

На правах рукописи

Xassan Fazilov

ХАССАН ГАМАЛ ОСМАН ОСМАН

**ПРИРОДНЫЕ БИОКОМПЛЕКСЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ
РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2019

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент
Карамова Назира Сунагатовна

Официальные оппоненты:

Черепнев Георгий Валентинович – доктор медицинских наук, доктор медицины ФРГ, доцент, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики Казанской государственной медицинской академии – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (г. Казань).

Чагарян Аида Нуримановна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Смоленск).

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (г. Казань).

Защита диссертации состоится «06» июня 2019 г. в 11 ч. на заседании диссертационного совета Д.212.081.36 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Карла Маркса, д.76, аудитория 208 (актовый зал).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Автореферат разослан «_____» 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

З. И. Абрамова

Актуальность проблемы и степень ее разработанности.

Внутрибольничные инфекции (ВБИ) представляют собой серьезную проблему во всем мире, являясь одной из важнейших причин заболеваемости, смертности населения и увеличения экономических затрат на лечение [Tandon, Garcia-Tsao, 2008; Khan *et al.*, 2017]. Установлено, что 7% госпитализированных пациентов в развитых странах и 10% в развивающихся странах подвергаются внутрибольничному инфицированию [Danasekaran *et al.*, 2014]. В целом, среди внутрибольничных инфекций превалируют инфекции мочевыводящих путей (до 40%), однако в развивающихся странах, например, в Бангладеш [Shahida *et al.*, 2016], Китае [Tao, *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2016], Египте [Gadallah *et al.*, 2017] наиболее распространенными являются инфекции дыхательных путей. Риск внутрибольничного инфицирования более, чем в 5 раз увеличивается в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [Cornejo-Juarez *et al.*, 2015].

Чрезмерное использование антибиотиков для терапии респираторных инфекций было признано одной из основных причин эволюции устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам и, как следствие, значительного увеличения доли резистентных штаммов микроорганизмов среди основных нозокомиальных возбудителей [Козлов с соавт., 2009; Сухорукова с соавт., 2017]. В Европе ежегодно 25 000 пациентов умирают от инфекций, вызванных мультирезистентными штаммами бактерий [Zaman *et al.*, 2017].

Знание видового состава возбудителей внутрибольничных инфекций, их распространенности и степени устойчивости к антимикробным препаратам – необходимое условие выбора адекватной стратегии для эффективной терапии. В то же время, масштабное развитие мультилекарственной резистентности у нозокомиальных микроорганизмов определяет необходимость поиска новых противомикробных препаратов.

Многообразие вторичных метаболитов растений, синтезируемых ими для защиты от биотических и абиотических негативных факторов окружающей среды, представляет собой перспективную базу для создания эффективных лекарственных препаратов [Aslam, Ahmad, 2016]. К настоящему времени из более чем 300 000 видов растений, произрастающих на нашей планете, всего лишь 10% исследованы на возможность использования в терапии различных заболеваний человека [Iqbal *et al.*, 2017]. Другим многообещающим источником биоактивных соединений, которые могут предоставить практические неограниченные возможности для разработки новых лекарственных средств, являются эндофитные микроорганизмы [Harboim, 2015; Golinska *et al.*, 2015].

Целью работы является оценка антимикробного потенциала комплекса вторичных метаболитов растения тимьяна головчатого (*Thymus capitatus* L.) и эндофитных актинобактерий тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) в отношении микроорганизмов, ассоциированных с внутрибольничными респираторными инфекциями.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы и решены следующие основные задачи:

1. Выделить и идентифицировать культивируемые микроорганизмы из клинического материала, полученного от пациентов с симптомами внутрибольничных респираторных инфекций.

2. Охарактеризовать антибиотикочувствительность выделенных нозокомиальных изолятов микроорганизмов.
3. Определить антимикробный потенциал комплекса вторичных метаболитов растения тимьяна головчатого (*Thymus capitatus* L.) с территории Египта в отношении нозокомиальных изолятов микроорганизмов.
4. Выделить, идентифицировать эндофитные актинобактерии из растения тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) и оценить их антимикробную активность в отношении нозокомиальных изолятов микроорганизмов.
5. Идентифицировать основные метаболиты природных комплексов тимьяна головчатого и эндофитных актинобактерий тысячелистника обыкновенного, вносящих основной вклад в антимикробную активность.

Научная новизна. Получены новые данные о структуре сообщества и таксономической принадлежности микроорганизмов дыхательного тракта пациентов с внутрибольничными респираторными инфекциями из двух клиник Египта. Выявлено, что бактерии с грамотрицательным морфотипом, количественно доминирующие в сообществе культивируемых микроорганизмов, характеризуются полирезистентностью к рекомендованным антибиотикам.

Впервые показана противомикробная активность комплекса вторичных метаболитов растения тимьян головчатый (*Thymus capitatus* L.), произрастающего на территории средиземноморского побережья Египта, экстрагированных по разработанной схеме, в отношении антибиотикорезистентных изолятов микроорганизмов, выделенных из клинического материала дыхательных путей пациентов с внутрибольничными респираторными инфекциями. Установлено, что подавление роста антибиотикорезистентных нозокомиальных изолятов микроорганизмов в основном обусловлено присутствием монотерпеновых фенолов, тритерпеноидов, жирных кислот.

Охарактеризован антиоксидантный потенциал и установлен цитотоксический эффект комплекса метаболитов гексановой фракции тимьяна головчатого с территории Египта в отношении клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549 и сравнительно низкая токсичность в отношении клеточной линии легкого эмбриона человека WI-38VA-13 subline 2RA.

Впервые из растения тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) с территории Республики Татарстан, Россия, выделено 11 изолятов эндофитных актинобактерий. Впервые показан антимикробный эффект комплекса эндо- и экзометаболитов штамма эндофитных актинобактерий *Streptomyces zaomyceticus* GI01, выделенных по разработанной схеме экстракции, по отношению к нозокомиальным изолятам микроорганизмов.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы. Полученные в настоящем исследовании научные данные позволяют расширить представление о составе сообщества культивируемых микроорганизмов дыхательного тракта и их роли в развитии внутрибольничных инфекций у пациентов, находящихся на лечении в стационарах медицинских учреждений. Результаты, характеризующие спектр антибиотикочувствительности нозокомиальных изолятов микроорганизмов, могут быть использованы при разработке новых стратегий антибиотикотерапии внутрибольничных

респираторных инфекций в лечебных учреждениях Египта. Выделение и характеристика эндофитных актинобактерий из растения тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) с территории Республики Татарстан, Россия, вносит вклад в понимание растительно-микробных взаимоотношений и биологической активности вторичных метаболитов эндофитных микроорганизмов. Важное практическое значение имеют новые данные о способности экстрактов и фракций растения тимьяна головчатого (*Thymus capitatus* L.) с территории Египта и штамма эндофитных актинобактерий *Streptomyces zaotuseticus* GI01 ингибировать рост антибиотикорезистентных нозокомиальных изолятов микроорганизмов, которые могут быть использованы при разработке новых антимикробных препаратов для терапии внутрибольничных респираторных инфекций.

Результаты и методы исследования могут быть использованы в образовательном процессе в рамках дисциплин «Микробиология», «Медицинская микробиология», «Антибиотики» ИФМиБ КФУ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выделены и определены микроорганизмы, связанные с развитием внутрибольничных респираторных инфекций у пациентов двух клиник Египта, с количественным доминированием *Klebsiella pneumoniae* (22%), *Candida tropicalis* (21%), *Staphylococcus epidermidis* (17%); установлен спектр антибиотикочувствительности нозокомиальных изолятов микроорганизмов, среди которых *Acinetobacter baumannii* обладал выраженной мультирезистентностью.
2. Впервые охарактеризована противомикробная активность органических экстрактов растения тимьян головчатый (*Thymus capitatus* L.), произрастающего на средиземноморском побережье Египта, и штамма эндофитных актинобактерий *Streptomyces zaotuseticus* GI01 растения тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) по отношению к изолятам микроорганизмов, выделенных из клинического материала дыхательных путей пациентов с внутрибольничными респираторными инфекциями.
3. Установлена природа основных антимикробных компонентов органических экстрактов растения тимьян головчатый с территории Египта и эндофитной актинобактерии *Streptomyces zaotuseticus* GI01, относящихся к классам монотерпеновых фенолов, тритерпеноидов и жирных кислот для растения и к пептидным соединениям у актинобактерии.

Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается значительным объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и проанализированных с использованием современных высокоточных приборов, а также публикацией полученных результатов работы в международных и отечественных журналах, рецензируемых ведущими учеными в данной области. Все результаты исследований обработаны стандартными математическими методами с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на II Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2016), Международной конференции «Трансляционная медицина – Казань» (Казань, 2016),

Международной конференции «IV International Conference Microbial Diversity: resource potential» (Moscow, 2016), 70-й Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2017), X Всероссийской научной конференции и школе молодых ученых «Химия и технология растительных веществ», (Казань, 2017), Третьей Всероссийской молодёжной научной школе-конференции с международным участием "Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах" (Оренбург, 2017), X Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия-2017» (Казань, 2017), "X Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 2018), XXV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2018), 71-й Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2018), 22-й Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушкино, 2018), Международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Уфа, 2018), VI Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием «Микробиология в современной медицине» (Казань, 2018), III Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2018).

Место выполнения работы и личный вклад соискателя. Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета и представляет собой результаты экспериментальных исследований с 2015 по 2019 г.г. Автором совместно с научным руководителем сформулированы цели и задачи исследования. Автор самостоятельно проводил эксперименты, разрабатывал часть методик, работал с литературой и совместно с научным руководителем обсуждал полученные результаты. Часть исследований по оценке антибиотикочувствительности нозокомиальных изолятов микроорганизмов проведена в сотрудничестве с группой медицинских микробиологов Института Микробиологии Гиссенского Университета, Германия. Идентификация микроорганизмов осуществлена с использованием оборудования междисциплинарного Центра геномных и протеомных исследований НОЦ Казанского (Приволжского) федерального университета. Сканирующая электронная микроскопия эндофитных актинобактерий проводилась в междисциплинарном Центре Аналитической микроскопии Казанского (Приволжского) федерального университета. На базе Казанского национального научно-исследовательского технологического университета на кафедре пищевой биотехнологий проведена идентификация метаболитов растений и микроорганизмов.

