3,08*	66,81±4,08*	87,53±5,43*	99,76±6,21	99,88±4,99
<i>S. haemolyticus 107</i>	78,66±4,72*	98,73±5,34	99,25±4,88	99,62±6,18	99,77±6,49
<i>E. faecalis ATCC 29212</i>	46,25±2,82*	80,03±4,80*	89,55±5,55*	94,15±5,65	99,47±5,57
<i>E. coli ATCC 25922</i>	57,14±3,49*	88,07±5,42*	99,14±4,62	99,82±6,14	99,85±6,09
<i>K. pneumoniae 119</i>	63,76±3,91*	78,95±3,45*	96,73±5,94	99,14±7,51	99,71±9,85
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	99,81±6,17	99,75±5,48	99,85±4,95	99,90±4,53	99,95±6,10
Штаммы, выделенные у мышей					
<i>S. haemolyticus M0210</i>	81,02±3,98*	91,31±3,94*	99,12±5,01	99,31±7,11	99,62±7,12
<i>S. haemolyticus M0233</i>	70,14±4,19*	87,52±4,78*	98,85±3,55	99,43±5,98	99,81±4,56
<i>E. coli M0251</i>	71,22±3,77*	89,91±2,98*	99,20±3,69	99,75±5,21	99,90±4,17
<i>E. coli M0263</i>	62,23±4,43*	84,27±4,12*	98,87±3,91	99,76±4,87	99,89±7,01
<i>E. coli M0301</i>	59,67±4,67*	89,12±6,76*	98,57±3,98	99,57±5,23	99,87±7,12
<i>E. faecalis M1019</i>	56,34±3,36*	89,72±3,57*	94,35±3,87	98,65±7,45	99,87±2,97
<i>E. faecalis M1187</i>	77,12±6,34*	91,45±3,34	98,67±7,01	99,15±4,92	99,81±8,13
<i>E. faecium M1201</i>	60,34±5,34*	83,67±3,98*	96,98±4,76	98,81±3,48	99,52±4,87

* - достоверные различия с контрольным образцом, $p < 0,05$

Наиболее выраженное ингибирующее действие МТ оказывал в отношении роста *E. faecalis ATCC 29212* и *S. aureus ATCC 25923*. При исследовании динамики развития популяции бактерий было отмечено, что ингибирующее действие имело место на всех фазах развития бактериальной популяции. Наиболее ощутимые различия между контрольными и опытными образцами проявлялись в поздние сроки; на ранних фазах различия были выражены в меньшей степени (рисунки 1-4).

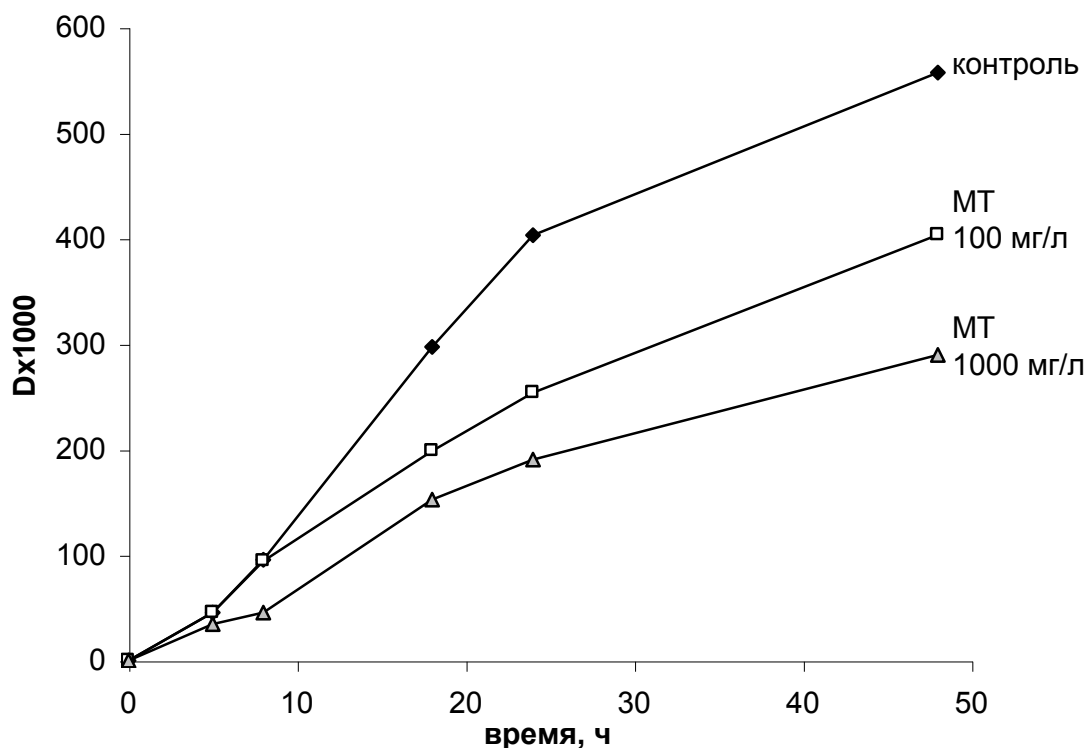


Рисунок 1. Динамика развития популяции *S. aureus* ATCC 25923 в жидкой питательной среде в присутствии метотрексата (D – оптическая плотность бактериальной суспензии, МТ – метотрексат)

