

Ф. Д. Тапальский
СИНЕРГИДНАЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
КОМБИНАЦИЙ АНТИБИОТИКОВ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

Научные руководители: к.м.н., доцент Окулич В.К.,

к.м.н., доцент Тапальский Д.В.

Кафедра клинической микробиологии

Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск

Резюме. Проведен поиск комбинаций антибиотиков и настоев лекарственных растений, обладающих синергидной антибактериальной активностью. Выявлен дозозависимый синергидный эффект комбинации цефтазидима и водного экстракта эвкалипта прутовидного в отношении антибиотикорезистентных штаммов *Acinetobacter baumannii*.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, грамотрицательные бактерии, лекарственные растения, синергизм, антибиотики .

Resume. A search for combinations of antibiotics and infusions of medicinal plants with synergistic antibacterial activity was carried out. A dose-dependent synergistic effect of the combination of ceftazidime and aqueous extract of *Eucalyptus viminalis* against antibiotic-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* was revealed.

Keywords: Antibiotic resistance, Gram-negative bacteria, medicinal plants, synergism, antibiotics.

Актуальность. Энтеробактерии и грамотрицательные неферментирующие бактерии являются одними из наиболее распространенных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, при этом во многих странах мира отмечается неуклонное увеличение их устойчивости к большинству антибактериальных препаратов [1]. Перспективным направлением антибактериальной терапии инфекций, вызванных антибиотикорезистентными бактериями, является использование комбинаций антибиотиков. Появление штаммов грамотрицательных бактерий с полной устойчивостью к антибиотикам требует поиска альтернативных подходов к антибактериальной терапии. Бактерицидные свойства растений на протяжении тысячелетий используются в традиционной медицине. Растения имеют неограниченные возможности синтезировать огромный спектр вторичных метаболитов (алкалоидов, гликозидов, терпеноидов, сапонинов, флавоноидов, кумаринов, хинонов, противомикробных и противогрибковых пептидов), оказывающих повреждающее действие на бактериальную клетку и тормозящих рост и размножение бактерий [2].

Показана высокая бактерицидная активность ряда экстрактов из лекарственных растений в отношении грамотрицательных неферментирующих бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам [3, 4]. В доступной литературе отсутствуют данные о фармакодинамическом взаимодействии вторичных метаболитов растений, имеющих антибактериальную активность, и антибиотиков. Представляет интерес поиск комбинаций антимикробных веществ растительного происхождения и антибиотиков, оказывающих синергидный эффект при совместном воздействии на бактериальную клетку.

Цель: Выявить комбинации антибиотиков и растительных экстрактов, обладающих синергидной антибактериальной активностью.

Задачи:

1. Определить микробиологическую активность антибиотиков и экстрактов лекарственных растений в отношении антибиотикорезистентных штаммов грамотрицательных бактерий.

2. Определить характер фармакологических взаимодействий антибиотиков и растительных экстрактов при их совместном воздействии на микроорганизмы.

Материал и методы. В исследование включены лекарственные растения с предварительно установленной выраженной антибактериальной активностью [4]. Использовали растительное сырье, приобретенное в аптечной сети: эвкалипт прутовидный – листья (ООО «Алтайфарм», Россия), брусника обыкновенная – листья (ЗАО «БелАсептика», Беларусь), дуб обыкновенный – кора (ООО «НПК Биотест», Беларусь). Настои готовили путем 10-минутного кипячения на водяной бане сухого измельченного растительного сырья и дистиллированной воды в соотношении 1:10, охлаждали при температуре 24°C в течение 45 минут, затем процеживали через марлевый и бумажный фильтры и выполняли стерилизующую фильтрацию с помощью фильтров Filtropur S 0,45 (Sarstedt, Германия). Из рабочей коллекции отобраны антибиотикорезистентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* БК-024, *K. pneumoniae* БК-029, *Acinetobacter baumannii* БА-026, *A. baumannii* БА-032 (устойчивые к большинству антибиотиков, за исключением полимиксинов и тигециклина), *Pseudomonas aeruginosa* БП-056 и *P. aeruginosa* БП-074 (устойчивые к большинству антибиотиков, за исключением полимиксинов). Все штаммы выделены в 2016 году от госпитализированных пациентов с бактериальными инфекциями. Дополнительно в исследование включены типовые штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *K. pneumoniae* ATCC 700603.

В расплавленный и остуженный до 45°C агар Мюллера-Хинтона (МХА) вносили водные настои лекарственных растений в объемном соотношении (настой : среда) 1:7 и 1:15. В предварительном эксперименте показано, что для различных штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* используемые в среде концентрации водных экстрактов составляют 1/32 – 1/4 от минимальной подавляющей концентрации и не препятствуют росту микроорганизмов. Полученные среды разливали по 20 мл в 90-мм полистироловые чашки Петри и выдерживали до застывания среды. В качестве контролей использовали чашки Петри с 20 мл МХА.