Связь работы с научными программами. Научная работа по теме диссертации выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и в соответствии с совместной программой сотрудничества между Арабской Республикой Египет и Российской Федерацией по категории очной

государственной линии, поддержана исследовательским грантом РФФИ № 15-54-61024 (2015-2016 г.г.) и грантом на стажировку в Университет им. Юстуса Либига г. Гиссена, Германия, в рамках программы партнерства между университетами КФУ-ЮЛУ (2017 г.).

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 19 научных работ, среди которых 4 статьи в рецензируемых журналах, включенных в список ВАК. Две из 4-х статей опубликованы в журналах, входящих в международные базы данных SCOPUS и WOS; 15 работ представляют собой тезисы докладов на международных и всероссийских конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 173 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения с выводами, списка цитированной литературы, приложения. Работа включает 31 таблицу и 21 рисунок, список цитированной литературы содержит 296 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Для выделения изолятов микроорганизмов был использован клинический материал (мокрота, пробы со слизистых полости носа, пробы со слизистой зева, эндотрахеальный аспират), полученный из респираторного тракта 65 пациентов (43 мужчин в возрасте от 20 до 90 лет и 22 женщин в возрасте от 25 до 95 лет) с диагнозом внутрибольничных респираторных инфекций ОРИТ Университетской клиники Нового Каира, Аль-Айни и клиники Аль-Рахма, Маср Эль-Гедида (Египет) в 2014 г. с разрешения пациентов. Объектом исследования служили нозокомиальные изоляты микроорганизмов.

В работе использован растительный материал лекарственных растений:

1) Тимьян головчатый *Thymus capitatus* L. Hoffmanns & Link, семейство *Lamiaceae* или *Labiatae*. Идентификация растения проведена доктором Омраном Гали (Dr. Omran Ghaly), руководителем отдела таксономии растений Центра исследований пустынь (г. Каир, Египет). Надземные части растения были собраны на средиземноморском побережье Египта (г. Мерса-Матрух) в апреле – мае 2014 года.

2) Тысячелистник обыкновенный *Achillea millefolium* L., семейство *Asteraceae* или *Compositae*. Идентификация растения проведена к.б.н, доцентом кафедры ботаники и физиологии растений ИФМиБ Казанского (Приволжского университета) Прохоренко Н.Б. Растительный материал был собран в пригороде г. Казани, Республика Татарстан, в июле 2016 г.

Микробиологические методы анализа. Посев клинического материала проводился на стандартизованные питательные среды (кровяной агар, среда Эндо, бессолевая лактозная питательная среда с цистином (CLED), шоколадный агар, агар Мак-Конки, среда Сабуро) для получения изолированных колоний микроорганизмов. Через 18-24 ч. проводили морфологическую характеристику колоний и клеток микроорганизмов с окрашиванием по Граму. При выделении эндофитных актинобактерий промытые водопроводной водой кусочки листьев, корней и стеблей растений последовательно обрабатывали 0.1% раствором Tween, 70% раствором этанола, 5% раствором гипохлорита натрия, промывали стерильной дистиллированной водой [Passari *et al.*, 2015] и

раскладывали на среду Гаузе, содержащую нистатин (30 мкг/мл) и бихромат калия (30 мкг/мл), в чашках Петри. Чашки инкубировали в течение 7-28 дней при 28⁰С. Колонии микроорганизмов многократно пересевали на среду Гаузе до получения чистых культур. Для исследования антимикробной активности метаболитов культивирование актинобактерий производилось в течение 7 сут. при температуре 28±1⁰С на качалке (200 об/мин). Метод сканирующей электронной микроскопии был использован для исследования морфологии мицелия и спор изолята актинобактерий на сканирующем электронном микроскопе Carl Zeiss Merlin (Германия), Междисциплинарный центр «Аналитическая микроскопия» ФГАО ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Молекулярно-генетические методы. Идентификацию нозокомиальных изолятов микроорганизмов проводили методом масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF MS), Bruker Biotype (Bruker Daltonik, Германия) и по биохимическому профилю на анализаторе VITEK 2 system (BioMérieux, Франция) (version 07.01). Для анализа таксономической принадлежности изолята актинобактерий по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК использованы методы секвенирования после выделения геномной ДНК и амплификации гена 16S рРНК изолята эндофитной актинобактерии методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Секвенирование ПЦР-продукта проводилось в Междисциплинарном центре коллективного пользования ФГАО ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК проводили с использованием алгоритма BLAST - пакета программ, представленного на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК была выровнена с помощью программы MUSCLE, филогенетическое дерево построено с использованием пакета MEGA 7 [Kumar *et al.*, 2016]. Нуклеотидная последовательность депонирована в базе данных NCBI и доступна под регистрационным номером MK290373.

Физиолого-биохимические методы. У нозокомиальных изолятов микроорганизмов и изолятов актинобактерий исследованы биохимические свойства [Cheesbrough, 2005; Li *et al.*, 2016]. Чувствительность нозокомиальных изолятов микроорганизмов к антимикробным препаратам оценивали с использованием диско-диффузионного метода (ДДМ). Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотиков (мкг/мл) проведена с использованием анализатора VITEK 2 system (BioMérieux, Франция) (version 07.01). Интерпретацию результатов ДДМ и определения МПК антибиотиков проводили в соответствии с рекомендациями EUCAST и CLSI [EUCAST, 2014; CLSI, 2013]. Способность нозокомиальных изолятов бактерий к синтезу β-лактамаз и карбапенемаз оценивали фентоипическими методами «двойных дисков» [МУК 4.2. 1890 - 04] и инактивации карбапенема [van der Zwaluw *et al.*, 2015].

Экстрагирование метаболитов *Thymus capitatus* L. и штамма эндофитных актинобактерий *Streptomyces zaotyseticus* GI01 проводили с использованием метода жидкость–жидкостной экстракции. Из растительного материала был приготовлен этанольный экстракт, далее проводили последовательное разделение экстракта на отдельные фракции, содержащие различные группы веществ. Для этого были использованы органические растворители с различной полярностью: вода, гексан,

хлороформ, этилацетат и этанол (96%). Выделение экзометаболитов штамма *Streptomyces zaomyceticus* GI01 проводили экстракцией культуральной жидкости этилацетатом и бутанолом, эндометаболиты экстрагировали из гомогената клеток ацетоном.

Анти микробный эффект комплекса вторичных метаболитов растения *Thymus capitatus* L. и штамма эндофитных актинобактерий *Streptomyces zaomyceticus* GI01 исследовали с использованием ДДМ, метода серийных разведений, метода агаровых блоков и биоавтографического анализа [МУК 4.2. 1890 – 04; Nedialkova, Naidenova, 2005; Dewanjee *et al.*, 2014].

Для оценки антиоксидантной активности гексановой фракции *Thymus capitatus* L. использованы методы биоавтографии, ингибиования свободного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ) и фосфомолибденовый метод [Mensor *et al.*, 2001; Dewanjee *et al.*, 2014]. Цитотоксичность гексановой фракции *Thymus capitatus* L. в отношении клеток аденокарциномы легкого человека A549 (ATCC, Роквилл, Мэриленд, США) и клеток легкого эмбриона человека WI-38 VA 13 subline 2RA (Коллекция культур клеток позвоночных, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия) оценивали в МТТ-тесте [Mosmann, 1983]. Определение общего содержания фенольных соединений и суммы флавоноидов в гексановой фракции *Thymus capitatus* L. проводили с использованием спектрофотометрических методов Фолина-Чокальтеу и комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия, соответственно [Ainsworth, Gillespie, 2007; Lin and Tang, 2007]. Количественное содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов определяли в пересчете на галловую кислоту и кверцетин по калибровочным графикам зависимости оптической плотности растворов данных веществ от их концентрации при $\lambda=735$ нм и $\lambda=430$ нм, соответственно. Данные представлены как мг эквивалента галловой кислоты (GA) или кверцетина в мг (QE) на 1 г гексановой фракции.

Химические методы анализа. Метод высокоеффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) был использован для анализа состава веществ в экстрактах *Thymus capitatus* L. и штамма эндофитных актинобактерий *Streptomyces zaomyceticus* GI01 (лабораторный комплекс CAMAG, Швейцария). Нанесение образцов на хроматограмму осуществляли автоматически при помощи прибора «Linomat 5», хроматографирование проводили в приборе «ADC2». Денситометрическая обработка полученных хроматограмм проведена на приборе TLC Scanner с программным обеспечением «winCATS» в режиме адсорбции. Для идентификации веществ в гексановой фракции *Thymus capitatus* L. были использованы стандарты веществ – тимол (Fisher Chemical), β -ситостерол (Acros Organics) циклоартенол (Sigma – Aldrich), олеиновая кислота (Acros Organics). Отнесение осуществляли при сопоставлении Rf пика стандартов и Rf пиков в гексановой фракции. Определение количественного содержания метаболитов в гексановой фракции осуществляли с использованием калибровочных графиков и уравнений зависимости площадей пиков от концентрации стандартных веществ.

Статистический анализ результатов исследований проводили с использованием стандартных математических методов в программе Microsoft Excel (Office 365).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выделение и идентификация микроорганизмов из клинического материала дыхательных путей пациентов с внутрибольничными респираторными инфекциями

Из образцов клинического материала, полученного из дыхательного тракта 65 пациентов с симптомами внутрибольничных респираторных инфекций (ВБРИ) в ОРИТ Университетской клиники Нового Каира, Аль-Айни и клиники Аль-Рахма, Макр Эль-Гедида (Египет), было выделено 90 изолятов микроорганизмов, из которых 43 изолятов (47.78%) являются бактериями с грамотрицательным морфотипом, 28 изолятов (31.11%) – бактериями с грамположительным морфотипом и 19 изолятов (21.11%) – дрожжеподобными грибами. Идентификация выделенных изолятов микроорганизмов методом масс-спектрометрического анализа (Biotype, Bruker Daltonik, Германия) и по биохимическому профилю на анализаторе VITEK 2 system (BioMérieux, Франция) среди бактерий с грамотрицательным морфотипом позволило установить присутствие *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. Бактерии с грамположительным морфотипом представлены *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium striatum*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* и *Enterococcus faecalis*. Кроме того, в образцах клинического материала присутствовали дрожжеподобные грибы *Candida tropicalis*. Количественный анализ структуры сообщества культивируемых микроорганизмов из исследованных образцов клинического материала показал, что доминирующими видами являются *Klebsiella pneumoniae* (22%), *Candida tropicalis* (21%) и *Staphylococcus epidermidis* (17%) (Рисунок 1).

