

На правах рукописи

Хассан Гамал Осман Осман

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 преобладают 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 практически неограниченные возможности для разработки новых лекарственных средств, являются эндофитные микроорганизмы [Hardoim, 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 zaomyceticus* 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 zaomyceticus* 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 zaomyceticus* 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 школьно-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 Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 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. Автор 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 Касра, 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 стандартизированные питательные среды (кровяной агар, среда Эндо, бессолева 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 пересекали 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 Biotyper (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 zaomyceticus* 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, эндометаболические экстрагировали из гомогената клеток ацетоном.

Антимикробный 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, ингибирования 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 высокоэффективной 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 Касра, Аль-Айни и клиники Аль-Рахма, Маср Эль-Гедида (Египет), было выделено 90 изолятов микроорганизмов, из которых 43 изолята (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 (Biotyper, 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).

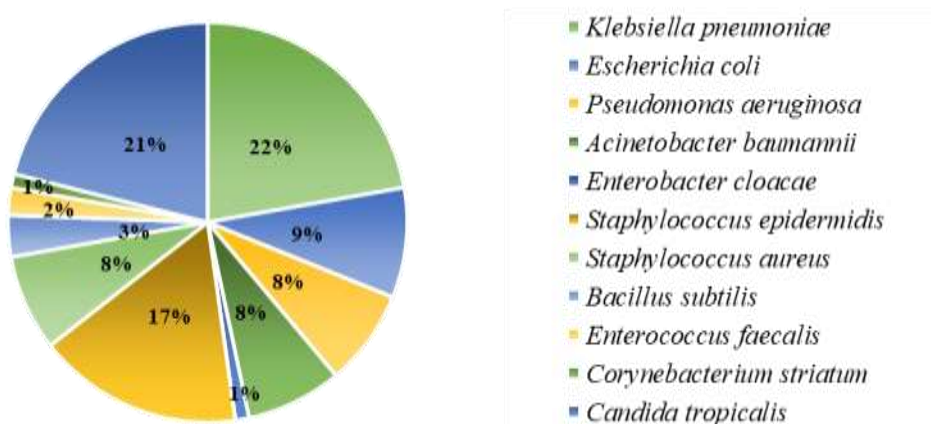


Рисунок 1 – Структура сообщества культивируемых микроорганизмов в образцах клинического материала пациентов с симптомами внутрибольничных респираторных инфекций.

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 тестируемых 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 аминопенициллинам, цефалоспорином 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/ Сульфаметаксозол	≥ 320 (R)	≥ 320 (R)	≤ 20 (S)	80 (R)	≥ 320 (R)
Цефподоксим	≥ 8 (R)		2 (R)		≥ 8 (R)
Цефуросим	≥ 64 (R)		8 (I)		≥ 64 (R)
Цефуросим-аксетил	≥ 64 (R)		8 (R)		≥ 64 (R)
Левифлоксацин	≥ 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: аминопенициллинам (в том числе и ингибиторзащищенному), цефалоспорином, 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 тестируемых препаратов проявил изолят *S. epidermidis* (Таблица 2). Изолят *Candida tropicalis* продемонстрировал чувствительность ко всем 6 тестируемым противогрибковым антибиотикам с разным механизмом действия – МПК ни для одного чувствительны 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)
Левифлоксацин		≤ 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)	
Мупироцин		≤ 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*, продуцирующие КРС-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 ингибирует 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.