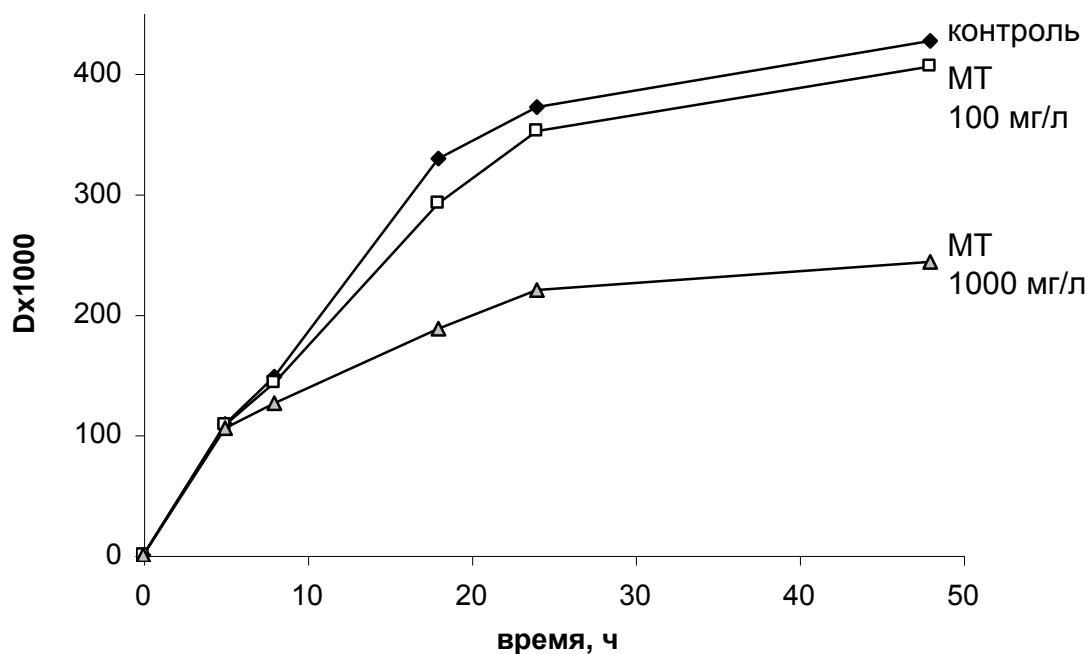


Рисунок 2. Динамика развития популяции *E. coli* ATCC 25922 в жидкой питательной среде в присутствии метотрексата (D – оптическая плотность бактериальной суспензии, МТ – метотрексат)

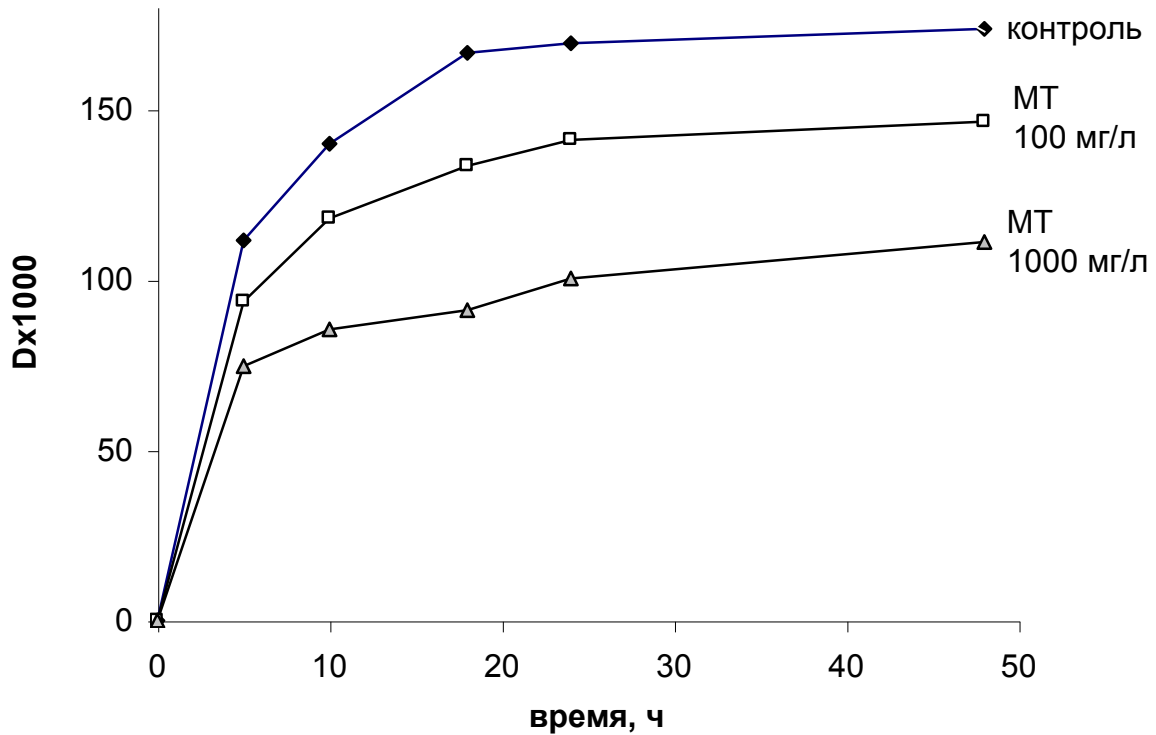


Рисунок 3. Динамика развития популяции *E. faecalis* ATCC 29212 в жидкой питательной среде в присутствии метотрексата (D – оптическая плотность бактериальной суспензии, МТ – метотрексат)