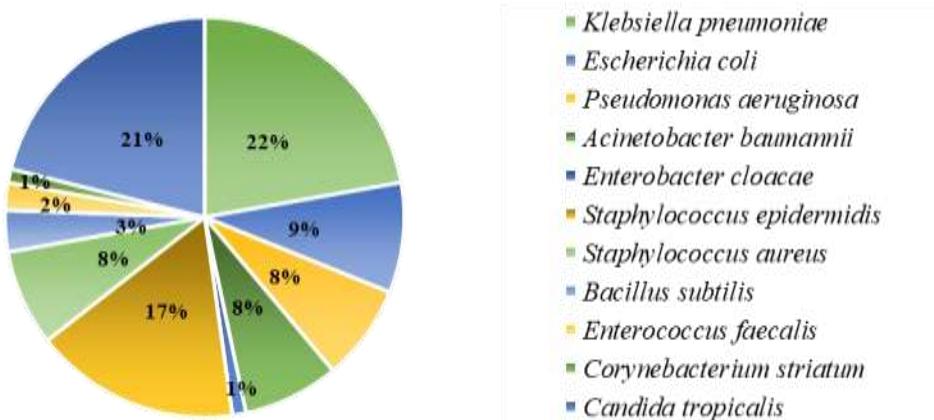


Рисунок 1 – Структура сообщества культивируемых микроорганизмов в образцах клинического материала пациентов с симптомами внутрибольничных респираторных инфекций.

Несмотря на то, что в последние десятилетия отмечается возросшая роль грамположительных бактерий и *Candida* spp., как возбудителей ВБРИ [Cornejo-Juarez *et al.*, 2015; Paul *et al.*, 2016; Terraneo *et al.*, 2016], грамотрицательные бактерии также не теряют своего значения, а в некоторых клиниках все еще являются ведущими факторами риска развития ВБРИ [Lastours *et al.*, 2015]. Полученные нами данные подтверждают этот факт. В работе [Tayel *et al.*, 2017] показано, что *K. pneumoniae* вместе с *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp. и *Acinetobacter* spp. являются основными патогенными

агентами, вызывающими около 60% случаев вентилятор-ассоциированной пневмонии в ОРИТ детской клиники Александрийского университета, Египет.

1.1 Характеристика чувствительности нозокомиальных изолятов микроорганизмов к антимикробным препаратам

Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотиков в отношении тестируемых микроорганизмов позволило установить, что изоляты *E. coli* и *K. pneumoniae* проявляют чувствительность только к 5 из 17 тестированных антимикробных препаратов: к антибиотику широкого спектра действия фосфомицину, карбапенемам, нитрофурантоину и тигециклину. Изолят *P. aeruginosa* был чувствителен к гентамицину, комбинированному препарату пиперациллин/тазобактам, цефтазидиму и карбапенемам, но проявлял устойчивость к фторхинолонам, нитрофурантоину и комбинированному препарату триметоприм/сульфометаксозол. Изолят *E. cloacae* показал чувствительность к большинству исследованных антибиотиков, проявляя резистентность к аминопенициллином, цефалоспоринам II и III поколений (Таблица 1).

Таблица 1 – МПК антибиотиков в отношении изолятов грамотрицательных бактерий.

Антибиотик	МПК, мкг/мл				
	<i>E. coli</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Ампициллин	≥ 32(R)		≥ 32 (R*)		≥ 32 (R)
Ампициллин/ Сульбактам	≥ 32(R)	≥ 32 (R)	4 (R)		≥ 32 (R)
Фосфомицин	≤ 16(S*)		≤ 16 (S)		≤ 16 (S)
Гентамицин	≥ 16(R)	≥ 16 (R)	≤ 1 (S)	4 (S)	≥ 16 (R)
Триметоприм/ Сульфометаксозол	≥ 320 (R)	≥ 320 (R)	≤ 20 (S)	80 (R)	≥ 320 (R)
Цефподоксим	≥ 8 (R)		2 (R)		≥ 8 (R)
Цефуроксим	≥ 64 (R)		8 (I)		≥ 64 (R)
Цефуроксим-аксетил	≥ 64 (R)		8 (R)		≥ 64 (R)
Левофлоксацин	≥ 8 (R)	≥ 8 (R)	≤ 0.12 (S)	4(R)	≥ 8 (R)
Ципрофлоксацин	≥ 4 (R)	≥ 4 (R)	≤ 0.25 (S)	1 (R)	≥ 4 (R)
Пиперациллин/ Тазобактам	8 (I)	≥ 128 (R)	≤ 4 (S)	≤ 4 (S)	16 (I)
Цефотаксим	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	≤ 1 (S)	8 (R)	≥ 64 (R)
Цефтазидим	16 (R)	≥ 64 (R)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	16 (R)
Имипенем	≤ 0.25 (S)	≥ 16 (R)	0.5 (S)	2 (S)	≤ 0.25 (S)
Меропенем	≤ 0.25 (S)	≥ 16 (R)	≤ 0.25 (S)	0.5 (S)	≤ 0.25 (S)
Нитрофурантоин	≤ 16 (S)	≥ 512 (R)	32 (S)	≥ 512 (R)	32 (S)
Тигециклин	≤ 0.5 (S)	1 (I)	2 (I)		≤ 0.5 (S)

S – чувствительные бактерии; I – умеренно чувствительные бактерии; R – резистентные бактерии.

Следует подчеркнуть, что изоляты *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae* продемонстрировали полирезистентность к антимикробным препаратам: аминопенициллином (в том числе и ингибиторзацищеному), цефалоспоринам, фторхинолонам, гентамицину и комбинированному препарату триметоприм/сульфометаксозол. *A. baumannii*, в отличие от *E. coli* и *K. pneumoniae*, был также устойчив к карбапенемам и проявлял умеренную чувствительность только к тигециклину (Таблица 1). Более того, все три изолята продемонстрировали способность к синтезу β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Из результатов, представленных в

таблице 2 видно, что *E. faecalis* чувствителен к действию большинства протестированных антибиотиков, проявляя устойчивость в отношении эритромицина и тетрациклина. *S. aureus* чувствителен к действию 14 из 17 исследованных препаратов, в том числе и к оксациллину. У этого изолята наблюдалась устойчивость к гентамицину, бензилпенициллину и тетрациклину. Абсолютную чувствительность к действию всех тестированных препаратов проявил изолят *S. epidermidis* (Таблица 2). Изолят *Candida tropicalis* продемонстрировал чувствительность ко всем 6 тестированным противогрибковым антибиотикам с разным механизмом действия – МПК ни для одногчувствительность к данным антибиотикам (Таблица 3).

Таблица 2 – МПК антибиотиков в отношении изолятов грамположительных бактерий.

Антибиотик	МПК, мкг/мл		
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Бензилпенициллин		≥ 0.5 (R*)	
Оксациллин		0.25 (S*)	≤ 0.25 (S)
Эритромицин	≥ 8 (R)	1 (S)	0.5 (S)
Клиндамицин		0.25 (S)	≤ 0.12 (S)
Рифампицин		≤ 0.03 (S)	≤ 0.03 (S)
Ванкомицин	1 (S)	1 (S)	2 (S)
Ампициллин	≤ 2 (S)		
Фосфомицин		≤ 8 (S)	≤ 8 (S)
Тетрациклин	≥ 16 (R)	≥ 16 (R)	≤ 1 (S)
Гентамицин		≥ 16 (R)	≤ 0,5 (S)
Триметоприм/ Сульфометаксозол	≤ 10 (I)	≤ 10 (S)	≤ 10 (S)
Левофлоксацин		≤ 0.12 (S)	≤ 0.12 (S)
Ципрофлоксацин	1 (S)		
Имипенем	≤ 1 (S)		
Тигециклин	≤ 0.12 (S)	≤ 0.12 (S)	≤ 0.12 (S)
Тейкопланин		≤ 0.5 (S)	
Муцироцин		≤ 2 (S)	
Линезолид	2 (S)	2 (S)	1 (S)
Фузидиевая кислота		8 (S)	≤ 0.5 (S)
Даптомицин	4 (S)	0.25 (S)	0.5 (S)

S – чувствительные бактерии; I – умеренно чувствительные бактерии; R – резистентные бактерии.

Таблица 3 – МПК антибиотиков в отношении *Candida tropicalis*.

Антибиотики	МПК, мг/мл
Флуцитозин	≤ 1 (S*)
Амфотерицин В	≤ 0.25 (S)
Флуконазол	≤ 1 (S)
Вориконазол	≤ 0.12 (S)
Каспофунгин	≤ 0.25 (S)
Микафунгин	≤ 0.06 (S)

S – чувствительные микроорганизмы.

Итак, среди выделенных нами нозокомиальных изолятов микроорганизмов бактерии с грамотрицательным морфотипом доминировали не только количественно, но и по степени устойчивости к антимикробным препаратам. Результаты исследований, проведенных в разных регионах России, а также в других странах, свидетельствуют о том,

что среди бактериальных возбудителей ВБИ преобладают *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и большинство изолятов обладают фенотипом множественной резистентности к антибиотикам [European Centre for Disease Prevention and Control, 2016; Сухорукова с соавт., 2017; Almaghrabi *et al.*, 2018]. В настоящее время уже обнаружены штаммы *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, производящие KPC-3 карбапенемазы, устойчивые к тигециклину и колистину [Caneiras *et al.*, 2018].

Таким образом, в условиях возрастающих темпов антибиотикорезистентности нозокомиальных микроорганизмов исследование антимикробного потенциала широкого спектра вторичных метаболитов растений, является одним из перспективных направлений поиска новых противомикробных препаратов.

2. Анализ антимикробной активности этанольного экстракта и отдельных фракций *Thymus capitatus* L.

