

**СИНЕРГИДНАЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ  
ЭКСТРАКТА ЛИШАЙНИКА *HYROGYMNA PHYSODES* И  
АНТИБИОТИКОВ НА ШТАММЫ ЭНТЕРОКОККОВ**

*Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. Д. В. Тапальский*

*Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии*

*Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель*

**Резюме:** Методом серийных разведений и модифицированным диско-диффузионным методом определена антибактериальная активность экстракта *H.physodes* в сочетании с антибиотиками. Выявлен универсальный синергидный эффект комбинации экстракта *H.physodes* и аминогликозидов как в отношении ванкомицин-чувствительных, так и ванкомицин-резистентных штаммов *Enterococcus faecalis*.

**Ключевые слова:** *Hyrogymnia physodes*, аминогликозиды, синергидный эффект.

**Resume:** The antibacterial activity of *H.physodes* extract in combination with antibiotics was determined by serial dilution methods and a modified disc-diffusion method. The universal synergistic effect of combination of *H.physodes* extract with aminoglycosides has been revealed for vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant strains of *Enterococcus faecalis*.

**Keywords:** *Hyrogymnia physodes*, aminoglycosides, synergistic effect.

**Актуальность.** Важной особенностью энтерококков является высокий уровень природной устойчивости к бета-лактамам антибиотикам и аминогликозидам. В последнее десятилетие в условиях госпитальной среды распространяются штаммы ванкомицин-резистентных энтерококков (VRE) с множественной устойчивостью к антибиотикам, способные вызывать тяжелые внутрибольничные инфекции, с трудом поддающиеся антибиотикотерапии [1]. Распространение множественной устойчивости к антибиотикам среди возбудителей бактериальных инфекций требует поиска соединений с новыми механизмами противомикробного действия. Лишайники и их многочисленные вторичные метаболиты рассматриваются в качестве перспективных источников таких соединений. Среди огромного видового разнообразия лишайников только относительно небольшое их количество (не более 70-100 видов) было скринировано на присутствие антимикробных свойств, при этом более чем у половины исследованных видов такие свойства удавалось выявить [2]. Эффективным способом преодоления антибиотикорезистентности является сочетанное использование антибактериальных веществ с различными механизмами действия на микробную клетку [3].

**Цель:** Изучение антибактериальных свойств экстракта из широко распространенного на территории Беларуси лишайника *Hypogymnia physodes* и его комбинаций с различными антибиотиками в отношении различных штаммов *Enterococcus faecalis*.

**Задачи:**

1. Определение антибактериальных свойств экстракта лишайника *H. physodes*.
2. Определение эффективности комбинаций экстракта *H. physodes* и антибактериальных веществ с различными механизмами действия на микробную клетку в отношении антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных штаммов энтерококков.

**Материал и методы.** Извлечение вторичных метаболитов из высушенных и измельченных слоевищ *H. physodes* выполнено ацетоном в аппарате Сокслета. После фильтрации растворитель испаряли при комнатной температуре, навески сухого экстракта растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Минимальные подавляющие концентрации (МПК) экстракта *H. physodes* в отношении эталонных штаммов энтерококков из Американской коллекции типовых культур (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299 - VRE), а также клинических изолятов, выделенных от госпитализированных пациентов (*E. faecalis* 1926 - VRE, *E. faecalis* 35736, *E. faecalis* 35758) определяли методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтона в диапазоне концентраций 4-512 мкг/мл в стерильных плоскодонных 96-луночных планшетах. Учет результатов (визуальная оценка видимого роста в ячейках планшета) проводили после 18-часовой инкубации при 35°C.

Для оценки эффективности комбинированного воздействия экстракта из *H. physodes* в сочетании с антибиотиками использовали модифицированный диско-диффузионный метод. В расплавленный и остуженный до 45°C агар Мюллера-Хинтона (МХА) вносили растворенный в ДМСО экстракт *H. physodes* для получения концентраций 1/2, 1/4 и 1/8 от МПК. После перемешивания среду в объеме 18-20 мл разливали в 90-мм чашки Петри, выдерживали до застывания среды, инокулировали суспензией (оптическая плотность 0,5 МакФарланд) из тестируемых штаммов и проводили аппликацию дисков с антибиотиками. Использовали диски с ампициллином, имипенемом, тигециклином, цiproфлоксацином, рифампицином, стрептомицином, гентамицином, амикацином. В качестве контроля использовали МХА без добавления экстракта. Учет результатов (измерение диаметров зон подавления роста) проводили после 18-часовой инкубации при 35°C.

Количественная оценка микробиологической эффективности комбинаций антибиотиков и экстракта из *H. physodes* выполнена методом «шахматной доски» [4] в диапазоне концентраций антибиотика и экстракта лишайника от 1/16\*МПК до 4\*МПК. В лунки стерильного плоскодонного 96-луночного планшета слева направо вносили разведения экстракта лишайника для создания двукратного серийного убывающего градиента концентрации в диапазоне от 0 до 64 мкг/мл, в лунках по направлению сверху вниз создавался двукратный серийный убывающий градиент концентрации в диапазоне от 0 до 32 мкг/мл для аминогликозидного антибиотика (гентамицин, амикацин). Заданные концентрации готовились в бульоне Мюллера-Хинтона и в объеме 100 мкл вносились в 64 ячейки (8x8) стерильного полистиролового 96-луночного планшета (общий объем среды в каждой ячейке – 200 мкл), после чего планшет

инокулировали суспензией исследуемой культуры (конечная концентрация микробных клеток  $\approx 5 \cdot 10^5$  клеток/мл) и инкубировали в течении 18 часов при 35°C в шейкере-инкубаторе с непрерывным низкоамплитудным встряхиванием. Учет результатов проводили по сравнению с контролем (рост в ячейке со средой, не содержащей антибиотиков). Рассчитывали фракционные подавляющие концентрации (ФПК) для каждого из препаратов в комбинации:

$$\text{ФПК}_A = \text{МПК}_{AB} / \text{МПК}_A$$

$$\text{ФПК}_B = \text{МПК}_{BA} / \text{МПК}_B$$

где  $\text{МПК}_{AB}$  - минимальная подавляющая концентрация препарата А в присутствии препарата В,  $\text{МПК}_A$  – минимальная подавляющая концентрация препарата А без добавления второго препарата.

Индекс ФПК рассчитывался как сумма ФПК каждого из препаратов в комбинации:

$$\Sigma\text{ФПК} = \text{ФПК}_A + \text{ФПК}_B$$

При  $\Sigma\text{ФПК} \leq 0,5$  эффект комбинации антибиотиков оценивался как синергидный, при  $0,5 < \Sigma\text{ФПК} \leq 1$  – как аддитивный, при  $1 < \Sigma\text{ФПК} \leq 4$  – как нейтральный.

**Результаты и их обсуждение.** Отмечена выраженная антибактериальная активность экстракта *H.physodes* в отношении всех включенных в исследование штаммов энтерококков (МПК 32-64 мкг/мл). Для ампициллина, имипенема, тигециклина, цiproфлоксацина, рифампицина диаметры зон подавления роста, определенные на МХА и МХА с добавлением экстракта лишайника не отличались между собой или отличались не более чем на 1 мм, что говорит о нейтральном сочетанном действии антибиотиков и экстракта *H.physodes*. Для всех аминогликозидных антибиотиков (стрептомицин, гентамицин, амикацин) выявлено отсутствие чувствительности к ним у энтерококков и восстановление чувствительности (синергидный эффект) в присутствии экстракта *H.physodes*. Выявленный синергидный эффект является универсальным (обнаружен для всех включенных в исследование аминогликозидов, в отношении как ванкомицин-чувствительных штаммов, так и множественно антибиотикорезистентных ванкомицин-резистентных штаммов) и дозозависимым по отношению к концентрации экстракта лишайника (таблица 1).

**Таблица 1.** Эффекты сочетанного действия аминогликозидов совместно с экстрактом *H.physodes*, диско-диффузионный метод

Микро- организм, штамм	Стрептомицин S25				Гентамицин GEN10				Амикацин AN30			
	концентрация экстракта <i>H.physodes</i> в МХА, мкг/мл											
	0	0	5	(К)	0	0	5	(К)	0	0	5	(К)
	диаметр зоны подавления роста вокруг диска с антибиотиком, мм											
<i>E. faecalis</i> TCC 29212	4	6	0	2	4	4	0	5	3	3	7	
<i>E. faecalis</i> TCC 51299	8	4			8	6			4	0		

E .faecalis	926	1	8	8	1	5	5	0	5	6	6	8	
E .faecalis	5736	0	8			4	4	0	5	4	2	6	
E .faecalis	5758	7	0	8	1	3	9	9		5		5	

Так, для штамма *E. faecalis* ATCC 29212 диаметры зон подавления роста вокруг диска с 30 мкг амикацина составили 6 мм (контроль), 17 мм (1/8 МПК *H. physodes*), 23 мм (1/4 МПК), 23 мм (1/2 МПК); для ванкомицинрезистентного штамма *E. faecalis* ATCC 51299 – соответственно 6 мм, 6 мм, 20 мм и 24 мм.

Методом «шахматной доски» определен характер фармакологических взаимодействий между экстрактом *H. physodes* и гентамицином в отношении эталонных и клинических штаммов *E. faecalis* (рисунок 1, таблица 2). Выявлен синергидный эффект комбинации для всех включенных в исследование штаммов энтерококков, включая штаммы с высоким уровнем резистентности к гликопептидам.

		Экстракт <i>H. physodes</i> (A), мкг/мл							
		0	1	2	4	8	16	32	64
Гентамицин (B), мкг/мл	32	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	+	-	-	-	-	-	-	-
	8	+	+	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-
	1	+	+	+	+	-	-	-	-
	0,5	+	+	+	+	+	-	-	-
	0	+	+	+	+	+	+	+	-

**Рисунок 1** – Результаты определения чувствительности к комбинации экстракта *H. physodes* и гентамицина для клинического изолята *E. faecalis* 35758, метод «шахматной доски»

«+» - наличие видимого роста в лунке, «-» - отсутствие роста;

МПК гентамицина 32 мкг/мл, МПК экстракта *H. physodes* 64 мкг/мл,

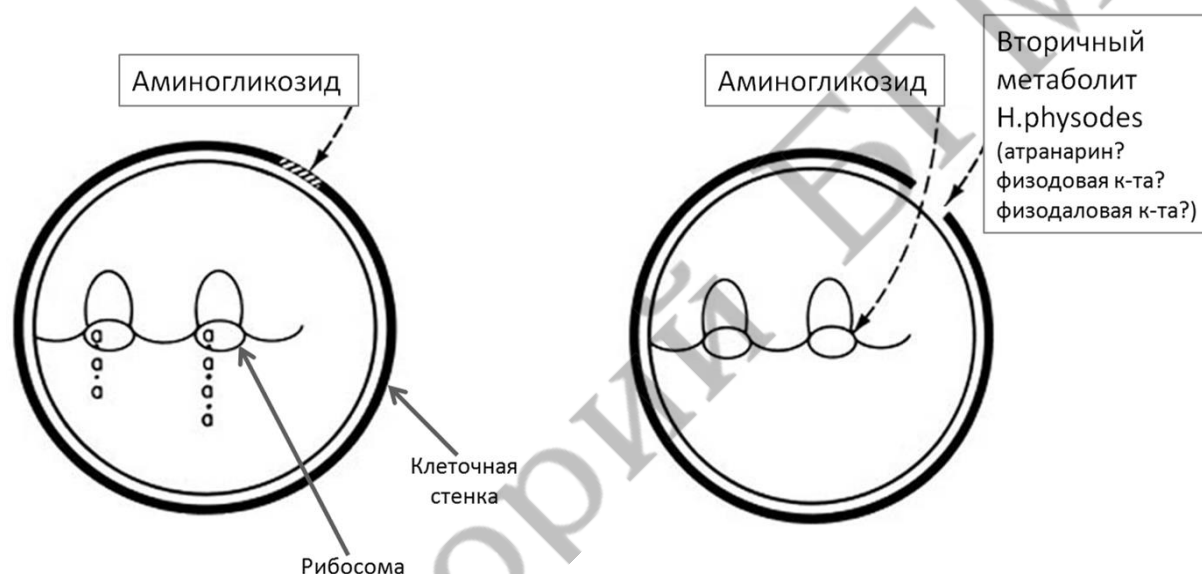
МПК гентамицина в присутствии экстракта *H. physodes* 4 мкг/мл, МПК экстракта *H. physodes* в присутствии гентамицина 8 мкг/мл;  $\Sigma$ ФПК = 0,25 (синергизм)

**Таблица 2.** Эффекты сочетанного действия гентамицина совместно с экстрактом *H. physodes* на эталонные и клинические штаммы энтерококков (метод «шахматной доски»)

Микроорганизм, штамм	Фено-тип	Индекс ФПК (комбинация экстракт <i>H. physodes</i> + гентамицин)	Эффект комбинации
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212 Van-S	0,125	синергизм

E.faecalis	ATCC 51299	Van-R	0,375	синергизм
E.faecalis	1926	Van-R	0,125	синергизм
E.faecalis	35736	Van-S	0,31	синергизм
E.faecalis	35758	Van-S	0,25	синергизм

Выявленный синергидный эффект комбинации экстракта *H.physodes* и аминогликозидных антибиотиков в отношении *E.faecalis* может быть связан с воздействием вторичных метаболитов лишайника на клеточную стенку бактерии, облегчающим пенетрацию аминогликозидов в цитоплазму микробной клетки и связывание с 30S-субъединицей бактериальной рибосомы (рисунок 2).



**Рисунок 2** – Предполагаемый механизм синергидного действия экстракта *H.physodes* и аминогликозидов и на штаммы энтерококков

#### **Выводы:**

1. Выявлен универсальный синергидный эффект комбинации экстракта *H.physodes* и аминогликозидов I-III поколений в отношении *E.faecalis*, включая ванкомицинрезистентные штаммы.

2. Требуется проведение дальнейших исследований для идентификации и выделения в чистом виде конкретного вторичного метаболита *H.physodes* с описанной антибактериальной активностью.

*K.M. Kosenkova*

### **SYNERGIDE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE LICHENE HYPOGYMNA PHYSODES EXTRACT AND ANTIBIOTICS ON ENTEROCOCCI STRAINS**

*Tutor: candidate of medical sciences, associate professor D.V. Tapalski  
Gomel State Medical University, Gomel*

## Литература

1. Isenman, H. Advances in prevention and treatment of vancomycin-resistant Enterococcus infection / H. Isenman, D. Fisher // *Current Opinion in Infectious Diseases*. — 2016. — Vol. 29, № 6. — P. 577–582.
2. Boustie, J. Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites / J. Boustie, M. Grube // *Plant Genetic Resources* — 2005. — Vol. 3. — P. 273–278.
3. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria / A.P. Zavascki [et al.] // *Expert Review of Anti-infective Therapy*. — 2013. — Vol. 11, № 12. — P. 1333–1353.
4. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and Etest / R.L. White [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1996. – Vol. 40. – P. 1914–1918.