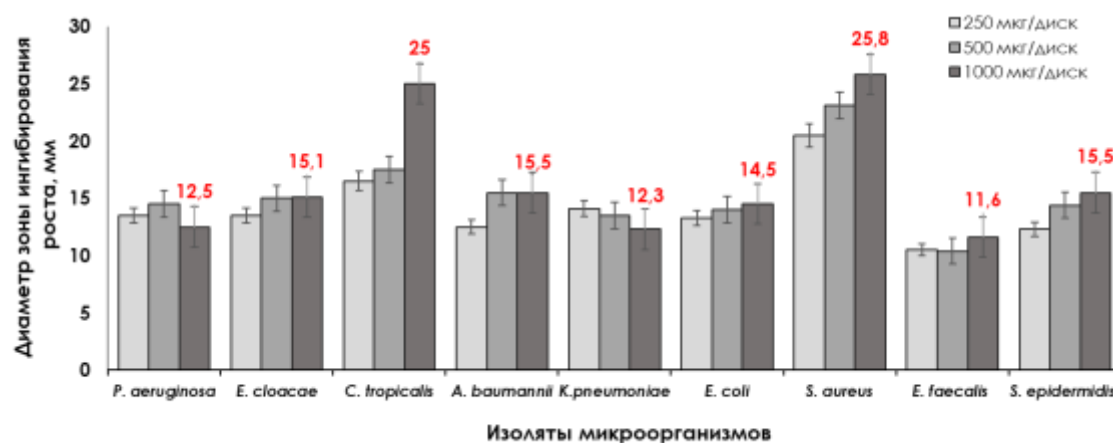


Рисунок 2 – Антимикробная активность гексановой фракции этанольного экстракта *Thymus capitatus* L.

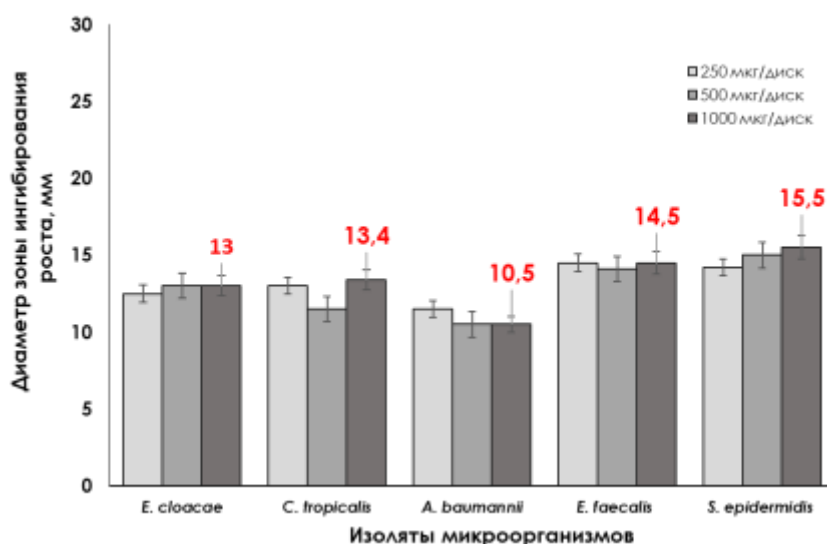


Рисунок 3 – Антимикробная активность хлороформной фракции этанольного экстракта *Thymus capitatus* L.

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 фосфомолибденового 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).

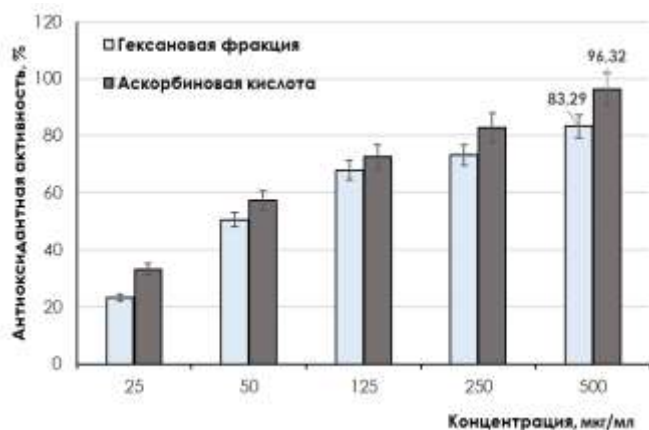


Рисунок 4 – Антирадикальная активность гексановой фракции *Thymus capitatus* L. по ингибированию ДФПГ.