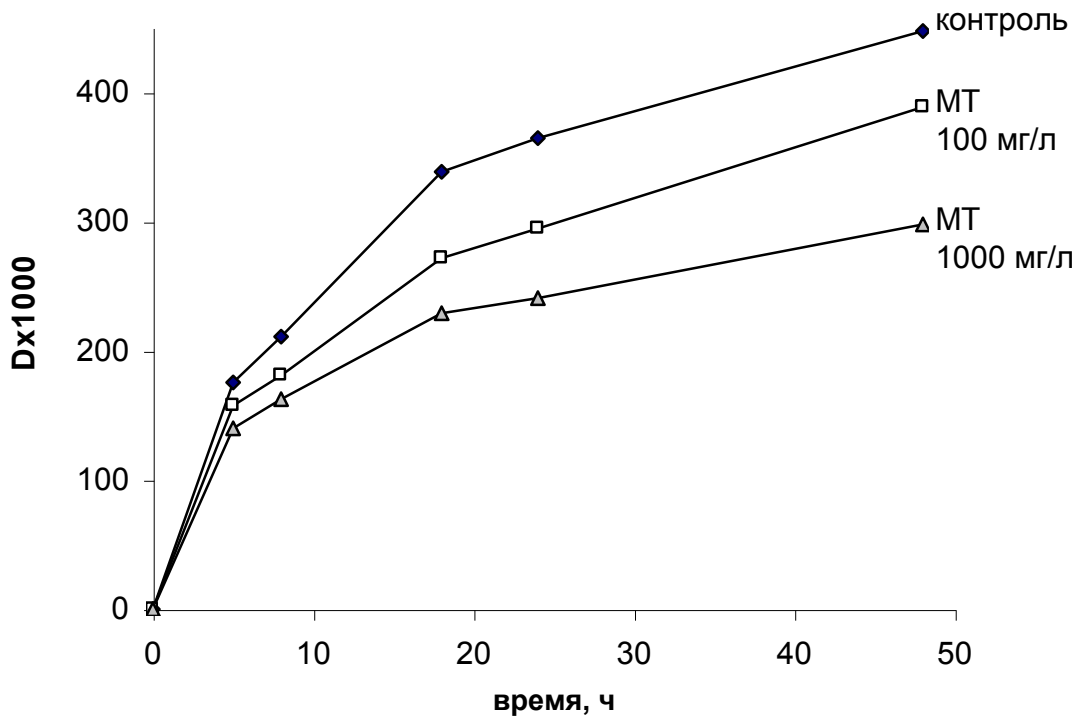


Рисунок 4. Динамика развития популяции *K. pneumoniae* 119 в жидкой питательной среде в присутствии метотрексата (D – оптическая плотность бактериальной суспензии, МТ – метотрексат)

При оценке чувствительности к метотрексату взятых для исследования штаммов УПБ диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтон зона задержки роста была выявлена только у *S. aureus* ATCC 25923 и *S. haemolyticus* 107. Диско-диффузионный метод продемонстрировал лишь частичное угнетение роста *S. aureus* ATCC 25923. При последующей оценке чувствительности к метотрексату стафилококков, выросших в зоне частичного угнетения роста, установлено, что их уровень чувствительности не отличался от исходного, т.е. неполный характер угнетения роста бактерий в рассматриваемой зоне не был связан с селекцией мутантов, резистентных к МТ.

Также было осуществлено сравнение чувствительности к МТ штаммов стафилококков, выделенных у мышей контрольной группы и группы, получавшей МТ; при этом достоверных различий не было выявлено. При содержании МТ в диске 250 мкг диаметр зоны частичной задержки роста (мм, $M \pm SD$) для стафилококков, выделенных у контрольной группы составил $19,93 \pm 5,85$ мм, у стафилококков, изолированных от мышей, получавших МТ, – $21,36 \pm 6,64$ мм ($p > 0,05$). Показано, что чувствительность разных штаммов к метотрексату варьирует в достаточно широких пределах: диаметры зон задержки роста 56 штаммов стафилококков находились в пределах от 12 до 36 мм. Распределение значений данного показателя соответствует нормальному ($p = 0,0013$ при использовании W-теста Шапиро-Уилка).

Метод серийных разведений в агаре показал, что на среде, содержащей МТ в концентрациях 100 – 1000 мг/л, рост колоний *S. aureus* ATCC 25923 в значительной степени замедлялся; колонии имели меньшие размеры и неправильную форму (рисунок 5). При последующем пересеве колоний неправильной формы на агар Мюллера-Хинтон, не содержащий МТ, культуральные свойства выросших колоний полностью соответствовали исходным характеристикам музейного штамма.