Предварительный скрининг антимикробного потенциала этанольного экстракта *Thymus capitatus* L. в отношении 9 изолятов микроорганизмов, ассоциированных с внутрибольничными респираторными инфекциями, показал, что экстракт ингибируют рост большинства изолятов. Для 5 видов микроорганизмов: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. cloacae* минимальная ингибирующая концентрация составила 0.078 мг/диск. Заметное ингибирование роста дрожжеподобных грибов *C. tropicalis* наблюдалось при действии экстракта в концентрации 1.25 мг/диск. Далее, при последовательном разделении этанольного экстракта с использованием органических растворителей с различной полярностью (вода, гексан, хлороформ, этилацетат и 96% этанол) были получены отдельные фракции, содержащие различные группы веществ. Оценка антимикробного действия отдельных фракций позволила установить, что наиболее активными являются гексановая и хлороформная фракции (Рисунки 2, 3). Наиболее заметный эффект обнаружен в отношении изолятов *S. aureus* и *C. tropicalis*: диаметры зон ингибирования роста изолятов при наивысшей концентрации гексановой фракции (1 мг/мл) составили 25.8 мм и 25.0 мм, соответственно. Следует отметить, что к действию гексановой фракции были чувствительны и грамотрицательные бактерии *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* проявившие повышенную резистентность к исследованным антибиотикам (Рисунок 2). Хлороформная фракция, в отличие от гексановой, заметнее подавляла рост изолятов *E. faecalis*, однако изоляты *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* были нечувствительны к действию данной фракции (Рисунок 3). Водная и этилацетатная фракции этанольного экстракта тимьяна головчатого демонстрировали меньшую активность по сравнению с гексановой и хлороформной. Таким образом, вышесказанное свидетельствует о том, что активные вещества, обуславливающие антимикробный эффект *Thymus capitatus* L., большей частью содержатся в гексановой фракции.

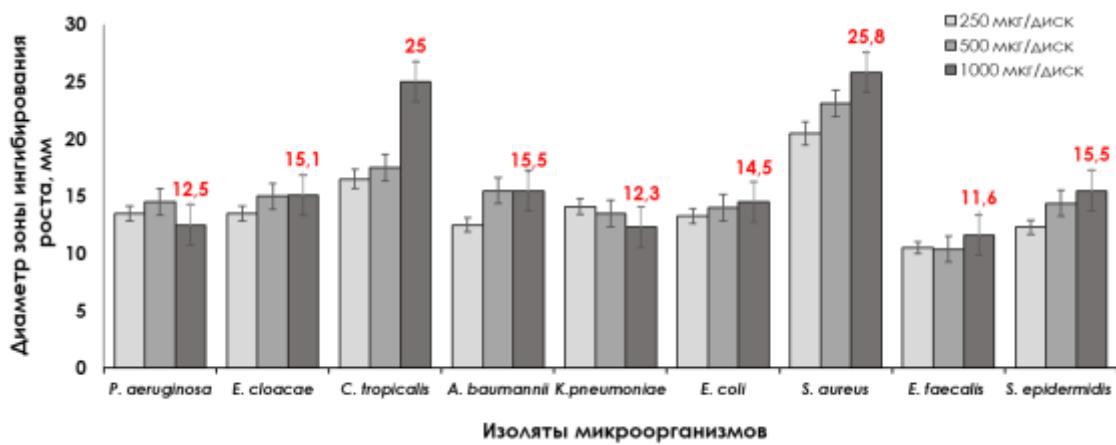


Рисунок 2 – Антимикробная активность гексановой фракции этанольного экстракта *Thymus capitatus* L.

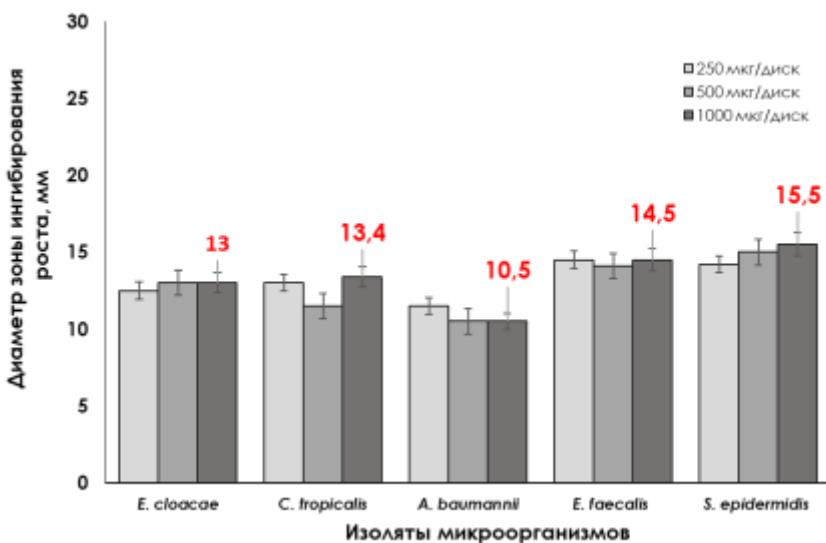
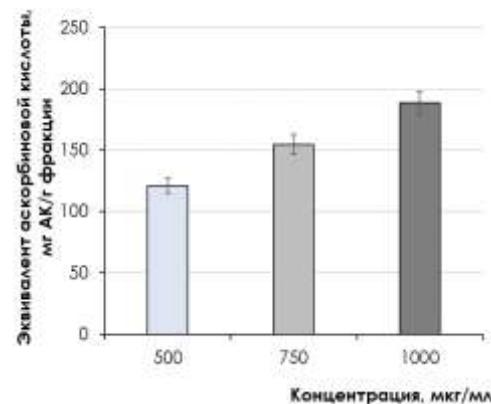
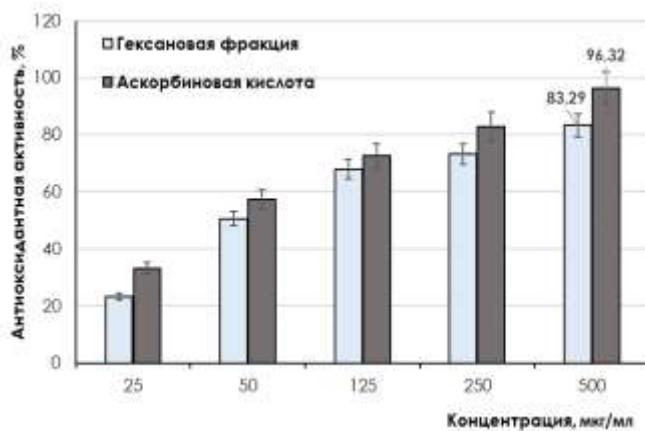


Рисунок 3 – Антимикробная активность хлороформной фракции этанольного экстракта *Thymus capitatus* L.

2.1 Антиоксидантный потенциал гексановой фракции *Thymus capitatus* L.

Из результатов, представленных на рисунке 4 видно, что гексановая фракция обладает дозозависимой антирадикальной активностью и в наивысшей из исследованных концентраций активность достигает 83.29%. IC₅₀ для гексановой фракции равняется 91.74 мкг/мл. В качестве стандартного вещества с известной антиоксидантной активностью мы использовали аскорбиновую кислоту (АК). В наших экспериментах значение IC₅₀ для АК составило 22.15 мкг/мл. Согласно данным, полученным с использованием фосфомolibденового метода, основанном на восстановлении Mo (IV) до Mo (V), в среднем общая антиоксидантная активность гексановой фракции по эквиваленту аскорбиновой кислоты равнялась 154.68 мг АК/г фракции, что свидетельствует о существенной восстановительной активности исследуемой фракции (Рисунок 5).



2.2 Оценка цитотоксичности гексановой фракции *Thymus capitatus* L.

Установлено, что гексановая фракция *Thymus capitatus* L. обладает выраженным дозо-зависимым цитотоксическим эффектом в отношении клеточной линии adenокарциномы легкого человека A549. Процент живых клеток в популяции при действии гексановой фракции в наивысшей в концентрации (2.5 мг/мл) составляет всего 6.5 %. В то же время, в исследованном диапазоне концентраций гексановая фракция вызывала гораздо меньшее угнетение жизнеспособности нормальных клеток легкого эмбриона человека WI-38VA-13 subline 2RA (Рисунок 6).

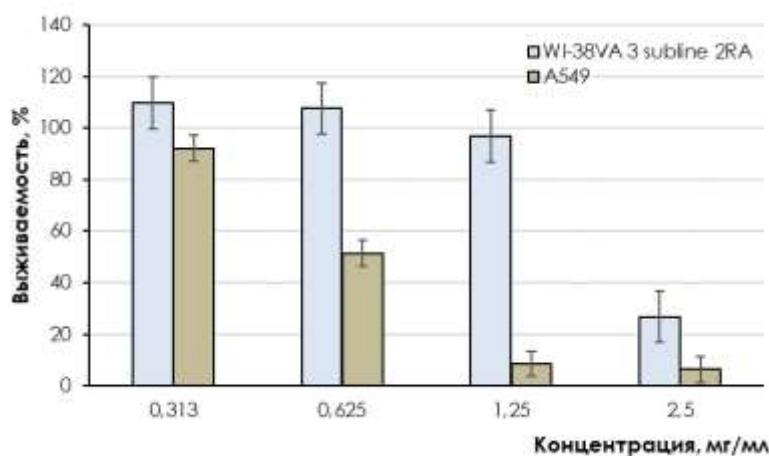


Рисунок 6 – Цитотоксичность гексановой фракции *Thymus capitatus* L. в отношении клеток adenокарциномы легкого человека A549 и клеток легкого эмбриона человека WI-38VA 3 subline 2RA.

2.3 Идентификация биологически активных вторичных метаболитов *Thymus capitatus* L.

2.3.1 Биоавтография гексановой фракции

На первом этапе скрининга antimикроных метаболитов, содержащихся в гексановой фракции *Thymus capitatus* L., нами был использован метод биоавтографии.