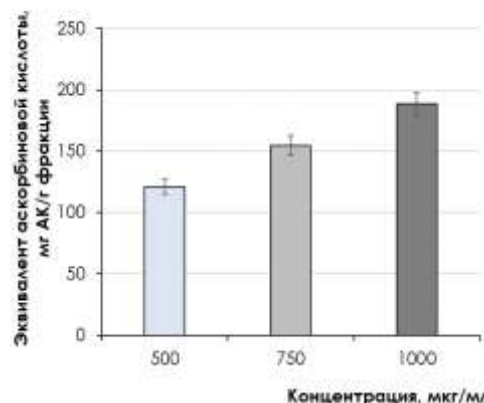


Рисунок 5 – Общая антиоксидантная активность гексановой фракции *Thymus capitatus* L. в фосфомолибденовом тесте.

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 аденокарциномы 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).

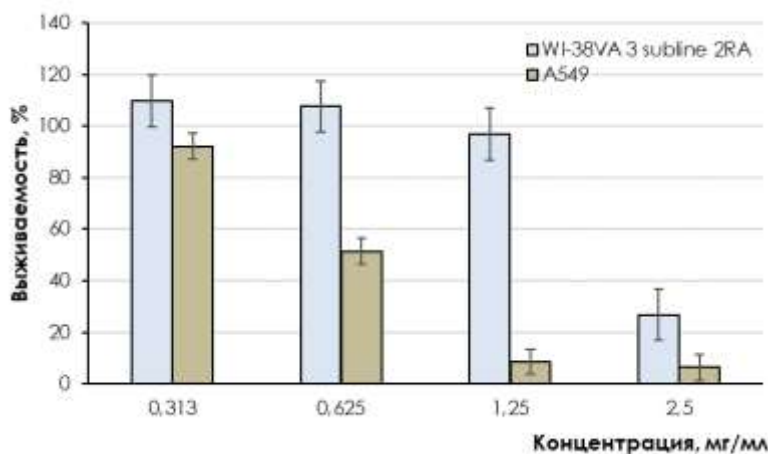


Рисунок 6 – Цитотоксичность гексановой фракции *Thymus capitatus* L. в отношении клеток аденокарциномы легкого человека A549 и клеток легкого эмбриона человека WI-38VA 3 subline 2RA.