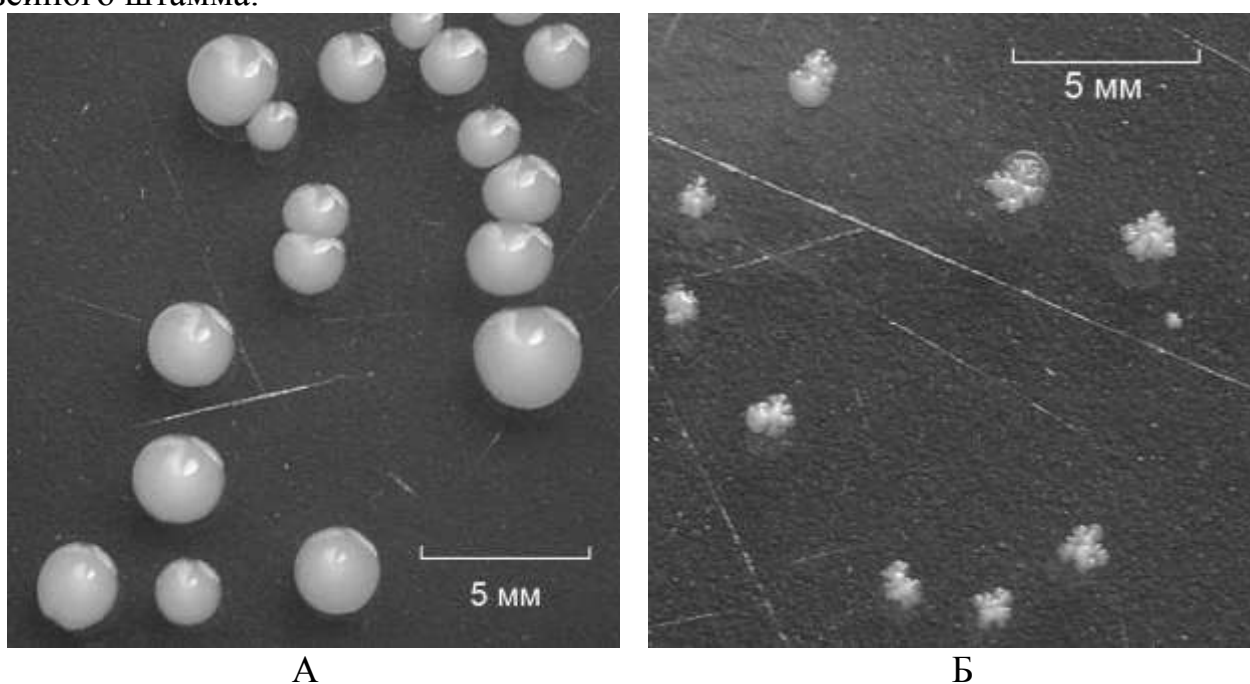


Рисунок 5. Колонии *S. aureus* ATCC 25923 на агаре Мюллера-Хинтон с содержанием метотрексата 500 мг/л (Б) и без добавления препарата (А)

4. Влияние метотрексата на биологические свойства условно-патогенных бактерий *in vitro*

У штаммов *S. aureus* ATCC 25923 и *E. coli* ATCC 25922 достоверных изменений показателей адгезии под влиянием МТ не было выявлено (таблица 4).

При исследовании адгезии *E. faecalis* ATCC 29212, культивированных в присутствии 100 и 500 мг/л МТ, было установлено статистически достоверное ($p < 0,05$) повышение коэффициента участия эритроцитов в адгезивном процессе. При этом достоверных различий величин СПА и ИАМ между контролем и энтерококками, выращенными в присутствии МТ, не обнаружено.

У штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853, выращенных на МПБ с концентрацией МТ 100 и 500 мг/л наблюдалось статистически достоверное ($p < 0,05$) повышение СПА и К, при концентрации 500 мг/л – достоверное повышение ИАМ. Значения СПА и К, выявленные у *P. aeruginosa* ATCC 27853, подвергшихся действию 100 и 500 мг/л МТ достоверно ($p < 0,05$) отличались от аналогичных показателей, полученных при исследовании адгезии *P. aeruginosa* ATCC 27853, выращенных при 1 и 10 мг/л МТ. Значение ИАМ *P. aeruginosa* ATCC 27853, полученное при культивировании в присутствии 100 мг/л, достоверно выше значений, наблюдаемых у бактерий, подвергшихся действию 1 и 10 мг/л МТ.

По результатам оценки адгезивных свойств *K. pneumoniae* 119 констатировано статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение СПА и К при воздействии 100 и 500 мг/л МТ.

Таким образом, имели место как повышение, так и снижение показателей адгезии взятых для исследования штаммов УПБ. При этом все выявленные изменения показателей адгезии приходятся на наиболее высокие концентрации МТ – 100 и 500 мг/л.

При концентрациях МТ 100 и 500 мг/л наблюдалось статистически значимое снижение титра плазмокоагулазы по сравнению с контролем; по-видимому, указанные изменения активности плазмокоагулазы в культуральной жидкости связаны со снижением интенсивности роста бактерий в среде культивирования, содержащей МТ (коэффициент линейной корреляции между анализируемыми показателями $r = 0,95$; $p = 0,014$).

У *S. aureus* ATCC 25923 наблюдалось статистически достоверное снижение титра гемолизина в культуральной жидкости, которое, как и в случае с плазмокоагулазой, коррелировало со снижением интенсивности роста (коэффициент линейной корреляции $r = 0,94$, $p = 0,018$). Для *P. aeruginosa* ATCC 27853 достоверных изменений гемолитической активности не выявлено.

У всех взятых для исследования штаммов УПБ имели место изменения чувствительности к АБП при культивировании на МПБ, содержащем МТ (таблицы 5-10). В целом, преобладали факты снижения чувствительности по сравнению с исходным уровнем. Изменения антибиотикорезистентности происходили преимущественно при концентрациях МТ в среде культивирования 10 и 100 мг/л в меньшей степени – при 1 и 500 мг/л. Среди взятых для исследования штаммов наибольшее число изменений в чувствительности к АБП выявлено у *S. aureus* ATCC 25923 и *E. faecalis* ATCC 29212.

Показатели адгезии условно-патогенных бактерий при воздействии различных концентраций метотрексата

Концентрация МТ, мг/л	СПА	К	ИАМ
<i>S. aureus ATCC 25923</i>			
0 (контроль)	2,23±0,20	67,51±6,54	3,33±0,46
1	2,35±0,49	61,04±7,17	3,88±0,81
10	2,36±0,26	64,29±8,57	3,73±0,69
100	2,37±0,78	66,00±12,12	3,69±1,38
500	2,29±0,25	64,27±8,80	3,62±0,60
<i>E. faecalis ATCC 29212</i>			
0	2,31±0,22	69,33±5,57	3,32±0,07
1	2,31±0,33	71,93±7,79	3,23±0,43
10	2,39±0,35	77,22±2,44	3,10±0,40
100	2,75±0,35	79,20±5,57*	3,48±0,47
500	2,59±0,62	78,90±5,18*	3,29±0,75
<i>E. coli ATCC 25922</i>			
0	2,58±0,23	61,75±5,68	4,21±0,54
1	2,50±0,21	59,88±6,79	4,23±0,61
10	2,41±0,23	59,50±5,10	4,08±0,57
100	2,70±0,16	60,50±6,70	4,51±0,54
500	2,57±0,19	62,00±4,96	4,17±0,46
<i>K. pneumoniae 119</i>			
0	1,61±0,20	79,26±4,94	2,05±0,37
1	1,57±0,23	78,42±4,69	1,98±0,32
10	1,70±0,11	75,89±2,07	2,24±0,21
100	1,26±0,14*	63,99±9,95*	2,03±0,53
500	1,32±0,05*	62,45±7,44*	2,15±0,28
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>			
0	1,30±0,11	66,91±2,38	1,94±0,18
1	1,32±0,16	71,65±7,76	1,86±0,30
10	1,22±0,10	67,57±3,37	1,81±0,21
100	1,82±0,26*	80,45±5,69*	2,26±0,28
500	2,07±0,29*	79,30±2,48*	2,61±0,33*

* - статистически достоверные различия с контролем, $p < 0,05$

В ряде случаев изменения чувствительности имели однонаправленный характер на всём диапазоне концентраций МТ, при этом для некоторых штаммов величина сдвигов показателей антибиотикорезистентности возрастала по мере увеличения концентрации МТ; следует отметить, что кривая «концентрация МТ – диаметр зоны задержки роста» для всех подобных ситуаций имеет сходную форму и соответствует повышению чувствительности по сравнению с исходным уровнем.

Таблица 5

Изменения чувствительности к антибактериальным препаратам *S. aureus ATCC 25923*, подвергнутого воздействию метотрексата²

С _{МТ} , мг/л	Бензил-пенициллин	Оксациллин	Меропенем ¹	Гентамицин ¹	Линезолид ¹	Ципрофлоксацин	Эритромицин	Рокситромицин	Линкомицин	Ванкомицин	Фузидин	Рифампицин
1	–	–	–	↑	↑*	↑	↑	↓	↑	↓*	–	–
10	↑*	–	↑	↑*	↑	↓*	↑	↓*	–	↓*	–	↑*
100	↑*	–	↑	↑*	↑*	↓*	↑	↓	–	↓*	–	↑
500	↑	–	↑	↑*	↑*	↓*	↑	↓	–	–	↑	↑

Примечания к таблицам 5 - 9: С_{МТ} – концентрация метотрексата в питательной среде;
¹ – случаи повышения выраженности изменений чувствительности УПБ к АБП при возрастании концентраций МТ в среде культивирования;
² – таблицы составлены по объединённым данным диско-диффузионного метода и метода серийных разведений;
 ↑ - повышение чувствительности, ↓ - снижение чувствительности;
 * - статистически достоверные различия с контролем, p<0,05

Таблица 6

Изменения чувствительности к антибактериальным препаратам *E. faecalis ATCC 29212*, подвергнутого воздействию метотрексата²

С _{МТ} , мг/л	Бензилпенициллин	Ампициллин	Гентамицин	Стрептомицин	Линезолид	Ципрофлоксацин	Ванкомицин	Рифампицин	Доксициклин	Фурадонин	Эритромицин
1	↓*	–	–	↓	↓*	↓	↓*	↓*	↓	↓*	–
10	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑*	↓	↑	↑	↑
100	↓	–	↓*	↓	–	↓	↓*	↓	–	–	↑
500	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↑*	↑	↓	↑	↑*

Таблица 7

Изменения чувствительности к антибактериальным препаратам *E. coli ATCC 25922*, подвергнутой воздействию метотрексата²

С _{МТ} , мг/л	Ампициллин	Цефтриаксон ¹	Цефтазидим	Меропенем	Гентамицин	Амикацин	Ципрофлоксацин	Полимиксин	Линкомицин	Тетрациклин	Фурадонин
1	–	↑*	–	↓	↓	–	–	–	↓	–	–
10	–	↑	–	↓*	↓*	–	↓*	–	–	–	–
100	–	↑*	–	–	–	–	–	–	↑	↓	–
500	↓*	↑*	–	↓	–	–	–	–	↓	↓	–

Таблица 8

Изменения чувствительности к антибактериальным препаратам
K. pneumoniae 119, подвергшейся воздействию метотрексата²

С _{МТ} , мг/л	Ампициллин	Меропенем	Цефтриаксон	Цефтазидим	Гентамицин	Амикацин	Ципрофлоксацин	Полимиксин	Тетрациклин	Фурадонин	Линкомицин
1	-	-	↑	↓	↓	↓*	↑	↓	↓	↑	↑
10	-	-	↑	↓	-	↓*	↑	-	-	-	-
100	-	-	↑	↓*	-	↓*	↑	↓	↓*	-	-
500	-	↑	-	↓	-	↓*	↑	↑*	↓*	↑	↓

Таблица 9

Изменения чувствительности к антибактериальным препаратам
P. aeruginosa ATCC 27853, подвергшейся воздействию метотрексата²

С _{МТ} , мг/л	Цефтазидим	Цефепим	Азтреонам	Меропенем	Гентамицин	Амикацин	Ципрофлоксацин	Карбенициллин	Полимиксин	Тетрациклин
1	↑	-	↑	↑	-	-	↑	↑	-	↑*
10	↑	-	-	↓*	-	-	↓	↑	-	↓*
100	↓	↓*	↓	↓*	-	↑	↓	↑	-	↑*
500	↑	-	↑	↓	-	-	↑*	↑	-	↑

Таблица 10

Анализ результатов оценки влияния метотрексата на чувствительность
условно-патогенных бактерий к антибактериальным препаратам

Штаммы условно-патогенных бактерий	Общее число препаратов, чувствительность к которым достоверно изменялась ³	Снижение ³	Повышение ³	Разнонаправленные эффекты при действии разных концентраций ³	Число препаратов, изменения чувствительности к которым являются наследуемыми ³	Число препаратов, изменения чувствительности к которым являются односторонними на всём диапазоне концентраций метотрексата (включая тенденции)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7	3	4	-	3	7
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5	4	1	-	3	1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	7	5	1	1	1	2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4	2	1	1	1	1
<i>K. pneumoniae</i> 119	4	3	1	-	2	3

³ – учтены только статистически достоверные изменения чувствительности

На основании полученных нами результатов и данных литературы можно констатировать, что наблюдаемое повышение уровня УПБ в составе микрофлоры толстой кишки не является результатом прямого действия препаратов-цитостатиков на их клетки. Наблюдаемый избыточный рост факультативной микрофлоры, по-видимому, не связан с цитостатическими эффектами препаратов в отношении облигатных представителей микрофлоры, поскольку аналогичные изменения в кишечном микробиоценозе имеют место при введении преднизолона – препарата с нецитостатическим механизмом действия. Можно предположить, что микрoэкологические взаимоотношения нарушаются не на уровне влияния препаратов на рост и развитие микроорганизмов, а в результате влияния на ряд их свойств: в случае облигатных представителей микрофлоры – на способность секретировать субстанции, обуславливающие антагонистические эффекты в отношении УПБ, в случае оппортунистических микроорганизмов – на чувствительность к указанным субстанциям.

Изменения адгезивных свойств трактуются как одна из причин изменения численности УПБ в составе микрофлоры толстой кишки, однако данный механизм не является универсальным. Повышение показателей адгезии ЛНЭБ на фоне введения ПЗ рассматривается в контексте тенденции к повышению их содержания в составе микробиоценоза кишечника: допускается, что повышение численности происходит за счёт клеток с повышенной адгезивностью. В то же время, при введении ЦФ происходит гораздо более выраженное повышение уровня ЛНЭБ, не сопровождающееся повышением показателей их адгезии. В связи с этим можно предположить, что ПЗ специфическим образом усиливает экспрессию адгезинов у энтеробактерий в условиях *in vivo*. Полученные нами данные согласуются с результатами исследований Alverdy J. & Aoye E. (1991), продемонстрировавшими повышенный уровень адгезии энтеробактерий к слизистой оболочке кишечника при введении крысам дексаметазона.

Снижение иммунитета, развивающееся на фоне введения цитостатиков, рассматривается в качестве одного из ведущих механизмов, обуславливающих наблюдаемое нами повышение численности УПБ в составе полостной микрофлоры кишечника экспериментальных животных. Ещё одна из возможных причин – нарушение целостности и функций слизистой оболочки кишечника.

При воздействии метотрексата на условно-патогенные бактерии *in vitro* не отмечено значимого влияния препарата на адгезивные свойства *S. aureus*, *E. faecalis* и *E. coli*. В отношении *E. coli* констатировано, что пониженные показатели адгезии бактерий этого вида, выделенных у мышей на фоне введения метотрексата, и отсутствие прямого влияния препарата на показатели адгезии *E. coli* ATCC 25922 *in vitro* свидетельствует об отсутствии универсального механизма изменения численности эшерихиозной микрофлоры в результате прямого влияния препарата на адгезивные свойства. При этом нельзя исключить избирательного влияния МТ на адгезивные свойства отдельных штаммов.

Характер воздействия МТ на лекарственную устойчивость АБП был различным в условиях воздействия *in vivo* и *in vitro*.

Наиболее выраженные отличия лекарственной устойчивости от аналогичных показателей контрольной группы выявлены у штаммов, выделенных у

мышей на фоне введения ЦФ и ПЗ; достоверно изменённые уровни чувствительности имели место в первую очередь у кишечных палочек: для типичных КП было выявлено повышение чувствительности к АБП; в отношении КПСФА и ЛНЭБ отмечено как повышение, так и снижение чувствительности к АБП.

Причины выявленных изменений лекарственной устойчивости могут быть связаны с мутагенными эффектами, способными привести к появлению устойчивых мутантов, либо, наоборот, к повышению чувствительности в результате утраты или нарушения структуры и функционирования генов, обуславливающих резистентность; возможна элиминация плазмид лекарственной устойчивости. Предположение о наличии различных причин изменения антибиотикорезистентности условно-патогенных бактерий основывается на выявленном нами разнонаправленном характере изменений рассматриваемых показателей под влиянием исследуемых препаратов: имело место как повышение, так и снижение чувствительности.

Антибиотикорезистентность УПБ менялась на фоне изменения их популяционный уровень, а при изменении численности популяций бактерий может иметь место изменение соотношения чувствительных и устойчивых клеток. Другим механизмом, объясняющим полученные результаты, может быть прямое или косвенное влияние взятых для исследования препаратов на процессы обмена генетическим материалом между бактериями, включая факторы лекарственной устойчивости. Это может происходить как на генетическом уровне в результате влияния препаратов-цитостатиков на репликацию ДНК, так и на уровне микроэкологических взаимоотношений, поскольку при наблюдаемых выраженных сдвигах численности УПБ может существенно изменяться интенсивность процессов внутри- и межпопуляционного генетического обмена.

In vitro, в условиях прямого воздействия МТ, отмечено как снижение, так и повышение чувствительности к АБП, а также разнонаправленные эффекты при воздействии разными концентрациями МТ; преимущественно наблюдалось снижение чувствительности: выявлено 17 эпизодов снижения чувствительности, 8 – повышения и 2 – разнонаправленного воздействия (под «эпизодом» здесь понимается выявление статистически достоверного изменения чувствительности одного штамма УПБ к одному АБП). Отмечены как наследуемые (10 эпизодов, 37% от общего числа выявленных случаев изменения антибиотикорезистентности, из них 6 – снижение чувствительности, 4 – повышение), так и ненаследуемые (17 эпизодов, или 63%, из них 11 – снижение чувствительности, 4 – повышение, 2 – разнонаправленное действие). Среди изменений антибиотикорезистентности преобладают ненаследуемые. Как в случае наследуемых, так и ненаследуемых изменений преобладает снижение чувствительности.