Из суточных культур тестируемых микроорганизмов, выращенных на ГРМ-агаре, готовили бактериальные суспензии с оптической плотностью 0,5 МакФарланд. Контрольные и опытные чашки инокулировали бактериальными суспензиями и автоматическим диспенсером на каждую чашку наносили 8 дисков с антибиотиками (BD, США): амикацин 30 мкг, тобрамицин 30 мкг, имипенем 10 мкг, меропенем 10 мкг, цефтазидим 30 мкг, ципрофлоксацин 5 мкг, тигециклин 15 мкг, колистин 10 мкг. Чашки инкубировали 18 часов при 35°C и учитывали результаты, измеряя и сравнивая диаметры зон подавления роста вокруг дисков с антибиотиками на контрольных чашках и чашках, содержащих растительные экстракты. При уменьшении в присутствии в среде растительного экстракта диаметра зоны подавления роста на 3 мм и более по сравнению с контролем эффект взаимодействия антибиотика с растительным экстрактом считали антагонистическим, при увеличении на 3 мм и более – си-

нергидным. Для количественной оценки выраженности синергидного эффекта комбинаций «антибиотик + растительный экстракт» методом градиентной диффузии с использованием Е-тестов (Liofilchem, Италия) определяли минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотика на МХА и МХА с добавлением растительного экстракта в концентрации 1/8 от МПК.

Результаты и их обсуждение. Все включенные в исследование водные растительные экстракты в используемых концентрациях не оказывали значимого влияния на антимикробную активность аминогликозидов (амикацин, тобрамицин), карбапенемов (имипенем, меропенем) и фторхинолонов (ципрофлоксацин). Диаметры зон подавления роста вокруг дисков с указанными антибиотиками для всех штаммов *A.baumannii*, *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae* были сопоставимы (не отличались более чем на 2 мм) на контрольных и опытных чашках. Для тигециклина отмечен антагонистический эффект в сочетании с водными экстрактами эвкалипта, дуба и брусники (уменьшение зон подавления роста на 4-10 мм в присутствии водного экстракта в сравнении с контролем) для антибиотикорезистентных штаммов *K.pneumoniae*. Микробиологическая эффективность взаимодействия тигециклина и растительных экстрактов в отношении штаммов *P.aeruginosa* не оценивалась в связи с природной устойчивостью данного микроорганизма к антибиотику.

Все водные экстракты оказывали универсальный дозозависимый антагонистический эффект на микробиологическую эффективность колистина в отношении всех штаммов, что может быть связано не только с фармакодинамическими взаимодействиями, но и с ограничениями используемого метода исследования. Крупные размеры молекулы полимиксинов и большая молекулярная масса (969 для колистина) затрудняют диффузию антибиотика в геле. Воздействие дубильных компонентов в составе водных растительных экстрактов может оказывать модифицирующее воздействие на структуру агарозы и агаропектинов входящего в состав питательной среды агар-агара, и тем самым замедлить диффузию колистина в среду. В отношении штаммов *A.baumannii* БА-026 и *A.baumannii* БА-032 выявлен дозозависимый синергидный эффект комбинации цефтазидима и водных растительных экстрактов, наиболее выраженный для водного экстракта эвкалипта прутовидного. Результаты определения эффекта комбинированного воздействия водного экстракта эвкалипта в сочетании с колистином и цефтазидимом представлены в таблице 1.

Таблица 1. Эффекты совместного воздействия экстракта эвкалипта прутовидного и антибиотиков на микроорганизмы

	Колистин 10 мкг				Цефтазидим 30 мкг			
	диаметр зон подавления роста			эффект взаимодействия*	диаметр зон подавления роста			эффект взаимодействия*
	1:7	1:15	1:30		1:7	1:15	1:30	
<i>A.baumannii</i> БА-026	1	3	4	А	6	3	9	С
<i>A.baumannii</i> БА-032	1	2	3	Н	7	5	0	С

P.aeruginosa БП-056	6	6	3	1	A	3	2	2	2	2	H
P.aeruginosa БП-074	7	1	1	3	A	5	2	0	3	7	H
K.pneumoniae БА-024	0	1	1	3	A	6	6	6	6	6	H
K.pneumoniae БА-029	0	1	1	4	A	6	6	6	6	6	H
P.aeruginosa АТСС 27853	7	1	1	5	A	0	3	0	3	0	H
K.pneumoniae АТСС 700603	0	1	1	4	A	2	2	2	2	3	H

*Примечание: А – антагонизм, Н – нейтральный эффект, С – синергидный эффект.

