Учереждение образования
“Гомельский государственный областной лицей”

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В ОТНОШЕНИИ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И ЭКСТРЕМАЛЬНО-АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Тапальский Федор Дмитриевич

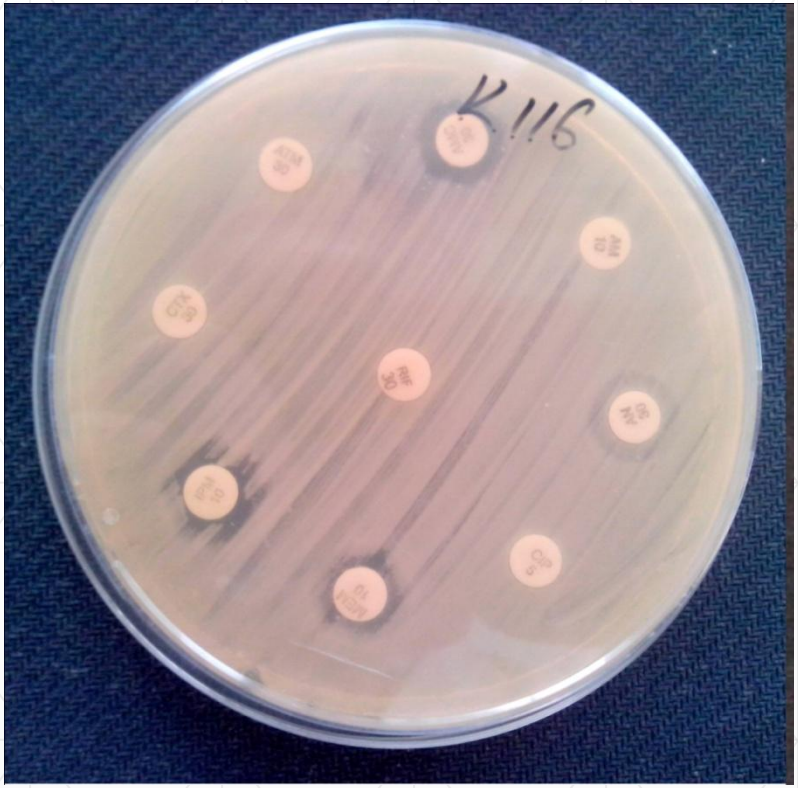
Научные руководители: Бисева Светлана Николаевна,
Тапальский Дмитрий Викторович

«ПОСТАНТИБИОТИЧЕСКАЯ ЭРА»

Открытие антибиотиков в середине XX века привело к значительному повышению качества услуг системы здравоохранения и способствовало общему улучшению состояния здоровья населения Земли.

Из-за стремительного распространения антибиотикорезистентности в настоящее время мир оказался на пороге появления бактериальных инфекций, для лечения которых не существует ни одного эффективного препарата.

- Во всем мире отмечается увеличение устойчивости патогенных для человека грамотрицательных бактерий к большинству антибактериальных препаратов с формированием экстремальной антибиотикорезистентности*.



Антибиотикочувствительность госпитального изолята Klebsiella pneumoniae К-116 (г. Гомель) – продуцента металло-бета-лактамазы NDM

- Важная проблема здравоохранения последнего десятилетия - формирование экстремальной антибиоткорезистентности среди энтеробактерий, связанное с продукцией метало-β-лактамазы NDM-1.

**Экстремально-антибиотикорезистентные микроорганизмы (XDR, extensively drug-resistant) – микроорганизмы, нечувствительные к препаратам всех за исключением 1-2 классов антибиотиков*

Панрезистентные микроорганизмы (PDR, pandrug-resistant) – микроорганизмы, нечувствительные ко всем антибиотикам всех классов

Clin Microbiol Infect. 2012 18(3):268-81

- В традиционной медицине на протяжении тысячелетий используются антибактериальные свойства различных растений
- В мире интенсивно изучается возможность применения фитотерапии для лечения инфекций, вызванных экстремально-антибиотикорезистентными бактериями.
- **Требуются экспериментальные данные об антибактериальной активности растений, произрастающих на территории Беларуси.**

Цель исследования

Дать количественную оценку антибактериальной активности доступных в Беларуси официнальных лекарственных растений в отношении грамотрицательных бактерий, экстремально-устойчивых к антибиотикам

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лекарственные растения, включенные в исследование

Лекарственные растения, включенные в исследование

№ п/п	Видовое название (русск.)	Видовое название (лат.)	Часть растения	Производитель
1	Багульник болотный	Ledum palustre	побеги	ООО «Падис'с», Беларусь
2	Береза белая	Betula alba	почки	ООО «НПК Биотест», Беларусь
3	Брусника обыкновенная	Vaccinium vitis-idaea	листья	ЗАО «БелАсептика», Беларусь
4	Дуб обыкновенный	Quercus robur	кора	ООО «НПК Биотест», Беларусь
5	Душица обыкновенная	Origanum vulgare	трава	ООО «Калина», Беларусь
6	Зверобой продырявленный	Hypericum perforatum	трава	ООО «НПК Биотест», Беларусь
7	Календула лекарственная	Calendula officinalis	цветки	ООО «Калина», Беларусь
8	Можжевельник обыкновенный	Juniperus communis	плоды	ООО «НПК Биотест», Беларусь
9	Мята перечная	Mentha piperita	листья	ООО «НПК Биотест», Беларусь
10	Подорожник большой	Plantago major	листья	ООО «НПК Биотест», Беларусь
11	Ромашка аптечная	Chamomilla recutita	цветки	ООО «НПК Биотест», Беларусь
12	Толокнянка обыкновенная	Arctostaphylos uva-ursi	листья	ООО «НПК Биотест», Беларусь
13	Тысячелистник обыкновенный	Achillea millefolium	трава	ООО «Падис'с», Беларусь
14	Хвощ полевой	Equisetum arvense	трава	ООО «НПК Биотест», Беларусь
15	Чабрец (тимьян ползучий)	Thymus serpyllum	трава	ООО «НПК Биотест», Беларусь
16	Шалфей лекарственный	Salvia officinalis	листья	ООО «НПК Биотест», Беларусь
17	Эвкалипт прутовидный	Eucalyptus viminalis	листья	ООО «Алтайфарм», Россия

Настои готовили путем 10-минутного кипячения на водяной бане сухого измельченного растительного сырья и дистиллированной воды в соотношении 1:10

охлаждали при температуре 24°С в течение 45 минут

процеживали через марлевый и бумажный фильтры

выполняли стерилизующую фильтрацию с помощью фильтров Filtropur S 0,45 (Sarstedt, Германия)

Настои из официнальных лекарственных растений

Экстремально-антибиотикорезистентные и антибиотикочувствительные микроорганизмы, отобранные для тестирования антибактериальной активности настоев из лекарственного сырья

Микроорганизм	Лаб. номер, место выделения	Фенотип антибиотикорезистентности *	Карбапенемаза
Pseudomonas aeruginosa	P-033 (г. Гомель)	FEP CAZ IMP MEM ATM CIP AN	MBL VIM
P.aeruginosa	P-147 (г. Гомель)	FEP CAZ IMP MEM ATM CIP AN	MBL VIM
P.aeruginosa	P-100 (г. Витебск)	0	нет
Acinetobacter baumannii	A-058 (г. Гомель)	SAM FEP CAZ IMP MEM CIP AN D	OXA-40
A.baumannii	A-105 (г. Могилев)	SAM FEP CAZ IMP MEM CIP AN D	OXA-40
A.baumannii	A-081 (г. Гомель)	0	нет
Klebsiella pneumoniae	K-70 (г. Минск)	AM AMC ATM CTX IMP MEM CIP AN	MBL NDM-1
K.pneumoniae	K-08 (г. Могилев)	AM AMC ATM CTX IMP MEM CIP AN	OXA-48
K.pneumoniae	K-074 (г. Минск)	0	нет
Eescherichia coli	ATCC 25922	0	нет

* AM – ампициллин, AMC - амоксициллин/клавуланат, ATM – азтреонам, CTX – цефотаксим, SAM - ампициллин/сульбактам, FEP – цефепим, CAZ – цефтазидим, IMP – имипенем, MEM – меропенем, CIP – ципрофлоксацин, AN – амикацин, D – доксициклин; «0» - чувствительность ко всем тестируемым антибактериальным препаратам.

Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) настоев из растительного сырья методом микроразведений

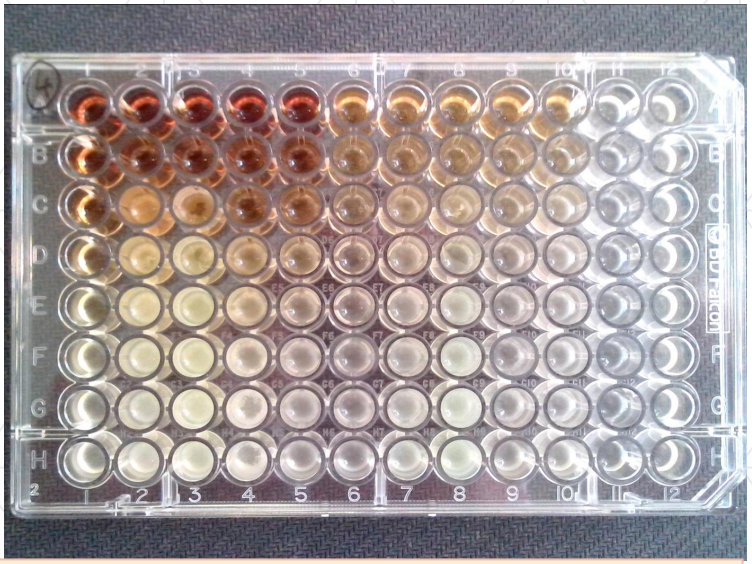
готовили двукратные серийные разведения настоев в бульоне Мюллера-Хинтона от 1:20 до 1:1280

из суточных культур тестируемых микроорганизмов готовили бактериальные суспензии с оптической плотностью 0,5 МакФарланд (10^8 КОЕ/мл)

по 1,5 мкл полученной суспензии вносили в лунки планшета, содержащие 150 мкл серийных разведений настоев лекарственных растений, конечная концентрация микроорганизмов - 10^6 КОЕ/мл

планшеты инкубировали в шейкере-термостате 18 ч - 35°С с постоянным низкоамплитудным встряхиванием

учет МПК проводили по отсутствию видимого роста микроорганизмов, сравнивая опытные и контрольные лунки со стерильной питательной средой



Определение МПК водных экстрактов чабреца (ячейки в рядах 1-5) и березы (ячейки в рядах 6-10)
ряды 1, 6 - E.coli ATCC 25922;
ряды 2, 7 – P.aeruginosa P-100;
ряды 3, 8 – P.aeruginosa P-033;
ряды 4, 9 – A.baumannii A-081;
ряды 5, 10 – A.baumannii A-105

Определение минимальных **бактерицидных** концентраций (МБК) настоев из растительного сырья

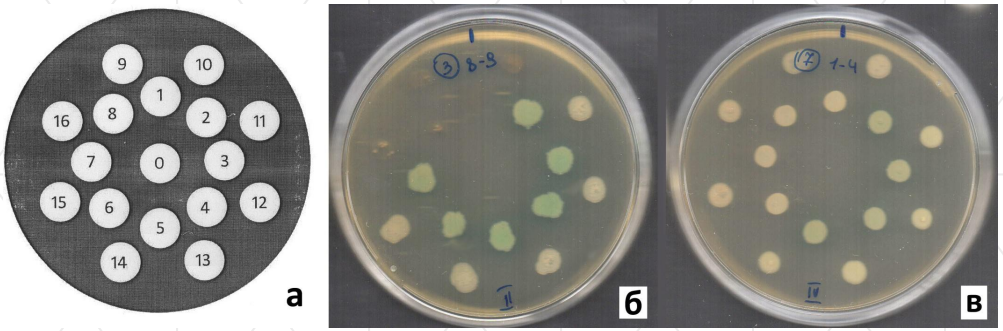
выполняли высев 10 мкл содержимого каждой лунки на сектор плотной питательной среды (ГРМ-агара)

инкубация 24 часа при 35°С

визуальная оценка рост микроорганизмов на ГРМ-агаре

минимальная концентрация, предотвращающая микробный рост, указывалась как МБК

значения МПК и МБК пересчитывались как концентрации густого экстракта, растворенного в питательной среде (мг/мл)

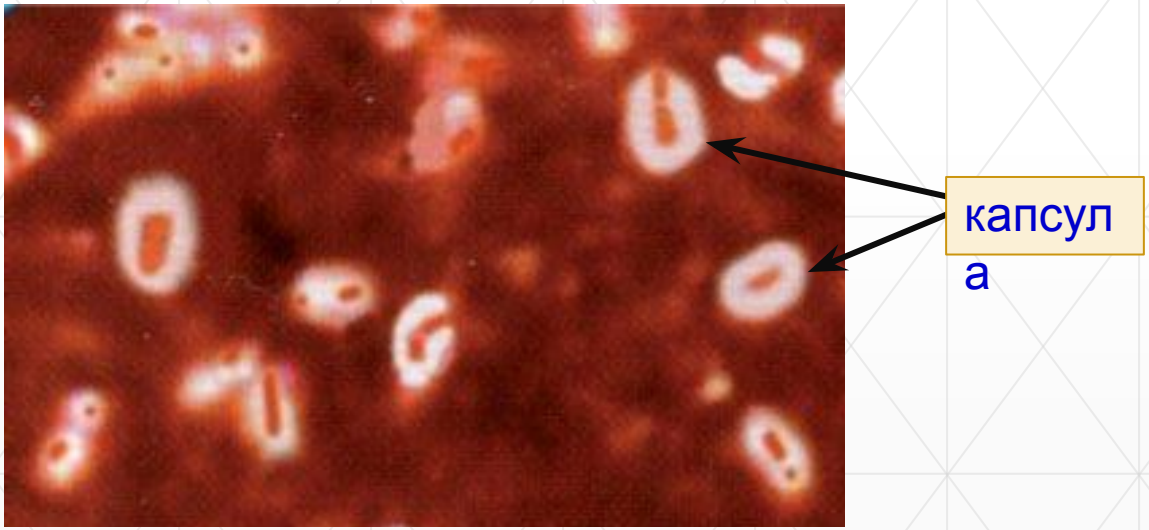


Определение минимальных бактерицидных концентраций для водных экстрактов лекарственных растений
а – шаблон для нанесения капель;
б – определение МБК водного экстракта коры дуба для P.aeruginosa P-100 (споты 1-8) и P.aeruginosa P-033 (споты 9-16);
в – определение МБК водного экстракта можжевельника для E.coli ATCC 25922
(споты 1-4), P.aeruginosa P-100 (споты 5-8), P.aeruginosa P-033 (споты 9-12), A.baumannii A-081 (споты 13-16)

Экстракты из лекарственного сырья считали обладающими антибактериальным действием при значениях **МПК ≤1 мг/мл**

РЕЗУЛЬТАТЫ

В тестируемых диапазонах концентраций ни один из включенных в исследование водных настоев не проявлял антибактериальной активности в отношении изолятов **K.pneumoniae**, что может быть связано с наличием у бактерий мощного слизистого полисахаридного капсульного слоя, затрудняющего проникновение активных бактерицидных компонентов к клеточной стенке микроба.



K.pneumoniae, окраска по Бурри-Гинсу

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) водных экстрактов из официнальных лекарственных растений в отношении экстремально-антибиотикорезистентных и антибиотикочувствительных изолятов грамотрицательных бактерий, мг/мл

	P.aeruginosa P-33 (MBL VIM)	P.aeruginosa P-147 (MBL VIM)	P.aeruginosa P-100	A.baumannii A-58 (OXA-40)	A.baumannii A-105 (OXA-40)	A.baumannii A-081	E.coli ATCC 25922
Багульник болотный	>5	>5	>5	2,5	2,5	2,5	2,5
Береза белая	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	1,25	1,25
Брусника обыкновенная	**0,75**	**0,75**	**1,5**	**0,75**	**0,75**	**0,38**	**0,38**
Дуб обыкновенный	**0,63**	**0,63**	1,25	1,25	1,25	1,25	**0,63**
Душица обыкновенная	>12	>12	>12	12	12	6	6
Зверобой продырявленный	>10	>10	>10	>10	>10	>10	10
Календула лекарственная	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
Можжевельник обыкновенный	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
Мята перечная	>15	>15	>15	15	15	7,5	7,5
Подорожник большой	>15	>15	>15	7,5	7,5	3,75	7,5
Ромашка аптечная	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
Толокнянка обыкновенная	6	6	12	**0,75**	**0,75**	**0,38**	**0,75**
Тысячелистник обыкновенный	>5	>5	>5	>5	>5	2,5	5
Хвощ полевой	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
Чабрец (тимьян ползучий)	5	5	5	2,5	2,5	2,5	2,5
Шалфей лекарственный	>12	>12	>12	12	12	12	12
Эвкалипт прутовидный	**0,75**	**0,75**	1,5	1,5	1,5	1,5	**0,38**

Минимальные бактерицидные концентнрации (МБК) водных экстрактов из официнальных лекарственных растений в отношении экстремально-антибиотикорезистентных и антибиотикочувствительных изолятов грамотрицательных бактерий, мг/мл

	P.aeruginosa P-33 (MBL VIM)	P.aeruginosa P-147 (MBL VIM)	P.aeruginosa P-100	A.baumannii A-58 (OXA-40)	A.baumannii A-105 (OXA-40)	A.baumannii A-081	E.coli ATCC 25922
Багульник болотный	>5	>5	>5	2,5	2,5	2,5	2,5
Береза белая	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	1,25
Брусника обыкновенная	1,5	1,5	3	**0,75**	1,5	**0,75**	**0,75**
Дуб обыкновенный	2,5	5	5	2,5	2,5	1,25	1,25
Душица обыкновенная	>12	>12	>12	12	6	6	6
Зверобой продырявленный	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Календула лекарственная	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
Можжевельник обыкновенный	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
Мята перечная	>15	>15	>15	15	15	7,5	7,5
Подорожник большой	>15	>15	>15	15	15	7,5	7,5
Ромашка аптечная	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
Толокнянка обыкновенная	6	12	12	**0,75**	**0,38**	**0,38**	**0,75**
Тысячелистник обыкновенный	>5	>5	>5	>5	>5	5	5
Хвощ полевой	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
Чабрец (тимьян ползучий)	5	5	5	5	5	2,5	2,5
Шалфей лекарственный	>12	>12	>12	12	12	12	12
Эвкалипт прутовидный	**0,75**	**0,75**	1,5	1,5	1,5	1,5	**0,75**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Некоторые виды растений, широко используемых в традиционной медицине Беларуси (**брусника обыкновенная, толокнянка обыкновенная, дуб обыкновенный**), проявляют выраженный бактерицидный эффект в отношении как антибиотикочувствительных, так и экстремально-антибиотикорезистентных изолятов грамотрицательных бактерий.

- Минимальные подавляющие концентрации водных настоев из растительного сырья в десятки и сотни раз превышают МПК антибиотиков для антибиотикочувствительных микроорганизмов.

- **В случае инфекций, вызванных экстремально-антибиотикорезистентными грамотрицательными микроорганизмами, можно рассматривать возможность местного использования растительных препаратов в дополнение к проводимой антибиотикотерапии.**

Спасибо за внимание!