Вероятно, воздействие МТ является специфическим, что выражается в избирательности эффектов в отношении разных АБП. Особенно наглядно это проявляется при сравнении чувствительности к препаратам из одной группы: например, при воздействии МТ на *K. pneumoniae 119* наблюдается статистически достоверное снижение чувствительности данного штамма к амикацину на всём диапазоне концентраций МТ, тогда как в отношении гентамицина в диапазоне концентраций МТ от 10 до 500 мг/л отсутствует даже тенденция к измене-

нию чувствительности *K. pneumoniae 119* к данному препарату; при воздействии МТ на *E. coli ATCC 25922* на всём диапазоне концентраций препарата имеет место повышение чувствительности данного штамма к цефтриаксону (при воздействии 1, 100 и 500 мг/л МТ изменения статистически достоверные, при 10 мг/л - тенденция), тогда как в отношении цефтазидима не выявлена даже тенденция к изменению чувствительности *E. coli ATCC 25922* к данному препарату.

Наследуемое повышение чувствительности УПБ к некоторым АБП может быть связано с элиминацией факторов резистентности, например, плазмид, в результате воздействия МТ. Наследуемое снижение чувствительности можно объяснить направленным действием МТ на гены, ответственные за синтез молекул-мишеней, подвергающихся действию АБП. Ненаследуемые изменения чувствительности говорят о том, что эффекты МТ способны быть обратимыми, и при формировании новых генераций бактерий исходные свойства восстанавливаются.

Результаты выполненных исследований показывают, что цитостатики являются самостоятельными факторами, способными вызывать нарушения состояния микрофлоры организма, а также изменения свойств её отдельных представителей. Характер воздействия рассматриваемых препаратов, по-видимому, является комплексным и может реализовываться как путём прямого воздействия на клетки микроорганизмов, так и опосредованно через макроорганизм и микроэкологические взаимоотношения. Прогнозирование эффектов цитостатиков в отношении микроорганизмов в клинических ситуациях может быть затруднено множественностью факторов, воздействующих на организм пациента, различиями направленности влияния одних и тех же препаратов на микроорганизмы в зависимости от конкретных условий. Это указывает на необходимость максимально широкого использования мер микробиологического мониторинга у пациентов, получающих рассматриваемые препараты, с целью выявления и коррекции микроэкологических нарушений, а также выбора рациональной антибактериальной терапии в случае развития инфекционных осложнений на фоне иммуносупрессии, вызываемой цитостатиками.

ВЫВОДЫ

1. Введение метотрексата, циклофосфида и преднизолона белым мышам вызывает динамические изменения в составе полостной микрофлоры толстой кишки. Микроэкологические нарушения, развивающиеся под влиянием циклофосфида и преднизолона, зависят от продолжительности применения препаратов, усиливаясь в более поздние сроки их введения.
2. Действие препаратов избирательно в отношении уровней колонизации кишечника отдельными представителями микрофлоры: циклофосфид вызывает избыточный рост энтеробактерий, преднизолон – стафилококков; применение метотрексата - повышение численности стафилококков и снижение - энтеробактерий.
3. Влияние цитостатиков на биологические свойства условно-патогенных бактерий *in vivo* выражается в снижении показателей адгезии: при действии циклофосфида – стафилококков, метотрексата – энтеробактерий. Введение преднизолона вызывает повышение показателей адгезии лактозонегативных энтеробактерий. Показатели адгезии энтеробактерий коррелируют с их популяционными уровнями в кишечном микробиоценозе.
4. На фоне воздействия метотрексата, циклофосфида и преднизолона *in vivo* меняется антибиотикорезистентность условно-патогенных бактерий. Эффекты препаратов являются разнонаправленными: у типичных кишечных палочек констатируется повышение чувствительности, у кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью, лактозонегативных энтеробактерий и стафилококков - как повышение, так и снижение чувствительности, что указывает на наличие различных механизмов воздействия исследуемых препаратов на антибиотикорезистентность условно-патогенных бактерий.
5. Воздействие метотрексата *in vitro* проявляется в зависящем от концентрации препарата замедлении развития популяций всех условно-патогенных бактерий, за исключением *P. aeruginosa ATCC 27853*, изменении культуральных свойств *S. aureus ATCC 25923*, показателей адгезии *K. pneumoniae 119* и *P. aeruginosa ATCC 27853*, антибиотикорезистентности всех исследованных штаммов. Повышения устойчивости к метотрексату на фоне его воздействия не отмечено ни *in vivo*, ни *in vitro*.
6. Метотрексат оказывает прямое влияние на антибиотикорезистентность условно-патогенных бактерий, приводя, преимущественно, к повышению резистентности; выявленные изменения, выраженность которых зависит от концентрации препарата, являются в большей мере ненаследуемыми; однако 37% полученных изменений – наследуемые, что в последующих генерациях может существенно изменять структуру популяции бактерий по рассматриваемому признаку.

Практические рекомендации

При ведении больных, получающих цитостатики, необходимо учитывать способность данных препаратов вызывать микроэкологические нарушения; для данной категории пациентов целесообразен контроль со-

стояния кишечного микробиоценоза, проведение профилактики и коррекции дисбактериоза кишечника.

Возможность изменения антибиотикорезистентности условно-патогенных бактерий при применении цитостатиков следует учитывать при выборе рациональной терапии инфекционных осложнений, развившихся у пациентов, получающих данные препараты. Эффективность лечения инфекционных осложнений возможно повысить за счёт мер микробиологического мониторинга лекарственной устойчивости возбудителей.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Шитов, Л.Н.** Изучение влияния циклофосфана на антибиотикорезистентность синегнойной палочки / Л.Н. Шитов // Сборник научных работ студентов и молодых ученых ЯГМА, Ярославль 2004. - С. 28-29.
2. **Шитов, Л.Н.** Влияние метотрексата на рост и резистентность кишечной палочки к некоторым антибактериальным препаратам / Л.Н. Шитов, Н.С. Борисова / Сборник научных работ студентов и молодых ученых ЯГМА, Ярославль 2005. - С. 27-28.
3. Романов, В.А. Влияние метотрексата на резистентность кишечной палочки к некоторым антибактериальным препаратам / В.А. Романов, **Л.Н. Шитов**, Н.С. Борисова // Научно-практическая ревматология. - №3. – 2005. – С.106.
4. **Шитов, Л.Н.** Влияние циклофосамида на некоторые показатели микробиоценоза кишечника мышей / Л.Н. Шитов // Сборник научных работ студентов и молодых ученых ЯГМА, Ярославль 2007. - С. 31-32.
5. **Шитов, Л.Н.** Влияние циклофосамида на рост возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний / Л.Н. Шитов, В.А. Романов, А.А. Макарушин // Материалы IX съезда всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов: В 3-х т. – Москва, 2007. – Т. 2. – С. 285-286.
6. **Шитов, Л.Н.** Влияние иммунодепрессантов на численность стафилококков в составе микрофлоры толстой кишки / Л.Н. Шитов // Фундаментальные исследования. – 2008. - №1. – С.151-152.
7. **Шитов, Л.Н.** Влияние иммунодепрессантов на численность и видовой состав энтерококков в составе микрофлоры толстой кишки / Л.Н. Шитов // Фундаментальные исследования. – 2008. - №1. – С.152-154.
8. **Шитов, Л.Н.** Показатели микрофлоры толстой кишки у белых мышей, получавших метотрексат: дозозависимость эффекта и влияние путей введения / Л.Н. Шитов // Современные наукоёмкие технологии. – 2008. - №5. – С. 83-85.
9. **Шитов, Л.Н.** Влияние иммунодепрессантов на численность и антибиотикорезистентность стафилококков в составе микрофлоры толстой кишки белых мышей / Л.Н. Шитов // Современные возможности клинической лабораторной диагностики в клинко-диагностическом процессе: Сб. науч.-практ. конф. – Ярославль: ООО «Изд. дом «Верхняя Волга», 2008. - С.103-106.
10. **Шитов, Л.Н.** Влияние метотрексата на некоторые показатели микробиоценоза толстой кишки / Л.Н. Шитов // Сборник научных работ студентов и молодых ученых ЯГМА, Ярославль 2008. - С. 78-79.
11. **Шитов, Л.Н.** Влияние иммунодепрессантов на численность энтеробактерий в составе микрофлоры толстой кишки / Л.Н. Шитов // Материалы Пятого съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова: Москва, 2-4 декабря 2008. Под ред. Р.Г. Василова. – М.: ИАЦ, 2008. – С. 255-257.
12. **Шитов, Л.Н.** Влияние иммунодепрессантов на некоторые характеристики микрофлоры толстой кишки белых мышей / Л.Н. Шитов // Сборник материалов V съезда ревматологов России: Москва, 23-27 марта 2009. – С. 131.
13. **Шитов, Л.Н.** Сравнительная оценка влияния иммунодепрессантов различных групп на некоторые показатели микробиоценоза толстой кишки белых

мышей / Л.Н. Шитов // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник научных работ студентов и молодых учёных Всероссийской конференции с международным участием, 22 апреля 2009, Ярославль: ООО "ЯрМедиаГруп", 2009. - С.79-80.

14. **Шитов, Л.Н.** Влияние иммунодепрессантов на антибиотикорезистентность стафилококков и кишечных палочек / Л.Н. Шитов // Сборник материалов X международного конгресса: «Современные проблемы алергологии, иммунологии и иммунофармакологии»: Казань, 20-23 мая 2009. - С. 266.

15. **Шитов, Л.Н.** Влияние метотрексата на рост и развитие популяции условно-патогенных микроорганизмов. / Л.Н. Шитов // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник научных работ сотрудников Ярославской государственной медицинской академии, посвящённый 65-летию ЯГМА. – Ярославль: ООО «ЯрМедиаГруп», 2009. – С. 157-160.

16. **Шитов, Л.Н.** Влияние иммунодепрессантов на популяционный уровень и адгезивные свойства условно-патогенных бактерий толстой кишки белых мышей / Л.Н. Шитов, В.А. Романов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2009. - №6.- С. 12-16.

17. **Шитов, Л.Н.** Влияние метотрексата на антибиотикорезистентность стафилококков и кишечных палочек / Л.Н. Шитов, В.А. Романов // Фундаментальные исследования. - 2010. - №4. - С. 86-91.

Список сокращений

АБП – антибактериальные препараты

АФАМ – аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы

ГМ – гемолитические микроорганизмы

ИАМ – индекс адгезивности микроорганизма

КП – кишечные палочки

КПСФА – кишечные палочки со сниженной ферментативной активностью

ЛНЭБ – лактозонегативные энтеробактерии

МПК – минимальная подавляющая концентрация

МТ – метотрексат

ПЗ – преднизолон

СПА – средний показатель адгезии

УПБ – условно-патогенные бактерии

ЦС – цитостатики

ЦФ – циклофосфамид

АТСС – American type culture collection