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

2.3.1 Биоавтография гексановой фракции

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

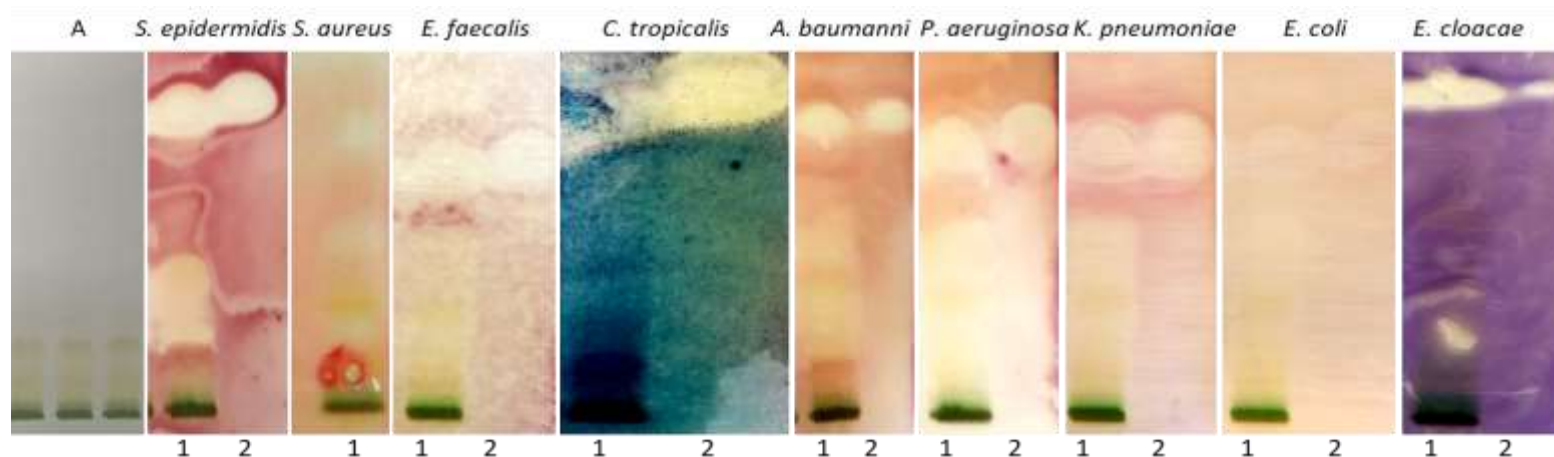


Рисунок 7 – Биоавтография гексановой фракции этанольного экстракта *Thymus capitatus* L. в отношении нозокомиальных изолятов микроорганизмов. А- Хроматограмма гексановой фракции в видимом свете. Трек 1 – гексановая фракция этанольного экстракта *Thymus capitatus* L., 100 мкг/мкл, трек 2 – тимол, 1 мг/мл.

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 тестируемым 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 A549 аденокарциномы легкого человека. Согласно результатам, представленной в таблице 5 видно, что гексановый экстракт содержит существенное количество фенольных соединений (в эквиваленте галловой кислоты) – 191.13 мг GAE/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 GAE/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).

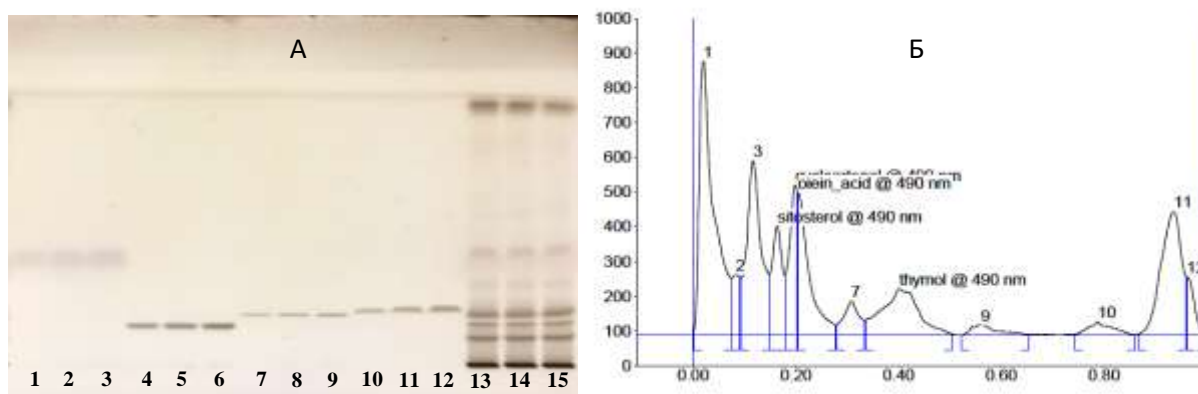


Рисунок 8 – Хроматограмма гексановой фракции, полученная с использованием метода ВЭТСХ после дериватизации H_2SO_4 (А). Трек 1-3 – раствор стандарта тимола (4,6,8 мкг/трек). Трек 4-6 – раствор стандарта β -ситостерола (4,6,8 мкг/трек). Трек 7-9 – раствор стандарта циклоартенола (4,6,8 мкг/трек). Трек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

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

Таблица 6 – Количественное 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 \pm 140.13	54.18 \pm 1.24	5.42
Стерины	0.16	9130.86 \pm 38.28	20.39 \pm 0.26	2.04
Тритерпеноиды	0.20	8553.17 \pm 224.02	58.99 \pm 1.97	5.90
Жирные кислоты	0.21	11537.33 \pm 131.83	51,84 \pm 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 (денситограмме) 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. Тритерпеноиды, 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).

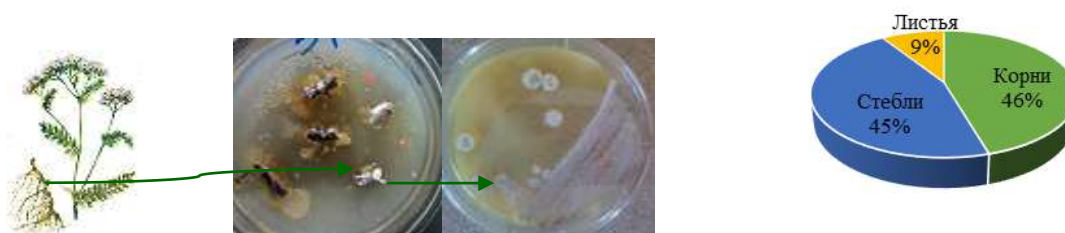


Рисунок 9 – Эндофитные актинобактерии, выделенные из растения *Achillea millefolium* L., и их встречаемость в различных частях растения.

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.

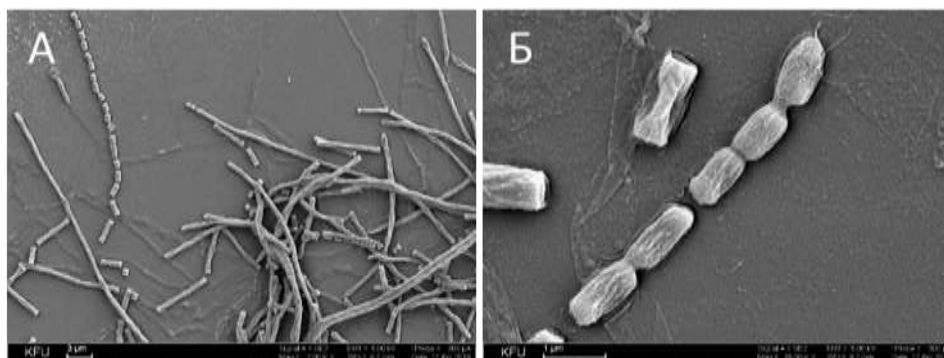


Рисунок 10 – Сканирующая электронная микроскопия мицелия (А, увеличение x2000) и спор изолята 8R7 (Б, увеличение x15000) (CarlZeissMerlin, Германия).

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 биоинформатического анализа геномов актинобактерий, представленных в базе данных сервера NCBI, изолят эндофитных актинобактерий 8R7 с выраженной антимикробной активностью был идентифицирован как новый штамм *Streptomyces zaomyceticus* GI01 (Рисунок 11).

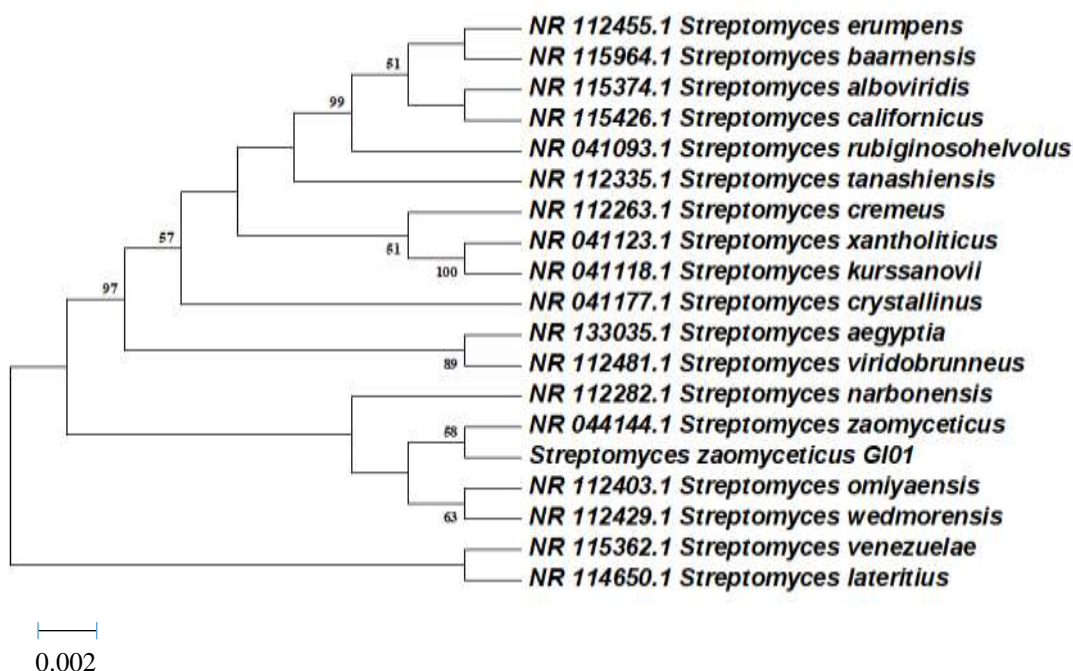


Рисунок 11 – Филогенетическое дерево, демонстрирующее таксономическую принадлежность штамма *Streptomyces zaomyceticus* GI01.

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

Все исследованные экстракты эндо- и экзометаболитов штамма *Streptomyces zaomyceticus* GI01 показали дозо-зависимый антимикробный 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 тестируемых изолятов. Наибольший эффект обнаружен в отношении *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida tropicalis* (Рисунки 12, 13).

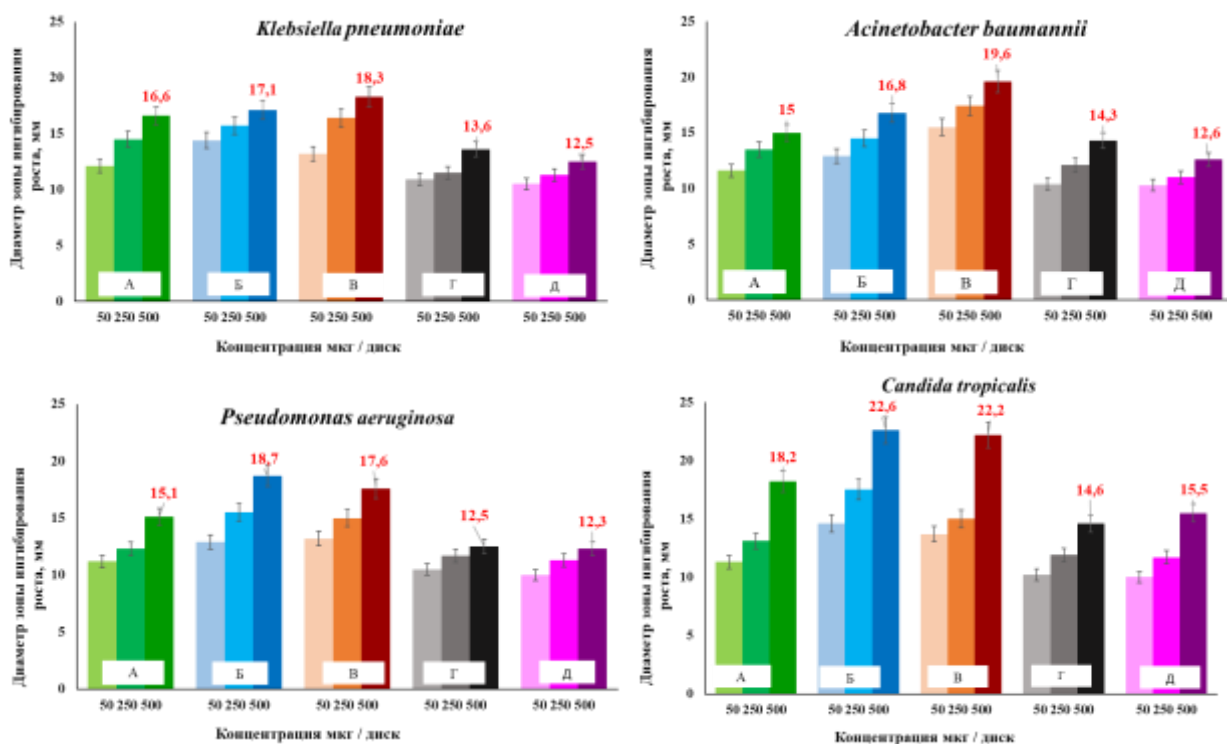


Рисунок 12 – Ингибирование роста нозокомиальных изолятов бактерий с грамотрицательным морфотипом и *Candida tropicalis* экстрактами культуральной жидкости (этилацетатный и бутанольный) и гомогената клеток (ацетоновый) *Streptomyces zaomyceticus* GI01. Экстракты: А – ацетоновый, Б – этилацетатный (pH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

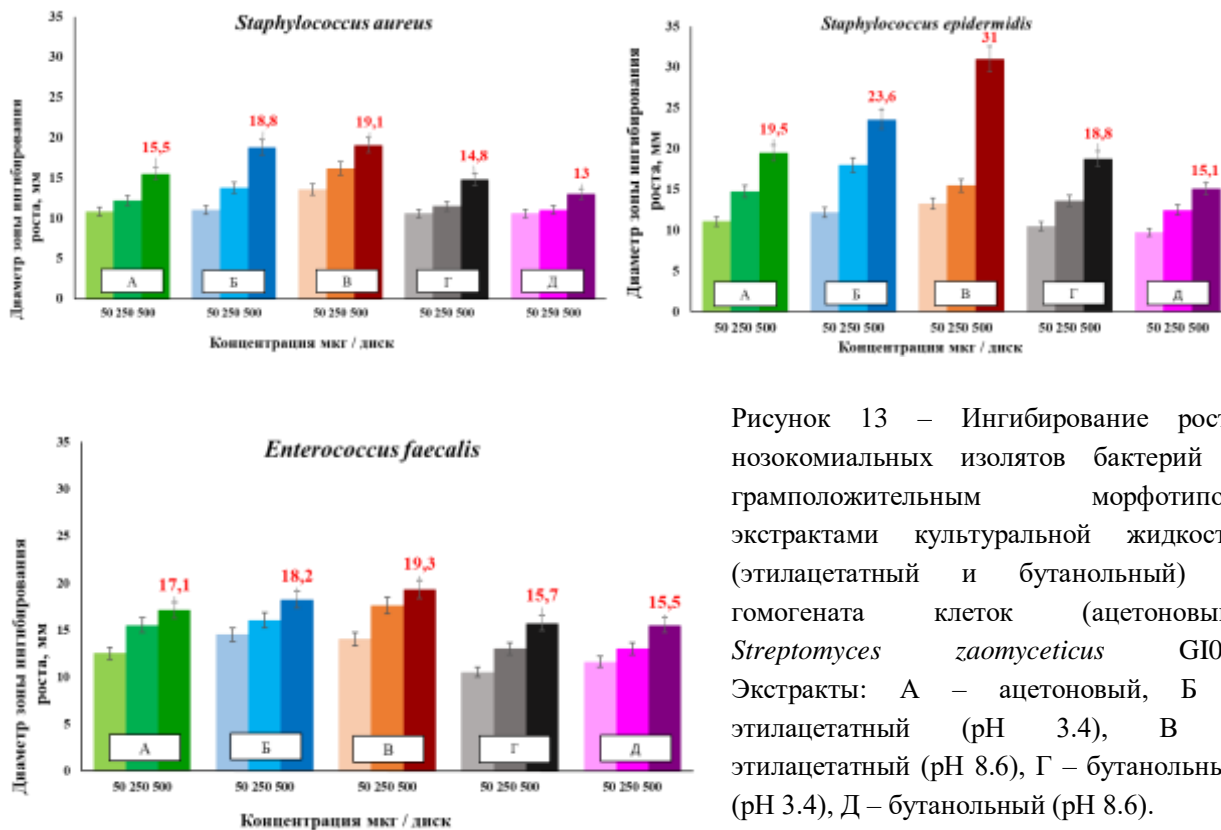


Рисунок 13 – Ингибирование роста нозокомиальных изолятов бактерий с грамположительным морфотипом экстрактами культуральной жидкости (этилацетатный и бутанольный) и гомогената клеток (ацетоновый) *Streptomyces zaomyceticus* GI01. Экстракты: А – ацетоновый, Б – этилацетатный (pH 3.4), В – этилацетатный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

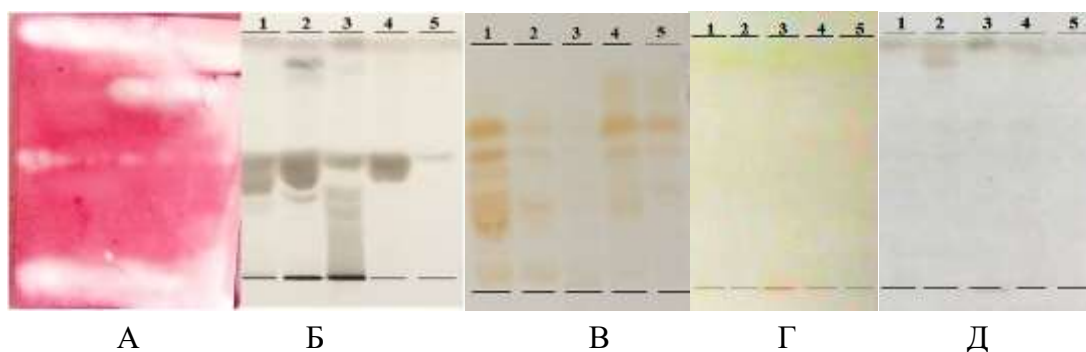


Рисунок 14 – Биоавтография (А) и хроматограммы экстрактов культуральной жидкости и гомогената клеток *Streptomyces zaomyceticus* GI01 после дериватизации растворами серной кислоты (Б), нингидрина (В), КОН (Г), НСl (Д). Треки: 1 – ацетоновый экстракт гомогената клеток; 2,3 – этилацетатные экстракты культуральной 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 культивируемых микроорганизмов дыхательных путей пациентов Университетской клиники Нового Касра, Аль-Айни и клиники Аль-Рахма, Маср Эль-Гедида (Египет) с внутрибольничными респираторными инфекциями. Показано, что в клиническом материале, полученном от пациентов, количественно преобладают бактерии с грамотрицательным морфотипом. Изоляты 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* \rightarrow *Enterococcus faecalis* \rightarrow *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 аденокарциномы 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 рПНК как *Streptomyces zaomyceticus* GI01. Экстракты 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. Изоляты 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*

baumannii 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. Биокomплекс 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 актинобактерий, идентифицированного как *Streptomyces zaomyceticus* GI01, вызывают существенное подавление роста нозокомиальных изолятов микроорганизмов, в том числе и полирезистентных грамотрицательных изолятов.

6. Антимикробная активность фитокомплеса тимьяна головчатого (*Thymus capitatus* L.) в основном обусловлена присутствием монотерпеновых фенолов, тритерпеноидов и жирных кислот. Биокomплекс штамма эндофитных актинобактерий *Streptomyces zaomyceticus* GI01, ингибирующий рост нозокомиальных изолятов микроорганизмов, 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 пушкинской школы-конференции молодых ученых (23–27 апреля 2018 г., Пушкино). – Пушкино, 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. Антипов. [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.

Е-mail автора: gamal_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. Е-mail: ziabramova@mail.ru.