Для более детальной оценки эффективности синергидного взаимодействия водного настоя эвкалипта и цефтазида из рабочей коллекции отобрано 24 штамма *A.baumannii*, устойчивых к большинству β -лактамных антибиотиков, включая карбапенемы. Все отобранные штаммы являлись продуцентами ОХА-карбапенемаз (таблица 2). Синергидный эффект был выявлен для 9 из 24 штаммов (37,5%).

Таблица 2. Эффекты совместного воздействия экстракта эвкалипта прутовидного и цефтазида на клинические изоляты *A.baumannii* с множественной антибиотикорезистентностью

п/п	№ ро-организм	Мик б. №	Ла	Кар ба-пене-маза	Ме-сто выде-ления штамма	Цефтазидим, диаметр зон подавления роста (мм)		Х арактер вз аимо-дей-ствия*
						э вка-липт, 1/8 МПК	ко нтроль	
1	A.bau mannii	БА -005	БА -40	ОХА	Ро-гачев	8	6	H
2	A.bau mannii	БА -006	БА -40	ОХА	Хой ники	2	22	H
3	A.bau mannii	БА -007	БА -40	ОХА	Го-мель	1	11	C
4	A.bau mannii	БА -011	БА -40	ОХА	Жло бин	6	6	H
5	A.bau mannii	БА -012	БА -40	ОХА	Жло бин	6	6	H
6	A.bau mannii	БА -026	БА -40	ОХА	Го-мель	1	6	C
7	A.bau mannii	БА -029	БА -40	ОХА	Го-мель	2	6	H
8	A.bau mannii	БА -032	БА -40	ОХА	Го-мель	6	7	C
9	A.bau mannii	А-010	А-40	ОХА	Мо-гилев	1	10	C
10	A.bau mannii	А-019	А-40	ОХА	Мо-гилев	4	6	H

1	1	A.bau mannii	034	A-	OXA -23 + OXA- 40	Мо- гилев	1 0	9	Н
2	1	A.bau mannii	036	A-	OXA -23 + OXA- 40	Мо- гилев	1 2	8	С
3	1	A.bau mannii	041	A-	OXA -23	Мо- гилев	1 5	12	С
4	1	A.bau mannii	042	A-	OXA -40	Мо- гилев	6	6	Н
5	1	A.bau mannii	047	A-	OXA -23	Мо- гилев	6	6	Н
6	1	A.bau mannii	049	A-	OXA -40	Мо- гилев	6	6	Н
7	1	A.bau mannii	050	A-	OXA -40	Мо- гилев	6	6	Н
8	1	A.bau mannii	053	A-	OXA -40	Го- мель	6	6	Н
9	1	A.bau mannii	054	A-	OXA -40	Го- мель	1 2	9	С
0	2	A.bau mannii	057	A-	OXA -40	Го- мель	6	6	Н
1	2	A.bau mannii	059	A-	OXA -40	Го- мель	1 3	8	С
2	2	A.bau mannii	065	A-	OXA -40	Мин ск	1 4	7	С
3	2	A.bau mannii	075	A-	OXA -40	Мин ск	6	6	Н
4	2	A.bau mannii	076	A-	OXA -40	Мин ск	6	6	Н

*Примечание: А – антагонизм, Н – нейтральный эффект, С – синергидный эффект

Выводы:

1. Водные растительные экстракты не оказывают значимого влияния на анти-микробную активность аминогликозидов, карбапенемов и фторхинолонов.

2. Выявлен антагонистический эффект водных растительных экстрактов на микробиологическую эффективность колистина в отношении *A.baumannii*, *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae*

3. Выявлен выраженный дозозависимый синергидный антибактериальный эффект комбинации водного экстракта из эвкалипта прутовидного и цефтазидима на штаммы *A.baumannii* с множественной устойчивостью к антибиотикам.

Tapalsky F.D.

SYNERGETIC ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COMBINATIONS OF ANTIBIOTICS WITH PLANT EXTRACTS

Tutors: Ph.D., Okulich V.K.,

Ph.D., Tapalsky D.V.

*Department of Clinical Microbiology
Vitebsk State Medical University, Vitebsk*

Литература

1. Vasoo, S. Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician / S. Vasoo [et al.] // *Mayo Clinic Proceedings*. – 2015. – Vol. 90. – P. 395-403.
2. Silva, N.C. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity / N.C. Silva, J.A. Fernandes // *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. – 2010. – Vol. 16 – P. 402–413.
3. Antimicrobial resistance and plant-derived antimicrobials as an alternative drug line to control infections / J. Srivastava [et al.] // *Biotech*. – 2014. – Vol. 4 – P. 451–460.
4. Тапальский, Д.В. Антибактериальная активность официальных лекарственных растений в отношении экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий / Д.В. Тапальский, Ф.Д. Тапальский // *Проблемы здоровья и экологии*. 2015. - № 4. - С. 69-74.