ISSN 1817-7883 eISSN 2522-9354

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(2)-05
УДК: 577.182.62.+576.851.252+615.451.1

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЕКСТРАКТУ ПЛОДІВ ВІЛЬХИ СІРОЇ ALNUS INCANA L. MOENC НА ТЕМПИ НАБУВАННЯ MLS-РЕЗИСТЕНТНОСТІ ШКІРНИМИ ІЗОЛЯТАМИ СТАФІЛОКОКІВ

Куцик Р.В., Юрчишин О.І.
Івано-Франківський національний медичний університет (вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, Україна, 76018)

Відповідальний за листування:
e-mail: *rkutsyk@ifnmu.edu.ua*

Статтю отримано 22 березня 2018 р.; прийнято до друку 27 квітня 2018 р.

Анотація. *Виникнення резистентних штамів мікроорганізмів є природною біологічною відповіддю на використання протимікробних препаратів, які створюють селективний тиск, сприяючий їх відбору, виживанню і розмноженню. Мета проведеного дослідження полягала у вивченні темпів набування резистентності шкірних ізолятів стафілококів до еритроміцину та впливу на них суббактеріостатичних концентрацій екстракту плодів вільхи сірої Alnus incana L. Формування резистентності до еритроміцину та вплив на її темпи суббактеріостатичних концентрацій екстракту плодів вільхи сірої (екстрагент 90% етанол) проводили відносно штамів S.epidermidis: чутливого до макролідів, та з низьким рівнем резистентності до 14 та 15-членних макролідів. Дослідження проведено протягом 30 днів, шляхом багаторазових послідовних пасажів тест-штамів стафілококів (концентрація 1х10^7 КУО/мл) в пробірки з МПБ та еритроміцином у 3-х двократних розведення вище та нижче мінімальної бактеріостатичної концентрації. Для статистичної обробки результатів використано одно- і двофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) та комп'ютерну програму Microsoft Office Excel 2011. У штаму S.epidermidis з низьким рівнем резистентності до 14 та 15-членних макролідів спостерігалося швидке наростання резистентності до антибіотика від 32 до 1024 мкг/мл ($F=34,2804$; $F>F_{крит\ max}=5,9874$, $p=0,0011$). В присутності суббактеріостатичних концентрацій екстракту плодів вільхи сірої (1/4 МБсК) вихідна МБсК еритроміцину знизилась у 32 рази та становила 1 мкг/мл ($F=9,7497$; $F>F_{крит\ max}=5,9874$, $p=0,0205$). У чутливого до макролідів штаму резистентності до еритроміцину після 30 пасажів викликати не вдалося. Під впливом селективного тиску еритроміцину штам S.epidermidis з низьким початковим рівнем MLS-резистентності швидко досягає резистентності високого рівня. Біологічно активні сполуки екстракту плодів вільхи сірої виразно гальмують процес набування S.epidermidis резистентності до макролідів та елімінують фенотипічні ознаки резистентності, властивої материнському штаму.*

Ключові слова: *бактерії, стійкість до антибіотиків, макроліди, вільха сіра Alnus incana L.*

Вступ

Виникнення резистентних штамів мікроорганізмів є природною біологічною відповіддю на використання протимікробних препаратів, які створюють селективний тиск, сприяючий їх відбору, виживанню і розмноженню. Існує гіпотеза, що у певному діапазоні концентрацій антибіотика найбільш імовірна селекція резистентних штамів мікроорганізмів, так зване "вікно селекції мутантів" (mutant selection window). Селекція резистентних штамів виникає при концентраціях антибіотика, які перевищують МПК (мінімальна пригнічуюча концентрація) та є нижчими від тих, що попереджують розмноження стійких мутантів (mutant prevention concentration) у межах "вікна селекції мутантів" [9].

Інфекції спричинені резистентними штамами мікроорганізмів характеризуються тривалим перебігом, як правило вимагають госпіталізації, збільшують тривалість перебування в стаціонарі, мають поганий прогноз для пацієнтів. При неефективності препаратів вибору доводиться використовувати засоби другого ряду (резервні), часто дорожчі, менш безпечні і не завжди доступні. Стримування поширення вже існуючих резистентних мікроорганізмів та запобігання появі нових полірезистентних штамів залишається проблемою для лікарів, бактеріологів та фармацевтів, яка спонукає розробляти різні заходи для боротьби з антибіотикорезистентністю [1].

Мета проведеного дослідження полягала у вивченні темпів набування резистентності шкірних ізолятів стафілококів до макролідів (на прикладі еритроміцину) та впливу на них суббактеріостатичних концентрацій екстракту плодів вільхи сірої *Alnus incana L.*

Матеріали та методи

Формування резистентності до еритроміцину та вплив на її темпи екстракту плодів вільхи сірої *Alnus incana L.* (екстрагент 90% етанол) проводили відносно штаму *S.epidermidis*, чутливого до макролідів (S), та штаму *S.epidermidis* з низьким рівнем резистентності до 14 та 15-членних макролідів (фенотип Neg), який забезпечується ефлюксними механізмами (MsrA) [6]. Спостереження за процесом набування резистентності до еритроміцину (ERY) досліджуваними штамами здійснювали в процесі їх багаторазових послідовних пасажів у м'ясо пептонний бульйон (МПБ) з різними концентраціями ERY та суббактеріостатичними концентраціями екстракту [2, 9]. У перший ряд пробірок до мікробної культури (концентрація 1х10^7 КУО/мл) вносили ERY у трьох двократних розведеннях вище та

©Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

Таблиця 1. Формування резистентності у *S.epidermidis з* конститутивним механізмом MLS-резистентності до еритроміцину та вплив на неї екстракту плодів вільхи сірої *Alnus incana L.*

Досліджувані компоненти		Вихідна МБсК ERY	МБсК ERY після *n* кількості пасажів					
			5	10	15	20	25	30
ERY	МБсК (мкг/мл) **	32	128	256	512	512	1024	1024
	кратність збільшення МБсК	0	4	8	16	16	32	32
ERY+ 1/4 МБсК *Alnus incana L.*	МБсК (мкг/мл) *	32	8	4	4	2	1	1
	кратність зменшення МБсК	0	4	8	8	16	32	32
Контроль	1/4 МБсК *Alnus incana L.*	32	32	32	32	32	32	32
	90% етанол+DMSO МБсК	32	32	32	32	32	32	32

Примітки: *n* - кількість пасажів, * - p<0,05, ** - p<0,01.

нижче МБсК (мінімальна бактеріостатична концентрація), у другий ряд до антибіотика додавали досліджуваний екстракт у концентрації 1/4 МБсК в кожну пробірку. Контрольними служили пробірки з мікробною культурою і екстрактом або диметилсульфоксидом (розчинник екстракту). Після 24 годин інкубації з пробірок з найбільшою концентрацією антибіотика, в яких спостерігався візуальний ріст, відбирали аліквоти та розводили 1:100 для посіву в наступний ряд пробірок. Пересіви здійснювали протягом 30 днів. Після 30 пасажів мікробні культури пересівали на поживний агар без антибіотика та екстракту. Пересіви продовжували 10 днів для встановлення стабільність резистентності.

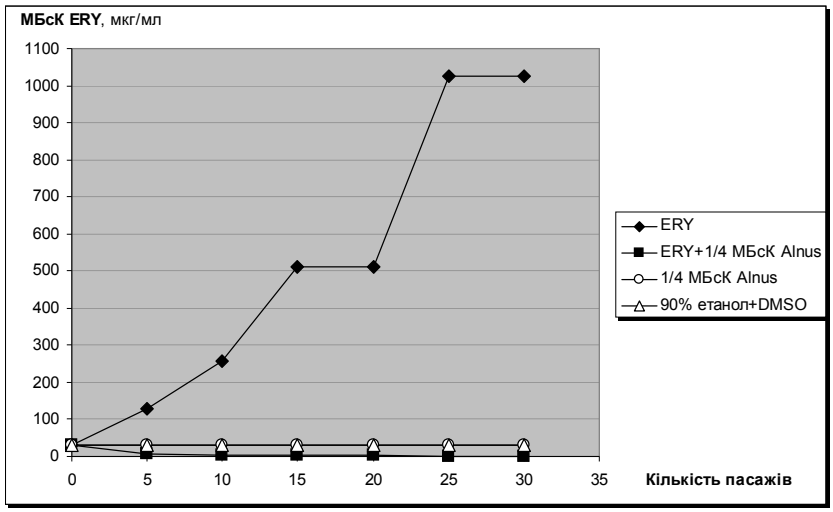


Рис. 1. Формування резистентності у *S.epidermidis* з конститутивним механізмом MLS-резистентності до еритроміцину та вплив на неї екстракту плодів вільхи сірої *Alnus incana L.*

Для статистичної обробки результатів використано одно- і двофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) та комп'ютерну програму Microsoft Office Excel 2011.

Результати. Обговорення

У процесі експерименту у тест-штаму *S.epidermidis* (фенотип Neg) спостерігалося достатньо швидке наростання резистентності до еритроміцину (табл. 1, рис. 1) (F=34,2804; $F>F_{крит\ max}$=5,9874, p=0,0011). Вихідна МБсК еритроміцину для нього становила 32 мкг/мл. Після 5-го пасажу вона зросла у 4 рази та до 10-го пасажу досягла 256 мкг/мл, що перевищувало початковий рівень у 8 разів. Після 15-го пасажу МБсК ERY зросла у 16 разів та зберігалась на цьому рівні до 20-го пасажу. На момент закінчення експерименту (30 пасажів на середовищі з антибіотиком) МБсК еритроміцину становила 1024 мкг/мл, що перевищувало аналогічний показник материнського штаму в 32 рази.

У присутності 1/4 МБсК екстракту плодів вільхи сірої *Alnus incana L.* наростання базально низької резистентності до еритроміцину у штаму S.epidermidis (фенотип Neg) не спостерігалося (F=9,7497; $F>F_{крит\ max}$=5,9874, p=0,0205). Після 5-го пасажу в даному випадку вихідна мінімальна бактеріостатична концентрація ERY знизилась у 4 рази. Після 10-го пасажу МБсК ERY становила 4 мкг/мл. Після 20-го пасажу було зареєстровано зниження МБсК ERY у 32 рази та становила 1 мкг/мл і до 30-го пасажу її змін не спостерігалось. Таким чином, після тридцяти пасажів в середовищі з еритроміцином та 1/4 МБсК екстракту плодів вільхи сірої *Alnus incana L.* шкірний ізолят *S.epidermidis* Neg повністю відновив чутливість до антибіотика.

У ході проведеного двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) одержаних результатів підтверджено достовірність впливу екстракту плодів вільхи на чутливість тест-штаму S.epidermidis Neg до еритроміцину (F=9,4397; $F>F_{крит\ max}$=3,8852, p=0,0034.

У чутливого до макролідів штаму *S.epidermidis* резистентності до еритроміцину після 30 пасажів в МПБ із зростаючими концентраціями антибіотика викликати не вдалося.

Отримані нами результати продемонстрували, що під впливом селективного тиску еритроміцину штам з низьким початковим рівнем резистентності, зумовле-

ним ефлюксом препарату з клітини [6], доволі швидко досягає резистентності високого рівня. Біологічно активні сполуки екстракту плодів вільхи виразно блокують цей процес набування резистентності. Більше того, в присутності суббактеріостатичних концентрацій екстракту плодів вільхи спостерігалася достовірна елімінація фенотипічної ознаки резистентності, властивої материнському штаму.

Якщо прийняти до уваги плазмідну і транспозонну локалізацію детермінант резистентності стафілококів до макролідів [4, 5], що робить їх достатньо нестабільними геномними елементами, можна висловити припущення про вплив компонентів екстракту плодів вільхи на процеси перегрупування генів та їх кластерів.

Їх зв'язування з нестабільними генетичними елементами очевидно призводить до елімінації останніх з геному клітини. Висловлені роздуми мають право на існування і потребують подальших експериментальних перевірок, оскільки ряд рослинних ефірних олій проявляють здатність елімінувати плазмідні носії антибіотикорезистентності грам-негативних бактерій. Зокрема встановлено, що ефірні олії м'яти перцевої, лаванди та коричного дерева підвищують чутливість до піпераціліну і меропенему [7], а також до окситетрацикліну [8] штамів *E.coli,* що є носіями плазмід резистентності. Фізико-хімічними методами доведено дезінтегруючий вплив ефірної олії насіння зіри (*Cuminum cyminum L.*) на R-плазміду *K.pneumoniae* [3].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Під впливом селективного тиску еритроміцину штам *S.epidermidis* з низьким початковим рівнем MLS-резистентності, зумовленим ефлюксом препарату з клітини, швидко досягає резистентності високого рівня.

2. Біологічно активні сполуки екстракту плодів вільхи сірої *Alnus incana L.* виразно гальмують процес набування *S.epidermidis* резистентності до макролідів (еритроміцину).

3. У присутності суббактеріостатичних концентрацій екстракту плодів вільхи спостерігається достовірна елімінація фенотипічної ознаки резистентності, властивої материнському штаму.

Таким чином, перспективним є подальше вивчення хімічної природи БАР плодів вільхи сірої *Alnus incana L.*, що здатні елімінувати гени антибіотикорезистентності.

Список посилань

1. Кашпур, Н. В. (2012). *Протимікробна активність і біологічна дія субстанцій рослинного походження рослин родів Galium L. та Artemisia L.* (Дис. канд. мед. наук). Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова АМН України, Харків.
2. Boos, M., Mayer, S., Fischer, A., Kohrer, K., Scheuring, S., Heisig, P. ... Chmitz, F.-J. (2001). In vitro development of resistance to six quinolones in Streptococcus pneumonie, Streptococcus pyogenes, and Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 45 (1), 938-942. DOI:10.1128/AAC.45.3.938-942.2001.
3. Derakhshan, S., Sattari, M. & Bigdeli, M. (2010). Effect of cumin (Cuminum cyminum) seed essential oil on biofilm formation and plasmid integrity of Klebsiella pneumoniae. *Pharmacogn. Mag.,* 6 (21), 57-61. doi: 10.4103/0973-1296.59967.
4. Hisatsune, J., Hirakawa, H., & Yamaguchi, T. (2013). Emergence of Staphylococcus aureus carrying multiple drug resistance genes on a plasmid encoding exfoliative toxin B. Antimicrob. *Agents Chemother.,* 57 (12), 6131-6140. doi: 10.1128/AAC.01062-13.
5. Matsuoka, M., Endou, K., Kobayashi, H., Inoue, M. & Nakajima, Y. (1998). A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol. *Lett.,* 167 (2), 221-227. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13232.x.
6. Murina, V., Kasari, M. & Hauryliuk, V. Antibiotic resistance ABCF proteins reset the peptidyl transferase centre of the ribosome to counter translational arrest. *Nucleic Acids Research,* 1(1), 1-11. doi: 10.1093/nar/gky050.
7. Yap, P. S., Lim, S. H. & Hu, C. P. (2013). Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine,* 20(8), 710-713. doi: 10.1016/j.phymed.2013.02.013.
8. Schelz, Z., Molnar, Z., & Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77 (4), 279-285. DOI:10.1016/j.fitote.2006.03.013.
9. Shimizu, T., Harada, K., & Kataoka, Y. (2013). Mutant prevention concentration of orbifloxacin: comparison between Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Staphylococcus pseudointermedius of canine origin. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55 (37), 1-7. doi: 10.1186/1751-0147-55-37.

Referenses

1. Kashpur, N. V. (2012). *Protymikrobna aktyvnist i biolohichna diia substantsii roslynnoho pokhodzhennia roslyn rodiv Galium L. ta Artemisia L. [Antimicrobial activity and biological action of plant-derived substances of plants genera (Diss. of Ph.D., Medical Science)].* (Dys. kand. med. nauk). Instytut mikrobiolohii ta imunolohii imeni I.I. Mechnykova AMN Ukrainy, Kharkiv - Institute of Microbiology and Immunology named after I.I. Mechnikov Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv.
2. Boos, M., Mayer, S., Fischer, A., Kohrer, K., Scheuring, S., Heisig, P. ... Chmitz, F.-J. (2001). In vitro development of resistance to six quinolones in Streptococcus pneumonie, Streptococcus pyogenes, and Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 45 (1), 938-942. DOI:10.1128/AAC.45.3.938-942.2001.
3. Derakhshan, S., Sattari, M. & Bigdeli, M. (2010). Effect of cumin (Cuminum cyminum) seed essential oil on biofilm formation and plasmid integrity of Klebsiella pneumoniae. *Pharmacogn. Mag.*, 6 (21), 57-61. doi: 10.4103/0973-1296.59967.
4. Hisatsune, J., Hirakawa, H., & Yamaguchi, T. (2013). Emergence of Staphylococcus aureus carrying multiple drug resistance genes on a plasmid encoding exfoliative toxin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57 (12), 6131-6140. doi: 10.1128/AAC.01062-13.
5. Matsuoka, M., Endou, K., Kobayashi, H., Inoue, M. & Nakajima, Y. (1998). A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in Staphylococcus aureus.

FEMS Microbiol. *Lett.,* 167 (2), 221-227. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13232.x.
6. Murina, V., Kasari, M. & Hauryliuk, V. Antibiotic resistance ABCF proteins reset the peptidyl transferase centre of the ribosome to counter translational arrest. *Nucleic Acids Research,* 1(1), 1-11. doi: 10.1093/nar/gky050.
7. Yap, P. S., Lim, S. H. & Hu, C. P. (2013). Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine,* 20(8), 710-713. doi: 10.1016/j.phymed.2013.02.013.
8. Schelz, Z., Molnar, Z., & Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77 (4), 279-285. DOI:10.1016/j.fitote.2006.03.013.
9. Shimizu, T., Harada, K., & Kataoka, Y. (2013). Mutant prevention concentration of orbifloxacin: comparison between Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Staphylococcus pseudointermedius of canine origin. *Acta Veterinaria Scandinavica,* 55 (37), 1-7. doi: 10.1186/1751-0147-55-37.

Куцик Р.В., Юрчишин А.И.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЭКСТРАКТА ПЛОДОВ ОЛЬХИ СЕРОЙ ALNUS INCANA L. MOENCH НА ТЕМПЫ ПРИОБРЕТЕНИЯ MLS-РЕЗИСТЕНТНОСТИ КОЖНЫМИ ИЗОЛЯТАМИ СТАФИЛОКОККОВ

Аннотация. *Возникновение резистентных штаммов микроорганизмов является естественным биологическим ответом на использование противомикробных препаратов, которые создают селективное давление, способствующее их отбору, выживанию и размножению. Цель проведенного исследования заключалась в изучении темпов приобретения резистентности кожными изолятами стафилококков к эритромицину и влияния на них суббактериостатичних концентраций экстракта плодов ольхи серой Alnus incana L. Формирование резистентности к эритромицину и влияние на ее темпы суббактериостатичних концентраций экстракта плодов ольхи серой (экстрагент 90% этанол) проводили в отношении штаммов S. epidermidis: чувствительного к макролидам, и с низким уровнем резистентности к 14 и 15-членных макролидам. Исследование проведено в течение 30 дней, путем многократных последовательных пассажей тест-штаммов стафилококков (концентрация 1х10^7 КОЕ/мл) в пробирки с МПБ и эритромицином в 3-х двукратных разведениях выше и ниже минимальной бактериостатической концентрации. Для статистической обработки результатов использовано одно и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и компьютерную программу Microsoft Office Excel 2011. У штамма S.epidermidis с низким уровнем резистентности к 14 и 15-членным макролидам наблюдалось быстрое нарастание резистентности к антибиотику от 32 до 1024 мкг/мл ($F = 34,2804$; $F > F_{крит\ max} = 5,9874$, $p = 0,0011$). В присутствии суббактериостатичних концентраций экстракта плодов ольхи серой (1/4 МБсК) исходная МБсК эритромицина снизилась в 32 раза и составила 1 мкг/мл ($F = 9,7497$; $F > F_{крит\ max} = 5,9874$, $p = 0,0205$). У чувствительного к макролидам штамма резистентности к эритромицину после 30 пассажей вызвать не удалось. Под влиянием селективного давления эритромицина штамм S.epidermidis с низким начальным уровнем MLS-резистентности быстро достигает резистентности высокого уровня. Биологически активные соединения экстракта плодов ольхи серой определенно тормозят процесс приобретения S.epidermidis резистентности к макролидам и исключают фенотипические признаки резистентности, свойственной материнскому штаму.*

Ключевые слова: *бактерии, устойчивость к антибиотикам, макролиды, ольха серая Alnus incana L.*

Kutsyk R.V., Yurchyshyn O.I.

STUDY OF ALNUS INCANA L. MOENCH FRUIT EXTRACT BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES INFLUENCE ON RESISTANCE DEVELOPMENT IN MLS-RESISTANT STAPHYLOCOCCI SKIN ISOLATES

Annotation. *The emergence of microorganisms resistant strains is a natural biological response to the use of antimicrobial drugs that creates selective pressure, contributing to pathogens selection, survival and reproduction. The purpose of the investigation was to study the resistance development of staphylococci skin isolates to erythromycin and influence on it Alnus incana L. fruit extract subinhibitory concentrations. Development of resistance to erythromycin and influence on it Alnus incana L. fruit extract (extraction by 90% ethanol) subinhibitory concentrations were conducted with S epidermidis strains: sensitive and resistant to 14 and 15-membered macrolides. The study was carried out within 30 days by multiple consecutive passages of staphylococci test strains (concentration 1x10^7 CFU/ml) into test tubes containing broth and erythromycin ranging from 3 doubling dilutions above to doubling dilutions below the minimum inhibitory concentration. Statistical analysis of the results was carried out by one-and two-factor analysis of variance (ANOVA) and Microsoft Office Excel 2011. Rapid increase of resistance from 32 to 1024 μg/ml ($F=34.2804$; $F > Fs_{tand.\ max} = 5.9874$; $p=0.0011$) for S.epidermidis with a low level of resistance to 14 and 15-membered macrolides resistance to the erythromycine was observed. In the presence of Alnus incana L. fruit extract subinhibitory concentrations (1/4 MIC), the initial MIC of erythromycin was decreased by 32 times to 1 ?g/ml ($F = 9.7497$; $F > F_{stand.\ max} = 5.9874$; $p = 0.0205$). The sensitive strain after 30 passages did not develop resistance to erythromycin. Under the influence of erythromycin selective pressure, S.epidermidis strain with low initial level of MLS-resistance rapidly reaches a high-level resistance. Biologically active substances of the Alnus incana L. fruit extract significantly inhibit the resistance development in S. epidermidis to macrolides and eliminate it phenotypic features.*

Keywords: *bacteria, resistance to antibiotics, macrolides, Alnus incana L.*