



LEGE ARTIS MEDICINÆ

ÚJ MAGYAR ORVOSI HÍRMONDÓ

ALAPÍTVÁ 1990-BEN A MAGYAR ORVOSLÁS TUDOMÁNYOS ÉS MŰVÉSZI SZÍNVONALÁNAK EMELÉSÉRE,
A NEMZET EGÉSZSÉGI ÁLLAPOTÁNAK JOBBÍTÁSÁRA.

*Sok szerettel és
köszönettel*

Martinka (szü)nek

91.08.02.

Postánként hívnak

Fela

In vitro kombinációs gyógyszerhatás *Borrelia burgdorferi* törzsre

Bózsik Béla Pál

IN VITRO EFFECTS OF DIFFERENT
COMBINATIONS OF ANTIBIOTICS
ON *BORRELIA BURGDORFERI*

In vitro experiments have been carried out on *Borrelia burgdorferi* B-31. Both combination of the antibiotics *pefloxacin* and *doxycyclin* and that of *pefloxacin* and *ceftriaxon* have been shown efficient.

Our experiments provide theoretical basis for a therapy with a new approach, using an antimicrobial drug that causes damage to the genetic make-up of the bacteria combined with drugs that have other, non-genetic effects.

Borrelia burgdorferi B-31 törzsön in vitro vizsgált pefloxacin-doxycyclin és pefloxacin-ceftriaxon kombináció hatékonyak bizonyult. Kísérletek egy genetikai állományt károsító gyógyszernek más támadáspontú antibiotikummal, vagy antibiotikumokkal kialakított kombinációjából álló új szemléletű kezelés elméleti alapját adják.

Correspondence:

Béla P. Bózsik MD, consultant
Johan Béla National Institute Of Hygiene
Laboratory for Serology
1966 Budapest, Pf. 64. Hungary

Levelezési cím:

dr. Bózsik Béla Pál főorvos
Johan Béla Országos Közegészségügyi Intézet
Szerológiai Laboratórium
1966 BUDAPEST, Pf. 64.

Borrelia burgdorferi, antibiotic efficiency,
in-vitro examinations

Borellia burgdorferi, antibiotikum-hatás,
in-vitro vizsgálatok

Lyme (Conn., USA) kisvárosban és környékén 1975-ben két édesanya bejelentését követően juvenilis típusú rheumatoid arthritis endemiát regisztráltak. A vizsgálatok azt igazolták, hogy az észlelt kórkép az egész szervezetet érinti, progresszív természetű, és számos, korábban ismeretlen aetiológiájú szindrómát, betegséget foglal magába. E megállapításokat jórészt a kórokozó *Borrelia burgdorferi* kimutatása tette lehetővé, melynek ismeretében megindulhattak azok a vizsgálatok is, melyek célja a betegség hatékony antibiotikus terápiájának kidolgozása volt. In vitro kísérletekben a penicillin igen mérsékelt, míg fél-

szintetikus származékai, ill. az erythromycin, tetracyclin, doxycyclin, minocyclin, chloramphenicol, cefotaxim, ceftriaxon *Borrelia burgdorferi* törzsek szaporodását (1, 2, 3) változó mértékben gátló hatását mutatták ki. Újabb adatok pedig az azalid típusú – erythromycinből kifejlesztett – antibiotikumok, mint amilyen az azithromycin, clarithromycin és a roxythromycin kifejezett in vitro és in vivo (2), sőt humán terápiás (Strle személyes közlése) hatását bizonyítják. Az in vitro vizsgált törzsek rezisztensek voltak aminoglycosidokra, rifampinra, metronidazolra és co-trimoxazol (trimethoprim-sulfamethoxazol)-ra (1). Az erythro-

mycin kivételével az in vitro és az in vivo adatok között elég jó, klinikailag is alkalmazható mértékben mutattak ki összefüggést (3). Azonban még a legújabb monoterápiás kezeléssel – amelyben 3–4 hétig parenterálisan napi 2, illetve 4 g ceftriaxont alkalmaztak – sem volt gyógyítható a betegek 13–15 százaléka (3).

Indokoltnak látszott tehát egy új szemléletű, esetleg kombinált kezelés bevezetése. Ilyen irányú vizsgálataink előzetes eredményeit az alábbiakban ismertetjük.

Anyagok és módszerek

In vitro kísérletekben pefloxacin (Rhone-Poulenc licence alapján az EGIS által gyártott Peflacin alapanyaga), valamint ceftriaxont (Rocephine) és doxycyclint (Vibramycin) használtunk.

Az antibiotikumhatást *Borrelia burgdorferi* B-31 (prof. Barbour, Dr. Stanek) törzsön vizsgáltuk. A törzs fenntartását és a kísérleteket „BSK-II” módosítás szerinti folyékony táptalajban, semi-anaerob körülmények között végeztük. (1). A törzs fenntartása közben szerzett tapasztalatok alapján, az irodalomban leírtaktól eltérően, antibiotikumok nélküli táptalajt használtunk. Így törzsünk különösen alkalmas volt az antibacterialis gátlóhatás zavartalan kimutatására, mert először csak a kísérletkor találkozott a vizsgált antibiotikumokkal. Kísérleteink során önapos, logaritmikus növekedési fázisban levő tenyészeteket vizsgáltunk. A vizsgált antibiotikumokat a tápoldatban hígítottuk. A logaritmikus (tízes léptékű) hígításokat doxycyclinből és pefloxacinból 40,0–0,0004, ill. ceftriaxonból 10,0–0,0001 µg/ml (mg/L) koncentrációhatárok között végeztük. A kombinált antibiotikumhatást sakkátblaszerű elrendezésben detektáltuk. A *Borrelia burgdorferi* csíraszámát $1-10 \times 10^7$ csíra/ml koncentrációra állítottuk be.

Kontrollként antibiotikummentes táptalajt, illetve az egyes antibiotikumok tízes léptékű hígításait tartalmazó táptalajt használtunk.

A kiértékelést sötét látóteres mikroszkóppal végeztük. A gyógyszerhatás *Borrelia burgdorferi* törzseken történő kialakulásához javasolt időt, az 5–6. napot (1, 2) minden esetben kivártuk. Az antibiotikumhatást a baktérium szaporodását gátló minimális koncentrációval (MIC, Minimal Inhibitory Concentration) jellemeztük. Két antibiotikum együttes hatását ismételt vizsgálatok alapján értékeltük. A gyógyszerkombinációt az egyedi MIC-értékek alapján várt, és a kombinációban észlelt gátlóhatás összehasonlításával elemeztük.

Eredmények

A *Borrelia burgdorferi* B-31 törzs növekedésének gátlásához az egyedi gyógyszerhatást vizsgáló kont-

1. táblázat

Együttes antibiotikumhatás *Borrelia burgdorferi* B-31 törzsön

pefloxacin µg/ml	40	4	0,4	0,04	0,004
doxycyclin µg/ml					
40	–	–	–	–	–
4	–	–*	–	–	–
0,4	–	–	–	?	?
0,04	–	–	+**	+	+
0,004	–	?	+	+	+
0,0004	–	?	+	+	+

+ : *Borrelia burgdorferi* szaporodása zavartalan

– : *Borrelia burgdorferi* nem szaporodik

? : *Borrelia burgdorferi* szaporodása részlegesen gátolt

* : Egyedi MIC-értékek alapján várt gátlóhatás

** : Gyógyszerkombinációban észlelt gátlóhatás

2. táblázat

Együttes antibiotikumhatás *Borrelia burgdorferi* B-31 törzsön

pefloxacin µg/ml	40	4	0,4	0,04	0,004
ceftriaxon µg/ml					
10	–	–	–	–	–
1	–	–	–	–	–
0,1	–	–*	–	?	?
0,01	–	–	+**	+	+
0,001	–	?	+	+	+
0,0001	–	?	+	+	+

+ : *Borrelia burgdorferi* szaporodása zavartalan

– : *Borrelia burgdorferi* nem szaporodik

? : *Borrelia burgdorferi* szaporodása részlegesen gátolt

* : Egyedi MIC-értékek alapján várt gátlóhatás

** : Gyógyszerkombinációban észlelt gátlóhatás

rollokban doxycyclinből és pefloxacinból 4,0–4,0 µg/ml, míg ceftriaxonból 0,1 µg/ml volt szükséges.

Az együttes gyógyszerhatást pefloxacin-doxycyclin és pefloxacin-ceftriaxon kombinációkban vizsgáltuk. Ekkor a gátláshoz szükséges minimális koncentráció doxycyclinnél 0,04 µg/ml, ceftriaxonnál pedig 0,01 µg/ml alá csökkent, de pefloxacinból is elegendő volt tizednyi: 0,4 µg/ml. Vizsgálati eredményeinket az I. és a II. táblázatokban összegezve mutatjuk be.

dr. Bózsik Béla Pál
főorvos
Johan Béla
Országos Közegészségügyi
Intézet
Szerológiai Laboratórium
Érkezett: 1991. február 8.
Elfogadva: 1991. február 22.

Megbeszélés

Jelenleg a *Lyme borreliosis* szinte kizárólag monoterápiás eljárásokkal kezelik (3). A leghatékonyabbnak tartott ceftriaxon-kezelés 15% körüli hatástalansága (3), a tetracyclinekkel észlelt korábbi kudarok (3) egyaránt egy alapvetően új gyógyítási eljárás keresését sürgetik. Ugyanakkor a legújabb, azalid típusú antibiotikumokkal nem rendelkezünk még elegendő tapasztalattal (3).

Új antibiotikus kezelés kialakításához szükséges figyelembe venni a *Borrelia burgdorferi* egyik igen jellemző sajátosságát: rendkívül kisszámú felszíni antigénje alig ad lehetőséget az ellenanyagok kapcsolódására, ráadásul az antigének szerkezetét, immunkémiaiilag is követhető mértékben, néhány nap alatt képes megváltoztatni (1, 4), amely utóbbi az antibiotikumhatást is befolyásolhatja. A fentiek elősegíthetik, hogy a *Borrelia burgdorferi* elkerülhesse a szervezet védekező mechanizmusait. A felszíni antigének ezt a jellegzetes változását a *Borrelia burgdorferi* extrachromosomális plazmidja szabályozza (1, 4). Kísérleteink kezdetén – más baktériumokon tapasztaltak (5) analógiájára – feltételeztük, hogy a fluoroquinolonok DNS-giráz működését gátló hatása a *Borrelia burgdorferi* genetikai állományát is károsítja. A *Borrelia burgdorferi* törzseken eddig kombinációban alkalmazott antibiotikumhatásról nem számoltak be. Eredményeink azt mutatják, hogy az antibiotikumkombináció gátló hatása mind a pefloxacin-doxycyclin, mind a pefloxacin-ceftriaxon esetén kifejezettebb, mint ahogy azt az egyedi MIC-értékekből várhatnánk. Úgy gondoljuk, hogy a kórokozóra egyébként hatásos doxycyclin és ceftriaxon – közvetett úton – aktiválják a *Borrelia burgdorferi* nyugalomban levő genetikai állományát és ezáltal a pefloxacin antibakteriális hatását is jelentősen növelik. Itt jegyezzük meg, hogy az egyes antibiotikumok általunk talált MIC-értékei az irodalomban ismertetett értékek felső határán (1, 2, 3) voltak. Ennek okát a szokásost két-három nagyságrenddel meghaladó csíraszám alkalmazásával magyarázzuk. Az irodalmi adatok szerint a quinolonhatás vizsgálatánál ennél nagyobb eltérés sem befolyásolta a gátlóhatás kialakulását (5).

Indokolt arra gondolni, hogy a gyógyszerkombináció a rendkívül kifejezett alkalmazkodóképességgel rendelkező *Borrelia burgdorferi* mutációs rátáját is lecsökkentve – ahogy azt más baktériumtörzseknél már kimutatták (5) – megakadályozhatja a gyógyszer-rezisztencia kialakulását. A felszíni antigénszerkezet változásának feltételezhető blokkolásával pedig a hatékony szerkezeti védekezés kialakulására ad lehetőséget. Így a kombináció

in vitro tapasztalt antibakteriális hatása a szervezetben még jelentősebbé válhat.

A *Borrelia burgdorferi* évekig, évtizedekig előforduló persistálása, intracellularis és vérellátástól távoli elhelyezkedése (1, 4) miatt különösen előnyös, hogy mindhárom általunk vizsgált és az azalid típusú antibiotikumok is kiváló szöveti penetrációs képességgel rendelkeznek (3, 5, 2). Így a kombinációban kialakított együttes hatásukat a szervezetben mindenütt kifejthetik.

Az együttes gyógyszerhatás szempontjából különösen figyelemreméltóak egy dual-action (kettős hatású) cephalosporinnal végzett kísérletek (6, 7). Ebben a vegyületben egy molekulán belül két antibiotikumhatású rész van: az egyik cephalosporin, a másik quinolon természetű. Bár a vegyületnek in vitro, sőt állatkísérletekben is több mint 60 különböző törzsre gyakorolt hatását vizsgálták, azok között sem *Spirochaeta*, sem *Borrelia* törzsek nem szerepeltek (6, 7). Saját kísérleteinkben a *Borrelia burgdorferi* törzsön pefloxacin ceftriaxonnal, ill. doxycyclinnel kombinációban tapasztalt hatásfokozódásból a dual-action cephalosporinok alkalmazási lehetőségére következtetünk.

Az elméletileg föltételezett és in vitro bizonyított hatás igazolására jelenleg folynak klinikai vizsgálatok hazánkban.

Következtetés

Lyme borreliosisban – esetleg még a késői, progresszív stádiumban – szenvedő betegek gyógyítására új lehetőséget nyújthat, ha egy genetikai állományt károsító gyógyszert más támadásponton ható antibiotikummal vagy antibiotikumokkal alkalmazunk együtt.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Barbour A G. Laboratory aspects of Lyme Borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 1989; 1: 399–414.
2. Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G et al. Comparative Antimicrobial Activity of the New Macrolides against *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 1989; 8: 651–3.
3. Luft B J, Gorevic P D, Halperin J J et al. A Perspective on the Treatment of Lyme Borreliosis. *Rev Inf Dis* 1989; 11 (Suppl. 6.): 1518–1525.
4. Benach J G, Szczepanski A, Garcia Monco J C. Biological Features of *Borrelia burgdorferi*. *Lab Med* 1990; 21: 293–7.
5. Gonzalez J P, Henwood J M. Pefloxacin (Review). *Drugs* 1989; 37: 628–668.
6. Beskid G, Fallat V, Lipschitz E R et al. In vitro Activities of a Dual-Action Antibacterial Agent, Ro 23–9424, and Comparative Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1072–1077.
7. Christenson J G, Chan K K, Cleeland R et al. Pharmacokinetics of Ro 23–9424, a Dual-Action Cephalosporin, in Animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1895–1900.