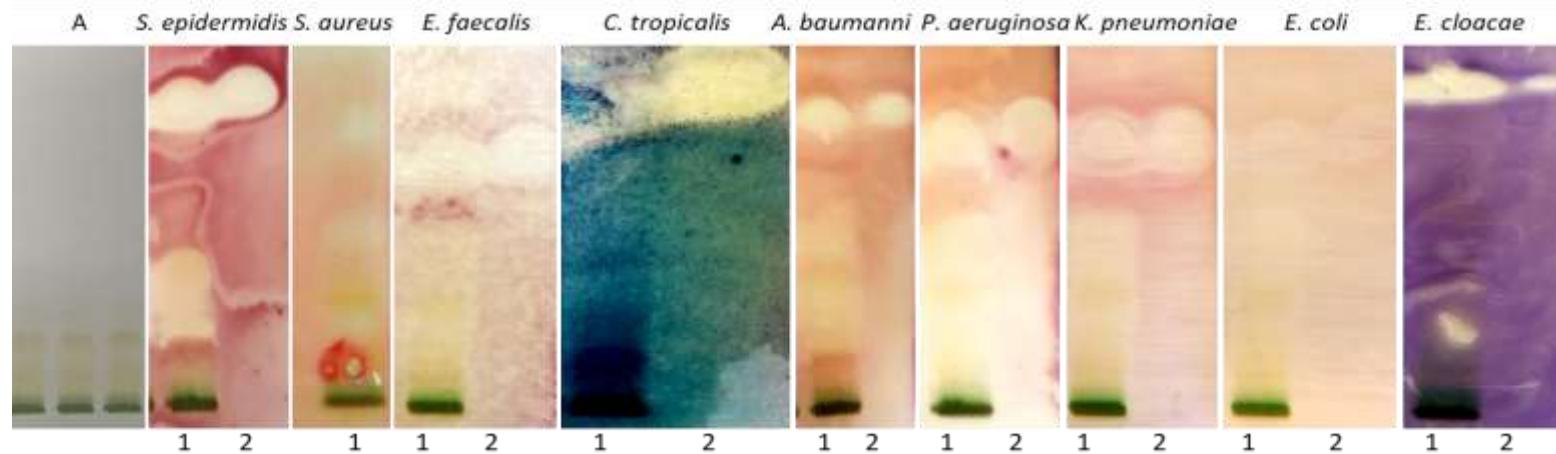


Рисунок 7 – Биоавтография гексановой фракции этанольного экстракта *Thymus capitatus* L. в отношении нозокомиальных изолятов микроорганизмов. А- Хроматограмма гексановой фракции в видимом свете. Трек 1 – гексановая фракция этанольного экстракта *Thymus capitatus* L., 100 мкг/мкл, трек 2 – тимол, 1 мг/мл.

Таблица 4 – Результаты сопоставления денситометрии хроматограмм и биоавтографии гексановой фракции *Thymus capitatus* L.

R _f	Содержание веществ, % *	Ингибирование роста микроорганизмов								
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>C. tropicalis</i>
0.00 – 0.08	21.48 ± 0.24		+			++		++		
0.08 - 0.10	2.40 ± 0.41		+			++		++		
0.10 - 0.16	14.83 ± 0.10	++	+++			++		++		
0.16 - 0.19	7.40 ± 0.11		+++		++	+++		+++		
0.19 - 0.22	6.94 ± 0.28	+++	++		++	++		++		
0.21 - 0.29	9.36 ± 0.17	+	+		++	++	++	++		+
0.28 - 0.35	3.85 ± 0.07		+		++	+	+	++	++	+
0.34 - 0.52	10.47 ± 0.19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0.52 - 0.67	2.15 ± 0.10									
0.74 - 0.88	3.58 ± 0.20			+				++		
0.87 - 0.97	15.27 ± 0.90			+				++		
0.97 - 1.00	2.27 ± 0.14									

*- Рассчитано методом внутренней нормализации по высоте пиков, «+++» - явные зоны ингибирования роста микроорганизмов с четкими контурами, «++» - зона просматривается, но не ярко выраженная, «+»- зона просматривается, но слабо выраженная, без четких границ.

Установлено, что оптимальное разделение веществ исследуемой фракции осуществляется при использовании системы растворителей – петролейный эфир-диэтиловый эфир- уксусная кислота в соотношении 90:10:1. Последующий анализ пластин ТСХ позволил установить, что в гексановой фракции присутствует 12 отдельных веществ, из них 10 обладает антимикробным потенциалом в отношении разных нозокомиальных изолятов микроорганизмов, в том числе и грамотрицательных бактерий с повышенной устойчивостью к тестируенным антимикробным препаратам, в особенности *A. baumannii*, проявившем резистентность почти ко всем исследованным нами антибиотикам (Рисунок 7, таблица 4). На пластинах ТСХ зоны ингибирования роста микроорганизмов выделяются в виде светлых пятен (Рисунок 7). Из результатов, представленных в таблице 4 видно, что наиболее выраженным антимикробным действием обладают вещества, дающие на хроматограмме зону с R_f 0.34 - 0.52. Путем сопоставления этих данных с R_f стандарта тимола было установлено, что это монотерпеновое фенольное соединение присутствует в вышеуказанной группе веществ. Наряду с тимолом в этой хроматографической зоне могут быть близкие по химической структуре соединения, например, карвакрол. Стоит отметить, что нами было установлено присутствие в гексановой фракции и других активных веществ (Таблица 4, рисунок 7), существенно подавляющих рост изолятов *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *K. pneumoniae*.

2.3.2 Общее содержание фенольных соединений и суммы флавоноидов в гексановой фракции *Thymus capitatus* L.

В нашей работе была проведена оценка содержания суммы фенольных соединений и флавоноидов в гексановой фракции *Thymus capitatus* L., проявившей антимикробный, антиоксидантный эффекты, а также цитотоксическое действие в отношении клеток А549 adenокарциномы легкого человека. Согласно результатам, представленной в таблице 5 видно, что гексановый экстракт содержит существенное количество фенольных соединений (в эквиваленте галловой кислоты) – 191.13 мг ГАЕ/г сухого вещества. Содержание флавоноидов в эквиваленте кверцетина составило 67.86 мг QE/г сухого вещества (Таблица 5).

Таблица 5 – Общее содержание фенольных соединений и суммы флавоноидов в гексановой фракции *Thymus capitatus* L.

Содержание суммы фенольных соединений		Содержание суммы флавоноидов	
OD ₇₃₅	мг ГАЕ/г сухого вещества	OD ₄₃₀	мг QE/г сухого вещества
2.73 ± 0.32	191.13 ± 10.72	0.38 ± 0.051	67.86 ± 5.31

2.3.3 Анализ состава и содержания веществ в гексановой фракции *Thymus capitatus* L. с применением инструментальной ВЭТСХ

На рисунке 8А представлена пластина ТСХ после разделения веществ гексановой фракции и дериватизации серной кислотой, которая была использована для оценки состава и количественного содержания веществ в гексановой фракции. На денситограмме наблюдается двенадцать пиков (Рисунок 8Б). Установлено, что основные вещества, проявившие антимикробный эффект по результатам биоавтографии (Рисунок 7, таблица 4), имеют R_f пика, совпадающие с таковыми для веществ-стандартов: тимола, β -ситостерола, циклоартенола, олеиновой кислоты, хотя некоторые метаболиты все еще остались неидентифицированными (Таблицы 4, 6).

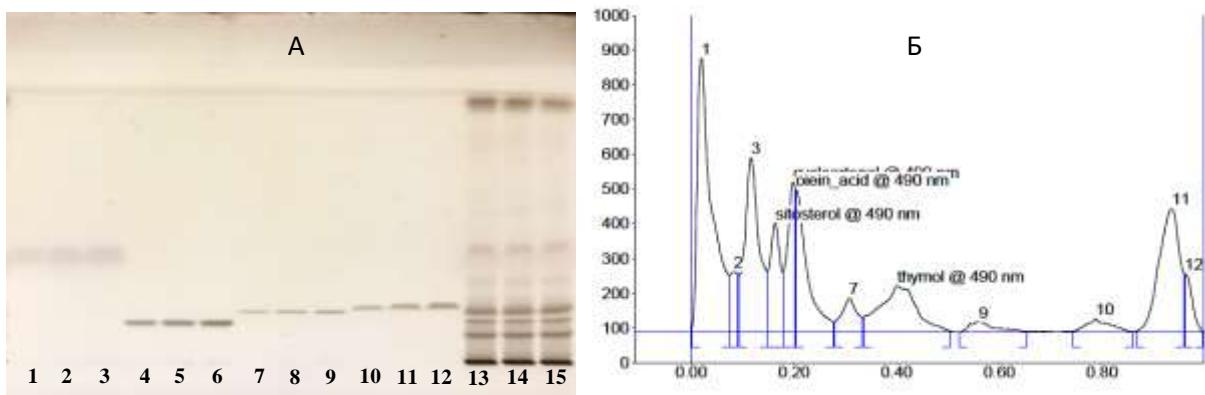


Рисунок 8 – Хроматограмма гексановой фракции, полученная с использованием метода ВЭТСХ после дериватизации H_2SO_4 (А). Трек 1-3 – раствор стандарта тимола (4,6,8 мкг/трек). Трек 4-6 – раствор стандарта β -ситостерола (4,6,8 мкг/трек). Трек 7-9 – раствор стандарта циклоартенола (4,6,8 мкг/трек). Трек 10-12 – раствор стандарта олеиновой кислоты (4,6,8 мкг/трек). Трек 13-15 – гексановая фракция (200 мкг на трек). Б – деснитограмма пластины с хроматограммой гексановой фракции *Thymus capitatus* L.

Результаты, полученные при оценке количественного содержания определяемых соединений, представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Количество содержание некоторых метаболитов в гексановой фракции *Thymus capitatus* L.

Соединения	R _f	Площадь, AU	Количество	
			мг/г экстракта	% от экстракта
Монотерпеновые фенолы	0.40	12911.95±140.13	54.18±1.24	5.42
Стерины	0.16	9130.86±38.28	20.39±0.26	2.04
Тriterpenoиды	0.20	8553.17±224.02	58.99±1.97	5.90
Жирные кислоты	0.21	11537.33±131.83	51,84±0.75	5.18

Итак, при ВЭТСХ анализе показано, что в гексановой фракции *Thymus capitatus* L. присутствуют монотерпеновые фенолы: тимол и другие близкие ему соединения, например, карвакрол, которые дают на хроматограмме (деснитограмме) пик с R_f, соответствующем R_f пика тимола. Их количество равняется 54.18 мг/г экстракта. Согласно данным, полученным при определении общего содержания суммы фенольных соединений в гексановой фракции по методу Фолина-Чокельтау, их количество составляет 191.13 мг/г сухого экстракта (Таблица 5). Таким образом, значительная часть фенольных соединений в гексановой фракции представлена монотерпеновыми фенолами. Тriterpenoиды, которые, как известно, обладают выраженной биологической активностью, присутствовали в гексановой фракции в количестве 58.99 мг/г экстракта. Нам также удалось обнаружить в гексановой фракции жирные кислоты и стерины, которые составляли 5.18% и 2.04% экстракта, соответственно.

Анализ данных литературы показывает, что современные исследования в основном направлены на изучение биологической активности эфирных масел растений *Thymus capitatus* L., произрастающих в разных географических зонах [Qaralleh *et al.*, 2009; Megdiche-Ksouri *et al.*, 2015; Saida *et al.*, 2016; Yavuz *et al.*, 2017; Sakkas *et al.*, 2018]. Антибактериальные, антиоксидантные эффекты показаны для некоторых видов

органических экстрактов *Thymus capitatus* L., например, из Италии [Iauk *et al.*, 2015], Иордании [Qaralleh *et al.*, 2009]. Сведения о фитохимическом составе эфирных масел и органических экстрактов растения *Thymus capitatus* L. свидетельствует о том, что состав, особенно количественное содержание метаболитов сильно варьирует от места произрастания растения [Russo *et al.*, 2013; Tabti *et al.*, 2014; Iauk *et al.*, 2015; Said *et al.*, 2016; Tohidi *et al.*, 2017]. Следовательно, знание хемотипа растений, результаты фитохимического анализа важны при разработке лекарственных средств на основе метаболитов лекарственных растений, произрастающих в разных географических зонах.

3. Выделение эндофитных актинобактерий из растения тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.)

В последние десятилетия эндосимбионты растений – эндофитные микроорганизмы являются объектом исследований, направленных на создание новых лекарственных средств с высоким терапевтическим потенциалом [Subbulakshmi *et al.*, 2012; Matsumoto, Takahashi, 2017].

В настоящей работе из разных частей растения тысячелистник обыкновенный *Achillea millefolium* L. (листья, стебли и корни) было выделено 11 изолятов актинобактерий. Установлено, эндофитные актинобактерии колонизируют преимущественно корни и стебли растений (46% и 45%) и в меньшей степени листья (9.00%) (Рисунок 9).

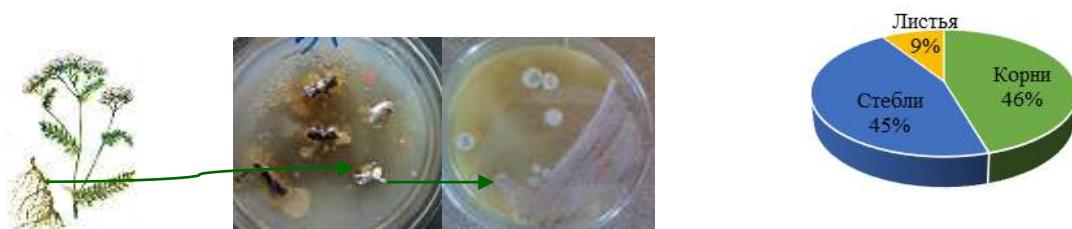


Рисунок 9 – Эндофитные актинобактерии, выделенные из растения *Achillea millefolium* L., и их встречаемость в различных частях растения.

Предварительный скрининг антимикробного потенциала выделенных изолятов актинобактерий в отношении изолятов нозокомиальных микроорганизмов методом агаровых блоков позволил установить, что 6 из 11 изолятов способны угнетать рост тестерных микроорганизмов.

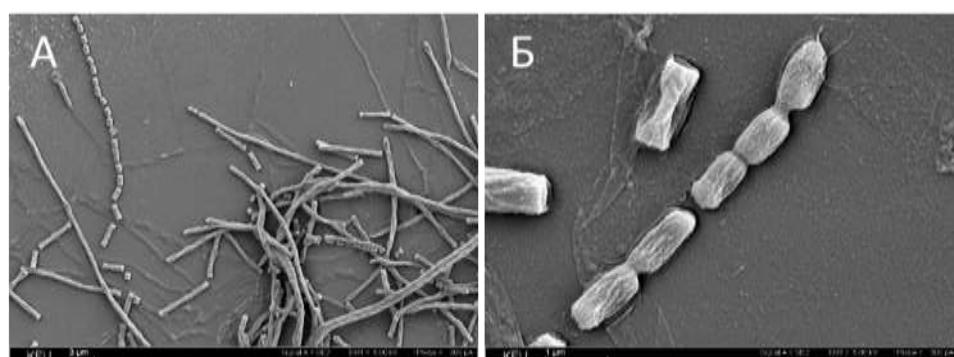


Рисунок 10 – Сканирующая электронная микроскопия мицелия (А, увеличение x2000) и спор изолята 8R7 (Б, увеличение x15000) (CarlZeissMerlin, Германия).

Наиболее активный изолят 8R7, выделенный из корней *Achillea millefolium* L., был идентифицирован по морфологическим признакам, биохимическим свойствам, а также по анализу нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Установлено, что данный изолят актинобактерий образуют хорошо развитый, воздушный мицелий; споры цилиндрической формы, образуют цепочки (Рисунок 10).

На основе молекулярно-генетических методов анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и биоинформационического анализа геномов актинобактерий, представленных в базе данных сервера NCBI, изолят эндофитных актинобактерий 8R7 с выраженной antimикробной активностью был идентифицирован как новый штамм *Streptomyces zaomyceticus* GI01 (Рисунок 11).

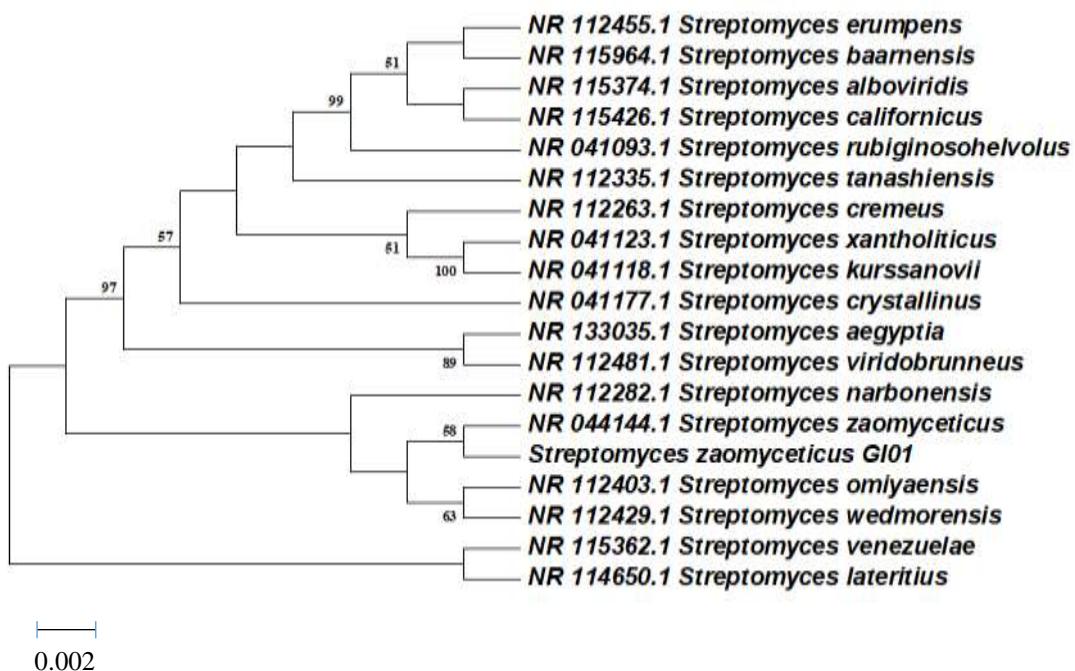


Рисунок 11 – Филогенетическое дерево, демонстрирующее таксономическую принадлежность штамма *Streptomyces zaomyceticus* GI01.

3.1 Антимикробная активность эндо- и экзометаболитов штамма *Streptomyces zaomyceticus* GI01

Все исследованные экстракти эндо- и экзометаболитов штамма *Streptomyces zaomyceticus* GI01 показали дозо-зависимый antimикробный эффект в отношении исследованных нозокомиальных изолятов микроорганизмов. Следует отметить, что этилацетатный экстракт культуральной жидкости (рН 8.6) демонстрировал значительный ингибирующий эффект даже в отношении полирезистентных грамотрицательных изолятов *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* - диаметры зон подавления роста при концентрации 500 мкг/диск составили 19.6 мм, 18.3 мм и 17.6 мм, соответственно (Рисунок 12). Самые большие зоны ингибирования роста были обнаружены для данного экстракта в отношении *Staphylococcus epidermidis*. (31.0 мм) и *Candida tropicalis* (22.2 мм). Ацетоновый экстракт эндометаболитов также проявил существенную активность в отношении всех тестированных изолятов. Наибольший эффект обнаружен в отношении *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida tropicalis* (Рисунки 12, 13).

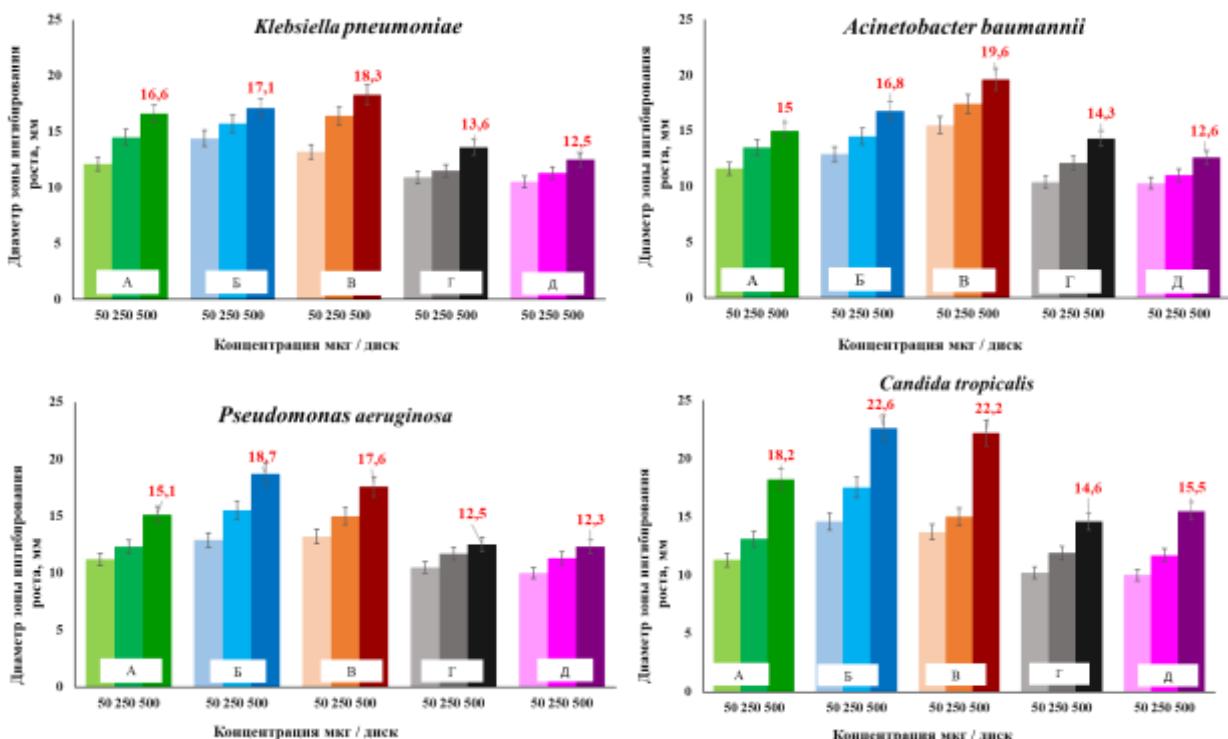


Рисунок 12 – Ингибирование роста нозокомиальных изолятов бактерий с грамотрицательным морфотипом и *Candida tropicalis* экстрактами культуральной жидкости (этилацетатный и бутанольный) и гомогената клеток (ацетоновый) *Streptomyces zaotyceticus* GI01. Экстракти: А – ацетоновый, Б – этилацетатный (рН 3.4), В – этилацетатный (рН 8.6), Г – бутанольный (рН 3.4), Д – бутанольный (рН 8.6).

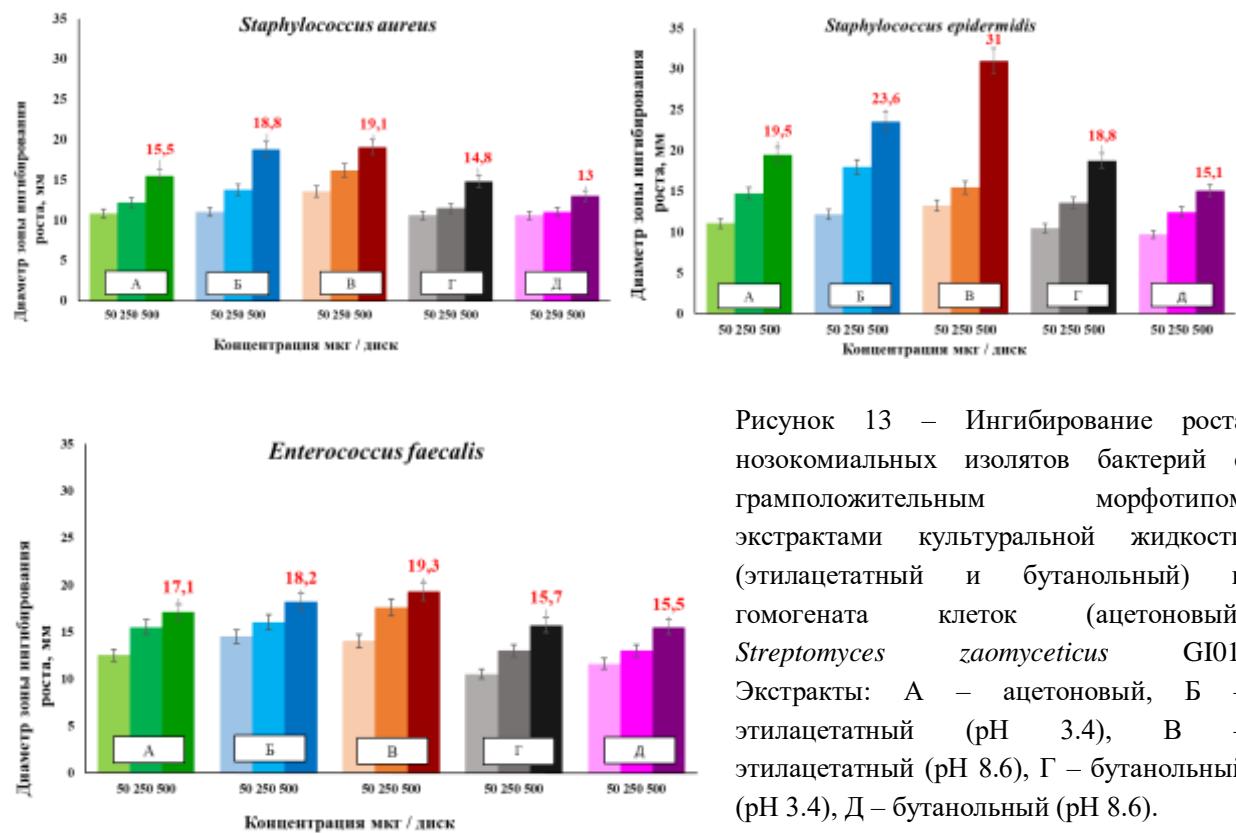


Рисунок 13 – Ингибирование роста нозокомиальных изолятов бактерий с грамположительным морфотипом экстрактами культуральной жидкости (этилацетатный и бутанольный) и гомогената клеток (ацетоновый) *Streptomyces zaotyceticus* GI01. Экстракти: А – ацетоновый, Б – этилацетатный (рН 3.4), В – этилацетатный (рН 8.6), Г – бутанольный (рН 3.4), Д – бутанольный (рН 8.6).

Для идентификации веществ, присутствующих в исследуемых экстрактах, мы провели биоавтографический анализ и ВЭТСХ-анализ с последующим проявлением

хроматограмм 5 % раствором серной кислоты в этаноле (для обнаружения всех метаболитов); 0.5 н раствором гидроксида натрия в этаноле (для обнаружения веществ класса макролидов); 1 н раствором соляной кислоты в этаноле (для обнаружения веществ класса хлорамфениколов); нингидриновым реагентом (для обнаружения пептидных веществ). Из рисунка 14Б видно, что все экстракты содержат ряд различных веществ: ацетоновый и бутанольный экстракты - в основном пептидные вещества (Рисунок 14В) и вещества класса макролидов (Рисунок 14Г). В этилацетатном экстракте (рН 8.6) отмечается присутствие веществ класса хлорамфениколов (Рисунок 14Д). Также нужно отметить, что значительное количество веществ ацетонового и особенно этилацетатного экстрактов не разделяется и остается на линии старта. По всей видимости это высокомолекулярные соединения, которые не могут быть разделены при ТСХ.

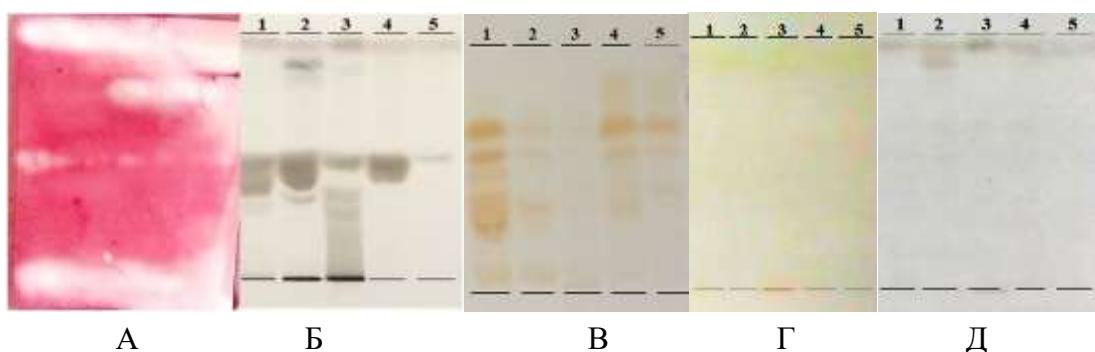


Рисунок 14 – Биоавтография (А) и хроматограммы экстрактов культуральной жидкости и гомогената клеток *Streptomyces zaomyceticus* GI01 после дериватизации растворами серной кислоты (Б), нингидрина (В), КОН (Г), НСl (Д). Треки: 1 – ацетоновый экстракт гомогената клеток; 2,3 – этилацетатные экстракты культуральной жидкости с рН 8.6 и рН 3.4; 4,5 – бутанольные экстракты культуральной жидкости с рН 8.6 и рН 3.4.

Биоавтографический анализ в сочетании с ВЭТСХ показал, что в ацетоновом экстракте содержится 10 веществ, в этилацетатном экстракте с рН=8.6 - 8 веществ, с рН=3.4 – 11 веществ, в бутанольном экстракте с рН=8.6 – 7 веществ, с рН=3.4 – 4 вещества. Соотнесение данных, полученных при денситометрическом анализе хроматограмм, биоавтографии с изолятом *Staphylococcus aureus* позволило установить, что все исследованные экстракты ингибируют рост тестерного изолята на линии старта хроматограммы, где присутствуют неидентифицированные высокомолекулярные соединения ($R_f=0.02$). Следующая зона ингибирования роста бактерий соответствует пептидным соединениям с R_f равным 0.47 в ацетоновом экстракте, 0.48 в этилацетатном экстракте и 0.50 в бутанольном экстракте. Также мы наблюдали зону ингибирования в верхней части хроматограммы, что обусловлено присутствием веществ с R_f равным 0.86, в этилацетатном и 0.96 бутанольном экстрактах, которые соответствуют веществам, относящимся к хлорамфениколам и макролидам (Рисунок 14А).

Таким образом, анализ полученных данных показывает, что выделенный нами из тысячелистника обыкновенного штамм эндофитных актинобактерий *Streptomyces zaomyceticus* GI01, продуцирует ряд эндо- и экзометаболитов, способных подавлять рост изолятов микроорганизмов, выделенных из дыхательного тракта пациентов с

внутрибольничными респираторными инфекциями, в том числе и полирезистентных к рекомендованным антибиотикам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе охарактеризовано сообщество культтивируемых микроорганизмов дыхательных путей пациентов Университетской клиники Нового Каира, Аль-Айни и клиники Аль-Рахма, Каир Эль-Гедида (Египет) с внутрибольничными респираторными инфекциями. Показано, что в клиническом материале, полученном от пациентов, количественно преобладают бактерии с грамотрицательным морфотипом. Изолятами грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii* характеризуются повышенной резистентностью к антибиотикам, что коррелирует с их способностью синтезировать β-лактамазы расширенного спектра. Усиление антибиотикорезистентности в ряду грамположительных микроорганизмов можно представить, как *Staphylococcus epidermidis* → *Enterococcus faecalis* → *Staphylococcus aureus*.

Установлено, что этанольный экстракт надземных частей растений *Thymus capitatus* L. обладает антимикробным потенциалом, наиболее значимый антимикробный эффект в отношении микроорганизмов, ассоциированных с внутрибольничными респираторными инфекциями, демонстрирует гексановая фракция данного экстракта, ингибируя рост всех тестированных нозокомиальных изолятов микроорганизмов, в том числе и мультирезистентного изолята *Acinetobacter baumannii*. Фитохимический анализ данной фракции свидетельствует о том, что ингибирование роста микроорганизмов в основном обусловлено присутствием монотерпеновых фенолов, тритерпеноидов и жирных кислот. Комплекс вторичных метаболитов *Thymus capitatus* L., содержащийся в гексановой фракции, также характеризуется антиоксидантным эффектом и цитотоксической активностью в отношении клеток аденоакарциномы легкого человека A549. Эндосимбиотическая актинобактерия из корневой системы растения тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) была выделена нами и определена по анализу высоко консервативной последовательности гена 16S рРНК как *Streptomyces zaotyseticus* GI01. Экстракти гомогената клеток и культуральной жидкости эндофитного стрептомицета содержат антимикробный комплекс, ингибирующий рост выделенных нозокомиальных изолятов микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. Из клинического материала, полученного от пациентов с симптомами внутрибольничных респираторных инфекций в двух клиниках Египта, выделено 90 изолятов микроорганизмов, среди которых 47.78% являются бактериями с грамположительным морфотипом, 31.11% – бактериями с грамотрицательным морфотипом и 21.11% – дрожжеподобными грибами. Все микроорганизмы определены до вида, показано количественное доминирование *Klebsiella pneumoniae* (22%).

2. Изолятами с грамотрицательным морфотипом характеризуются полирезистентностью к антимикробным препаратам: *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* чувствительны только к 5 из 17 тестированных антимикробных препаратов: фосфомицину, карбапенемам, нитрофурантоину и тигециклину; для изолята *Acinetobacter*

baumanni показана экстремальная резистентность к исследованным антимикробным препаратам, за исключением умеренной чувствительности к тигециклину.

3. Комплекс вторичных метаболитов лекарственного растения тимьяна головчатого (*Thymus capitatus* L.), содержащихся в гексановой фракции, ингибирует рост нозокомиальных изолятов всех исследованных видов микроорганизмов, включая полирезистентные бактерии с грамотрицательным морфотипом.

4. Биокомплекс вторичных метаболитов гексановой фракции тимьяна головчатого, произрастающего на средиземноморском побережье Египта, обладает антиоксидантной активностью (до 83.29% по ингибированию свободных радикалов ДФПГ), выраженным дозо-зависимым цитотоксическим эффектом в отношении клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549 и сравнительно низкой токсичностью в отношении нормальных клеток легкого эмбриона человека WI-38VA-13 subline 2RA.

5. Из тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) выделено 11 изолятов эндофитных актинобактерий. Эндо- и экзометаболиты нового штамма эндофитных актинибактерий, идентифицированного как *Streptomyces zaotyceticus* GI01, вызывают существенное подавление роста нозокомиальных изолятов микроорганизмов, в том числе и полирезистентных грамотрицательных изолятов.

6. Антимикробная активность фитокомплекса тимьяна головчатого (*Thymus capitatus* L.) в основном обусловлена присутствием монотерпеновых фенолов, тритерпеноидов и жирных кислот. Биокомплекс штамма эндофитных актинобактерий *Streptomyces zaotyceticus* GI01, ингибирующий рост нозокомиальных изолятов микрорганизмов, представлен в основном пептидными соединениями.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, включенных в список ВАК:

1. **Hassan, G.O.O.** Isolation and identification of microorganisms associated with respiratory tract infections from patients in Egypt / G.O.O. Hassan, M.E.A. Mosa, M.W.A. Ibrahim, N.S. Karamova // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2019. – № 1. – С. 42–46.
2. **Хассан, Г.О.О.** Антимикробный потенциал эндофитных актинобактерий лекарственных растений / Г.О.О. Хассан, И.Р. Ягудина, Н.С. Карамова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – № 9 (209). – С.106–110.
3. **Hassan, G.O.** A Comparative evaluation of antimicrobial effect of *Thymus capitatus* ethanolic extract on the different respiratory tract infections isolates / G.O. Hassan, N.S. Karamova, M. Abu Mraheil, W. Mohamed, T. Chakraborty, O. Ilinskaya // BioNanoScience. – 2017. – V. 7 (4). – P. 644–647.
4. Karamova, N.S. Antioxidant and antimutagenic potential of extracts of some Agavaceae family plants / N.S. Karamova, S. Gumerova, **G.O. Hassan**, E.Y. Abdul-Hafeez, O.H.M. Ibrahim, M.A.A. Orabi, O. Ilinskaya // BioNanoScience. – 2016. – V. 6 (3). – P. 591–593.

Тезисы докладов в сборниках материалов конференций

1. **Hassan, G.O.O.** Identification and investigation of antibiotic sensitivity for respiratory tract infections microorganisms in samples obtained from patients of Egyptian hospitals / G.O.O.

- Hassan, N.S. Karamova // Материалы и технологии XXI века: тезисы докладов III Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Казань, 29–31 октября 2018 г.). – Казань, 2018. – С. 92.
2. Шарифуллина, Э.С. Антимикробная активность экстракта *Thymus capitatus* L. / Э.С. Шарифуллина, Г.О.О. **Хассан**, В.Р. Хабибрахманова, Н.С. Карамова // Микробиология в современной медицине: тезисы докладов VI Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием (Казань, 27 июня 2018 г.). – Казань, 2018. – С. 66.
 3. **Hassan, G.O.O.** Antimicrobial effect of endophytic actinobacteria isolated from *Achillea millefolium* L. / G.O.O. Hassan, I.R. Yagudina, N.S. Karamova // Plants and microbes: the future of biotechnology: Abstracts of international scientific conference PLAMIC2018 (Russia, Ufa, 13–17 June 2018). – Ufa, 2018. – P. 32.
 4. **Хассан, Г.О.О.** Антимикробная активность этанольного экстракта *Thymus capitatus* в отношении микроорганизмов, ассоциированных с респираторными заболеваниями / Г.О.О. Хассан, Э.С. Шарифуллина, И.Р. Ягудина, В.Р. Хабибрахманова, Н.С. Карамова // Биология – наука XXI века: тезисы докладов 22-ой международной пущинской школы-конференции молодых ученых (23–27 апреля 2018 г., Пущино). – Пущино, 2018. – С. 320.
 5. **Хассан, Г.О.О.** Антибиотикочувствительность микроорганизмов, выделенных из респираторного тракта пациентов клиник египта / Г.О.О. Хассан, Н.С. Карамова // Биосистемы: организация, поведение, управление: тезисы докладов 71-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Нижний Новгород, 17–20 апреля 2018 г.). – Нижний Новгород, 2018. – С. 235.
 6. **Хассан, Г.О.О.** Antibiotics susceptibility of microorganisms isolated from patients with respiratory tract infections symptoms in Egypt / Г.О.О. Хассан, Н.С. Карамова // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2018» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипov. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2018. – С. 1.
 7. **Хассан, Г.О.О.** Характеристика микрофлоры дыхательных путей у пациентов клиник Египта с симптомами респираторной инфекции / Г.О.О. Хассан, Н.С. Карамова // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: тезисы докладов X ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 26–28 февраля 2018 г.). – Москва, 2018. – С. 238.
 8. **Hassan, G.O.O.** Antibacterial activity of successive extracts of *Thymus capitatus* against respiratory tract infections bacteria / G.O.O. Hassan, N.S. Karamova // Симбиоз–Россия–2017: тезисы докладов X Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов (Казань, 25–28 октября 2017 г.) – Казань, 2017. – С. 65.
 9. **Hassan, G.O.O.** Antimicrobial activity of endophytic actinomycetes / G.O.O. Hassan, N.S. Karamova // Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах: тезисы докладов Третьей всероссийской молодёжной научной школы-конференции с международным участием (Оренбург, 2–6 октября 2017 г.) – Оренбург, 2017. – С. 5.
 10. Гумерова, С.К. Антиоксидантные свойства экстрактов растений р. *Sansevieria* / С.К. Гумерова, Г.О. **Хассан**, В.Р. Хабибрахманова, Н.С. Карамова // Химия и технология

растительных веществ: тезисы докладов X Всероссийской научной конференции и школы молодых ученых (Казань, 5–9 июня 2017 г.) / ИОФХ им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН. – Казань, 2017. – С. 156.

11. **Хассан, Г.О.О.** Антимикробный эффект экстрактов *Thymus capitatus* и *Solenostemma argel* в отношении бактериальной микрофлоры дыхательных путей / Г.О.О. Хассан, Н.С. Карамова // Химия и технология растительных веществ: тезисы докладов X Всероссийской научной конференции и школы молодых ученых (Казань, 5–9 июня 2017 г.) / ИОФХ им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН – Казань, 2017. – С. 332.
12. **Хассан, Г.О.О.** Изоляция и идентификация бактерий, ассоциированных с респираторными заболеваниями / Г.О.О. Хассан, Н.С. Карамова // Биосистемы: организация, поведение, управление: тезисы докладов 70-ой Всероссийской с международным участием школы–конференции молодых ученых (Нижний Новгород, 26–28 апреля 2017 г.). – Нижний Новгород, 2017. – С. 168.
13. Karamova, N.S. Effect extract of *Yucca filamentosa* on induced mutagenesis of *Salmonella typhimurium* / N.S. Karamova, S. Gumerova, **G.O. Hassan**, O. Ilinskaya // Abstracts of IV international conference microbial diversity resource potential, Moscow, 23 November 2016. – Moscow, 2016. – P. 123.
14. Карамова, Н.С. Антиоксидантный и антимутагенный потенциал экстрактов трех растений семейства Agavaceae / Н.С. Карамова, С.К. Гумерова, **Г.О. Хассан**, И.Абдул–Хафиз, О.Х.М. Ибрагим, М.А.А. Ораби, О.Н. Ильинская // Трансляционная медицина 2016: сборник тезисов Международной конференции (Казань, 13–14 октября 2016 г.). – Казань, 2016. – С. 41.
15. **Hassan, G.O.O.** Isolation and identification of bacteria associated with respiratory tract infections / G.O.O. Hassan, N.S. Karamova // Материалы и технологии XXI века: тезисы докладов II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Казань, 20–23 сентября 2016 г.). – Казань, 2016. – С. 89.

E-mail автора: gamar_micro84@yahoo.com

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.36 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru.