

## ХИМИОТЕРАПИЯ

Ю. З. ТЕР-ЗАХАРЯН

**Комбинированное действие активных химиотерапевтических соединений на дизентерийные бактерии**

Исследования последних лет обогатили медицину эффективными противодизентерийными препаратами: сульфамидными соединениями, стрептомицином, ауреомицином, биомицином, тетраамицином, синтомицином, левомицетином. Все эти соединения, как показали многочисленные клинические исследования, обладают высоким терапевтическим действием, однако они не могут в полной мере удовлетворить все запросы клиники. Это объясняется рядом причин: 1) каждый препарат в отдельности не всегда обуславливает достаточный эффект при различных формах дизентерийного процесса; 2) длительное введение одного и того же препарата может привести к развитию лекарственной устойчивости микробов; 4) в процессе лечения у больных появляются побочные токсические явления.

Все эти обстоятельства побудили исследователей, с одной стороны, к изысканию новых противодизентерийных препаратов, а с другой — к разработке наиболее рациональных способов их применения. В частности, большое внимание уделяется методу комбинированной химиотерапии.

При комбинированной химиотерапии имеется возможность получить усиление терапевтического эффекта, замедление развития лекарственной устойчивости микробов, а также ослабление токсических явлений вследствие уменьшения доз отдельных препаратов.

Все увеличивающееся количество эффективных химиотерапевтических средств требует продуманного подхода к их выбору при комбинированной терапии.

При одновременном применении двух лекарственных веществ действие их может быть суммарным, синергическим, антагонистическим, или они могут вообще не влиять друга на друга.

Суммарным мы называем действие в том случае, когда половинная доза одного соединения в сочетании с половинной дозой другого дают тот же эффект, что и целая доза одного из соединений. Если тот же эффект получается при сочетании значительно уменьшенных (иногда даже не эффективных) доз обоих соединений, то это дейст-

вие обозначается как потенцированное—синергическое. Комбинированное применение двух лекарственных веществ может иногда ослабить антимикробное действие; такое явление называется антагонизмом.

Настоящее исследование предпринято с целью установить экспериментально, какие комбинации химиотерапевтических веществ целесообразны и каких комбинаций нужно избегать при лечении дизентерийной инфекции.

Опыты были проведены *in vitro* и *in vivo* с двумя штаммами дизентерийных палочек Флекснера. Из препаратов были взяты сульфатиазол (в виде натриевой соли), стрептомицин и синтомицин.

Для испытания комбинированного действия лекарственных веществ на дизентерийные бактерии группы Флекснера применялись 3 метода: 2 *in vitro* и 1 *in vivo*. При испытании *in vitro* применялся метод серийных разведений, при котором минимальная бактериостатическая концентрация каждого лекарственного вещества в отдельности и в комбинации определялась по интенсивности роста бактерий по сравнению с контролем. Другой метод *in vitro* заключался в учете скорости размножения бактерий по числу выросших колоний. Мы пользовались средой, предложенной О. Г. Биргер и Р. М. Зац.\* К простерилизованной среде стерильно добавлялось нужное количество испытуемых препаратов.

Питательные среды с определенными концентрациями лекарственных веществ засеивались 18-часовой культурой, содержащей  $10^6$  микробов в 0,1 мл. Результаты опытов учитывались после инкубации при  $37^{\circ}$  на 1,2 и 7 сутки.

Одновременно ставились два контроля: контроль среды (без препарата) и контроль культуры.

Условные обозначения: 0 — отсутствие роста, + — слабый рост, ++ — умеренный рост, +++ — сильный рост, ++++ — сплошной рост.

Из каждого разведения делался высеv на агаровые чашки с последующим подсчетом колоний через 24 часа и через 48 или 72 часа.

Эффективность различных комбинаций *in vivo* испытывалась на мышцах, зараженных двумя штаммами дизентерийных палочек Флекснера: один из них был чувствительным (штамм № 12), а другой устойчивым (сп 4) к сульфамидам.

Животные делились на равные группы; каждая группа мышей получала или по одному из препаратов, или их комбинации. Лекарства вводились в объеме 0,5 мл. Контрольная группа мышей оставалась без лечения. Мышам, не получившим лекарства, вводился физиологический раствор в количестве 0,5 мл.

\* О. Г. Биргер и Р. М. Зац. Бюллетень эксп. биол. и мед., 26, 6, 12, 444, 1948.

После заражения животные находились под наблюдением в течение 5 дней. Нелеченные (контрольные) животные погибали в течение первых и вторых суток. При оценке результатов опыта учитывалось количество оставшихся в живых мышей.

Нами изучено действие парных комбинаций сульфатазиола, стрептомицина и синтомицина.

Для проверки активности действия сульфатазиола в комбинации со стрептомицином методом серийных разведений было использовано 7 концентраций стрептомицина и 7 — сульфатазиола (таблица 1).

Таблица 1

Совместное действие сульфатазиола и стрептомицина на бактерии Флекснера штамм № 12 (сульфамидочувствительный). Метод серийных разведений

Сульфатазиол

γ/мл	24 часа							
0,8	0	0	0	0	0	0	0	0
0,4	0	0	0	0	0	0	0	0
0,2	++	+	+	+	+	+	0	0
0,1	+++	+++	+	+	+	+	0	0
0,05	++	++	++	++	++	+	0	0
0,025	++	++	++	++	++	++	0	0
0,0125	++	++	++	++	++	++	0	0
0	++	++	++	++	++	++	++	0
	0	1	2	4	8	16	32	64

Стрептомицин в ед./мл

Сульфатазиол

γ/мл	48 часов							
0,8	0	0	0	0	0	0	0	0
0,4	++	++	++	++	++	0	0	0
0,2	++	++	++	++	++	++	0	0
0,1	++	++	++	++	++	++	0	0
0,05	++	++	++	++	++	++	0	0
0,025	++	++	++	++	++	++	0	0
0,0125	++	++	++	++	++	++	0	0
0	++	++	++	++	++	++	++	0
	0	1	2	4	8	16	32	64

Стрептомицин в ед./мл

Результаты совместного действия этих препаратов на штамм Флекснера № 12, обнаруженные через 24 и 48 часов, представлены в таблице в виде координат, которые указывают концентрации препаратов в каждой пробирке.

В таблице активные и неактивные комбинации отделены друг от друга сплошной линией. Концентрации препаратов, обнаруживающие синергизм, находятся в части таблицы, ограниченной сплошной и прерывистой линиями. Контроли каждой концентрации препаратов отделены пунктирной линией. Таблицы следует читать так, чтобы при постоянной концентрации одного препарата следить за влиянием на него возрастающих количеств другого препарата по вертикальной или горизонтальной линии.

Из данных этой таблицы видно, что через 24 часа дозы стрептомицина от 1 до 8 ед./мл дали суммарное действие с большими дозами сульфатиазола. При более высокой дозе стрептомицина (16 ед./мл) суммарное действие наблюдалось уже при комбинации и с малыми дозами сульфатиазола (от 0,125 до 0,2  $\gamma$ /мл). Доза стрептомицина в 32 ед./мл (половина бактерицидной) дала явно выраженный синергизм действия со всеми дозами сульфатиазола, начиная от 1/64 до 1/2 бактерицидной дозы. Комбинация сульфатиазола натрия и стрептомицина дала также синергизм действия и через 48 часов.

Аналогичные результаты были получены в опытах с другим сульфамидочувствительным штаммом Флекснера („Бабаджан“).

Проверка методом подсчета колоний также показала, что действие препаратов в этой комбинации было большей частью синергическим (таблица 2). Через 24 часа стрептомицин во всех концентрациях активизирует действие сульфатиазола в концентрациях 0,1 — 0,2  $\gamma$ /мл. При повышении концентрации стрептомицина от 8 до 32 ед./мл синергизм действия проявляется с еще более низкими концентрациями сульфатиазола. Широкая область концентраций обоих препаратов, при которых обнаружено их синергическое действие, дает основание считать, что данная комбинация является наиболее действенной при дизентерийной инфекции. Это подтверждается и тем, что и через 72 часа самые малые субоптимальные концентрации сульфатиазола 0,025  $\gamma$ /мл — (1/32 бактерицидной) активизируют антибактериальное действие 32 ед./мл стрептомицина:

Затем было проведено комбинированное лечение мышей этими препаратами (таблица 3). При этом было установлено, что если зараженным мышам вводить только один сульфатиазол в дозе от 6 до 30 мг на мыш, то выживаемость возрастала по мере увеличения лечебной дозы. При введении же одного стрептомицина от 20 до 100 ед. на мыш выживаемость не всегда возрастала пропорционально дозе препарата. В то же время введение этих двух препаратов одновременно показало эффективность комбинированного лечения дизентерийной инфекции.

Таблица 2

Совместное действие сульфатиазола и стрептомицина на бактерии Флекснера штамм № 12 сульфамидочувствительный. Метод подсчета колоний

Сульфатиазол γ/мл	24 часа					
	0	2	4	8	16	32
0,4	123·10 <sup>4</sup>	143·10 <sup>4</sup>	113·10 <sup>4</sup>	167·10 <sup>4</sup>	675·10 <sup>3</sup>	0
0,2	171·10 <sup>4</sup>	77·10 <sup>6</sup>	67·10 <sup>6</sup>	67·10 <sup>6</sup>	4·10 <sup>6</sup>	0
0,1	∞	186·10 <sup>7</sup>	160·10 <sup>7</sup>	973·10 <sup>6</sup>	134·10 <sup>6</sup>	0
0,05	∞	∞	∞	212·10 <sup>7</sup>	433·10 <sup>6</sup>	0
0,025	∞	∞	∞	∞	∞	0
0	∞	∞	∞	∞	∞	81·10 <sup>4</sup>
	0	2	4	8	16	32

Сульфатиазол γ/мл	72 часа					
	0	2	4	8	16	32
0,4	∞	∞	∞	729·10 <sup>3</sup>	700·10 <sup>3</sup>	0
0,2	∞	∞	∞	∞	∞	0
0,1	∞	∞	∞	∞	∞	600·10 <sup>3</sup>
0,05	∞	∞	∞	∞	∞	441·10 <sup>3</sup>
0,025	∞	∞	∞	∞	∞	0
0	∞	∞	∞	∞	∞	∞
	0	2	4	8	16	32

Таблица 3

Совместное действие сульфатиазола и стрептомицина при экспериментальной дизентерийной инфекции мышей бактерии Флекснера штамм № 12 (сульфамидочувствительные)

Препараты		Количество мышей в опыте	Количество выживших мышей при лечении			Оценка действия
сульфатиазол мг/мышь	Стрептомицин ед./мышь		сульфатиазол	стрептомицин	сульфатиазол и стрептомицин	
6	20	20	0	5	11	С
	40	20	0	6	17	С
	80	15	0	10	12	С
	100	5	0	3	5	С
10	20	30	13	10	24	С
	40	30	13	15	26	С
	80	15	8	10	15	С
	100	5	3	3	5	С
20	20	15	11	6	13	—
	40	15	11	9	15	—
	80	5	5	2	5	—
	100	5	5	3	5	—
30	20	5	5	1	5	—
	40	5	5	0	5	—
	80	5	5	2	5	—
	100	5	5	3	5	—

С—синергизм или суммарное действие.

—отсутствие действия

Добавление стрептомицина от 20 до 100 ед. к сульфатиазолу увеличивало в большинстве случаев выживаемость мышей иногда до 100%; наблюдалось явление синергизма. Суммарное действие выявилось при добавлении этих же доз стрептомицина к большей дозе сульфатиазола (10 мг). При увеличении лечебных доз как сульфатиазола, так и стрептомицина лечебный эффект ни в одном случае не исчезал (таблица 3).

Таким образом, результаты, полученные *in vivo*, подтверждают данные, полученные *in vitro*.

Однако синергическое действие имеет место только тогда, когда возбудитель, как в данном случае, чувствителен к обоим препаратам, входящим в комбинацию. Иные результаты получаются в опытах с сульфамидоустойчивым штаммом, как это показывает следующий опыт.

Мышей заражали смертельной дозой сульфамидоустойчивого дизентерийного штамма Флекснера СП-3 и лечили сульфатиазолом и стрептомицином в отдельности и в комбинации (таблица 4).

Таблица 4

Комбинированное действие сульфатиазола и стрептомицина бактерии Флекснера штамм СП-4 (сульфамидоустойчивый)

Сульфатиазол мг/мышь	Количество мышей в группе	Стрептомицин ед./мышь			
		0	20	40	100
		Количество выживших мышей			
0	5	0	1	2	5
15	5	1	0	2	5
30	5	1	2	3	2
60	5	0	0	1	4

При комбинированном лечении сочетание различных доз сульфатиазола и стрептомицина не улучшило результатов опыта: процент гибели мышей был так же высок, как и при лечении одним сульфатиазолом.

Отрицательные результаты этого опыта подтверждают установленное некоторыми исследователями (Хобби и Даусон\*) положение, что синергическое действие может проявляться только в том случае, если микроб чувствителен к обоим химиотерапевтическим препаратам.

Одновременно нами были испытаны комбинации сульфатиазола с синтомицином и синтомицина со стрептомицином.

В опытах *in vitro* мы убедились, что сочетание сульфатиазола и синтомицина ни при одной из испытанных концентраций не обеспечило бактерицидного действия и не ускорило антибактериального эффекта на дизентерийные палочки Флекснера, как сульфамидоустойчивые, так и сульфамидочувствительные.

\* G. Z. Hobby, M. H. Dawson, Y. Bacteriol 52, 4, 447, 1946.

Данные опытов *in vivo* приведены в таблице 5. Как видно из этой таблицы, при постоянной дозе сульфатазозола и различных дозах синтомицина любая комбинация дает большее количество выживших животных, чем при одном сульфатазозоле. Однако с любой дозой синтомицина, в пределах данного эксперимента, чем больше введено было сульфатазозола, тем больше выживало мышей, за исключением дозы сульфатазозола — 20 мг с дозой синтомицина 0,5 мг.

Таблица 5

Совместное действие сульфатазозола и синтомицина при экспериментальной дизентерийной инфекции мышей бактерии Флекснера штамм № 12 (сульфамидочувствительный)

Препараты		К-во мышей в опыте	Количество выживших мышей при лечении			Оценка действия
сульфатазозол мг/мышь	синтомицин мг/мышь		сульфатазозол	синтомицин	сульфатазозол и синтомицин	
6	0,25	5	0	0	0	—
	0,5	10	0	0	0	—
	1	20	0	4	10	С
	2	15	0	9	7	—
	4	5	0	4	5	—
8	0,25	5	1	0	0	—
	0,5	5	1	0	2	—
	1	5	1	0	5	С
	2	5	1	4	3	—
	4	5	1	5	5	—
10	0,25	5	2	0	1	—
	0,5	10	2	0	5	С
	1	15	2	2	11	С
	2	15	2	9	9	—
	4	5	2	4	4	—
20	0,25	5	3	0	0	—
	0,5	5	3	0	0	—
	1	5	3	0	5	—
	2	5	3	5	5	—
	4	5	3	4	5	—

С — синергизм или суммарное действие.

— — отсутствие действия.

Данные опытов *in vivo* показывают, что синтомицин в сочетании с сульфатазозолом не препятствует действию последнего, а даже в известных концентрациях дает повышенный эффект действия.

Исследование зависимости эффекта лечения от доз сульфатазозола и синтомицина при совместном их действии проверялось также и на сульфамидоустойчивом штамме дизентерийных палочек Флекснера Известия VIII, № 8—7

СП-4 (таблица 6). В этом опыте можно было почти во всех случаях установить антагонизм при различных дозах.

Таблица 6

Комбинированное действие сульфатазола и синтомицина бактерии Флекснера штамм СП-5 (сульфамидоустойчивый)

Сульфати- ззол мг/мышь	К-во мышей в группе	С и н т о м и ц и н м г / м ы ш ь			
		0	0,5	1	2
		Количество выживших мышей			
0	5	0	2	5	5
15	5	0	0	1	4
30	5	0	1	2	2
60	5	1	0	4	1

В данном случае результаты, полученные *in vivo*, не вполне подтверждают данные *in vitro*. В то время как в опытах *in vitro* не проявилось различия между действием препаратов на чувствительный и устойчивый штаммы, в опытах *in vivo* наблюдался антагонизм при лечении мышей, зараженных устойчивым штаммом.

Сульфатазол, введенный не зараженным мышам в дозах 15, 30 и 60 мг на мышь в отдельности или совместно с синтомицином, никогда не давал каких-либо токсических явлений.

Следовательно, большой процент смертности, вызванный совместным применением обоих препаратов, не может быть отнесен к прямому токсическому действию лекарств, даже в дозе 60 мг, где выживаемость не ниже контроля (с одним препаратом), а даже выше.

Представленные данные позволяют заключить, что сульфатазол и синтомицин, в некоторой степени, тормозят действие друг друга при экспериментальной дизентерийной инфекции, вызванной сульфамидоустойчивым штаммом Флекснера СП-4.

Материалы, представленные здесь, указывают на то, что не всегда данные, полученные *in vitro*, точно совпадают с данными, полученными *in vivo*.

Установить постоянные лекарственные „пары“ препаратов — синергистов или антагонистов невозможно, так как по отношению к разным дозам действие их меняется.

Возможно, что такое расхождение объясняется иными количественными соотношениями лекарственных препаратов в пробирке и в организме.

Это происходит, возможно, и потому, что условия жизни бактерий в тканях организма разнятся от роста этих же бактерий в питательной среде. Кроме того, не все лекарственные препараты проникают во все ткани в одинаковой степени; по этой причине и концентрации могут широко варьировать на том участке, где находятся бактерии, что может обусловить различное лечебное действие.

Проверка активности совместного действия синтомицина и стреп-

томицина была произведена на чувствительном и устойчивом к сульфамидам штаммах дизентерийной палочки Флекснера.

В опытах *in vitro* синтомицина был взят в концентрациях от 0,0625  $\gamma$ /мл до 4  $\gamma$ /мл, стрептомицин от 0,5 ед./мл до 64 ед./мл.

*In vitro* небольшое суммарное действие было обнаружено лишь при совместном применении 32 ед. стрептомицина с 2  $\gamma$ /мл синтомицина. Различные сочетания всех других концентраций препаратов никак не отразились на их действии.

И в опытах *in vivo* совместное воздействие синтомицина и стрептомицина на штамм Флекснера № 12 (сульфамидочувствительный) мало отражалось на эффективности конечных результатов; смесь этих препаратов не мешает их антибактериальному действию. Аналогичные данные были получены и со штаммом Флекснера СП-4 (сульфамидоустойчивый).

### В ы в о д ы

1. Как *in vitro*, так и *in vivo* синергическим действием обладала преимущественно комбинация сульфатазиола со стрептомицином. Совместное применение этих препаратов гораздо более эффективно, чем применение каждого из них в отдельности. Эффект действия *in vitro* может усиливаться в 64 раза.

2. Сочетание сульфатазиола с синтомицином дало менее постоянные результаты. *In vitro* не наблюдалось усиления задержки роста микробов. В опытах *in vivo* иногда можно было установить суммарное или даже синергическое действие.

3. Комбинированное применение синтомицина и стрептомицина как в опытах *in vitro*, так и в опытах *in vivo* в большинстве случаев не изменяло результатов опыта.

4. Полученные в эксперименте данные могут служить предпосылкой для рационального применения комбинированной химиотерапии бактериальной дизентерии.

Лаборатория фармацевтической химии Академии наук АрмССР

Поступило 29/X 1954 г.

### Յու. Զ. Տեր-Ջարարյան

## ԱԿՏԻՎ ՔԻՄԻԱԹԵՐԱՊԵՎՏԻԿ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԿՈՄԲԻՆԱՑՎԱԾ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴԻՋԵՆՏԵՐԻԱՅԻ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՎՐԱ

### Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Բահաերիալ գիգենտերիայի քիմիաթերապիայի հաջողությունները կախված են ոչ միայն նոր գեղամիջոցների հայտնագործումից, այլև արդեն գոյություն ունեցող գեղամիջոցների կիրառման ուսցիտնայ մեթոդներից: Այդ մեթոդներից մեկն է կոմբինացված քիմիաթերապիան:

Տվյալ աշխատություն մեջ ուսումնասիրված է բակտերիալ գիզենտերիայից բուժելու համար կիրառվող գեղամիջոցների կոմբինացված ազդեցությունը in vitro և in vivo. Տրված է այդ գեղամիջոցների տարրեր զուգորդումների համեմատական գնահատումը և նրանց մեջ հայտնաբերված են ամենից ավելի էֆեկտիվները:

Ստացված ավյալները հիմք են տալիս անկուռ հետևյալ եզրակացությունները.

1. Ինչպես in vitro, այնպես էլ in vivo սիներգիկ ազդեցություն ունի գլխավորապես սուլֆաախաղոլի կոմբինացիան ստրեպտոմիցինի հետ: Այդ գեղամիջոցների համառեզ կիրառումը շատ ավելի էֆեկտիվ է, քան նրանցից յուրաքանչյուրի առանձին կիրառումը: Ազդեցության էֆեկտը in vitro կարող է ուժեղանալ 64 անգամ:

2. Սուլֆաախաղոլի զուգորդումը սինտոմիցինի հետ ավելի ավելի փոփոխական արդյունքներ է տալիս in vitro չի դիտվում միկրոբների աճի կասեցման ուժեղացում: In vivo փորձերում երբեմն կարելի է հայտնաբերել զուգորդյին, կամ նույնիսկ՝ սիներգիկ ազդեցություն:

3. Սինտոմիցինի և ստրեպտոմիցինի կոմբինացված կիրառումը ինչպես in vitro, այնպես էլ in vivo փորձերում մեծ մասամբ չի փոխում փորձի արդյունքները:

4. Էքսպերիմենտում ստացված ավյալները կարող են որպես նախադրրյալ ծառայել բակտերիալ գիզենտերիայի կոմբինացված քիմիաթերապիայի ուսցիտնալ կիրառման համար: