

DOI: 10.21802/artm.2023.2.26.72
УДК 615.322+582.745+576.851.252+577.18

СИНЕРГІЧНА ВЗАЄМОДІЯ ЕКСТРАКТІВ РУТИ САДОВОЇ *RUTA GRAVEOLENS* L. З ЕРИТРОМІЦИНОМ ЩОДО ШКІРНИХ ІЗОЛЯТІВ MLS-РЕЗИСТЕНТНИХ СТАФІЛОКОКІВ

Н.В. Макевич, Р.В. Куцик

Івано-Франківський національний медичний університет,
кафедра мікробіології, вірусології та імунології, м. Івано-Франківськ, Україна,
ORCID ID: 0000-0002-5601-4765, e-mail: npavliuk@ifnmu.edu.ua;
ORCID ID: 0000-0001-9408-9074, e-mail: rkutsyk@ifnmu.edu.ua

Резюме. Мета. Дослідити синергічну взаємодію екстрактів рути садової з еритроміцином щодо шкірних ізолятів стафілококів з MLS-резистентністю.

Матеріали і методи. Дослідження синергізму 5 водно-етанольних екстрактів РС (екстрагенти – 40%, 50%, 70%, 90% та 96% етанол) з ЕРИ проводили на 11 клінічних штамів MLS-резистентних стафілококів. Фенотип MLS-резистентності визначали за допомогою дводискового методу. Мінімальну пригнічуючу концентрацію ЕРИ щодо досліджуваних штамів визначали методом двократних серійних розведень у бульйоні Мюллера–Хінтона. Достовірність синергічної взаємодії екстрактів РС з ЕРИ підтверджували методом титрувальної панелі з визначенням індексу FICI (Fractional Inhibition Concentration Index).

Результати. Методом мікродифузії в агар було встановлено, що суббактеріостатичні концентрації ЕРИ збільшували діаметри ЗЗР навколо лунок з усіма досліджуваними екстрактами у $50 \pm 1,3\%$ тест-штамів. Найкращі результати проявив 96% екстракт РС, який збільшував діаметри ЗЗР на $49,7-75,5\%$. 70% та 90% екстракти – збільшували діаметри ЗЗР на $32,4-48,3\%$ та $34,6-52,4\%$, відповідно.

Зниження МПК ЕРИ в присутності блокуаторів ефлюкських помп спостерігали у 2-4 рази в половині досліджуваних штамів, незалежно від фенотипу MLS-резистентності.

Екстракти РС на 90% та 96% етанолі проявили синергічну взаємодію з ЕРИ (FICI $0,49 \pm 0,42$ та $0,42 \pm 0,25$, відповідно). Екстракти на 40%, 50% та 70% етанолі характеризувались адитивною дією (FICI $0,72 \pm 0,47$, $0,63 \pm 0,24$ та $0,68 \pm 0,38$, відповідно).

Висновки. Отже, водно-етанольні екстракти РС проявляють здатність до 4-128-кратного зниження МПК ЕРИ у MLS-резистентних штамів стафілококів; екстракти на 90% та 96% етанолі володіють більш вираженими ЕРИ-потенціюючими властивостями, порівняно з екстрактами, виготовленими на 40%, 50% та 70% етанолі.

Ключові слова: рослинні екстракти, антибіотикорезистентність, синергізм, стафілококи.

Вступ. Результатом інтенсивної боротьби зі зростаючою кількістю бактеріальних інфекцій стало неконтрольоване використання антибіотиків, переважно широкого спектру дії. Це призвело до того, що бактерії стали ухилятися від дії антибактеріальних засобів шляхом формування резистентності.

Основні механізми розвитку стійкості мікроорганізмів до антибіотиків включають: продукцію ферментів інактивації, модифікацію мішеней до препаратів та зниження внутрішньоклітинної концентрації антибіотика за рахунок збільшення проникності мембрани або через гіперпродукцію ефлюкських помп. Особливої уваги заслуговує останній механізм, а саме – наявність у бактеріальній клітині ефлюкських помп, за допомогою яких антибіотик активно видаляється з неї. У свою чергу, для антибіотика це призводить до накопичення його субінгібуючих концентрацій в ділянці мішені зі створенням передумов для подальшого розвитку високого рівня резистентності [1].

MLS – резистентність (крос-резистентність до макролідів, споріднених до них лінкозамідів та стрептограміну V) поширена серед основних збудників шкірних захворювань *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus epidermidis* [2], оскільки макроліди є препаратами вибору в лікуванні піодермій.

У грам-позитивних бактерій набуття резистентності до макролідів може відбуватись трьома шляхами. Найбільш поширений механізм – шляхом метилювання молекули 23S rRNA, яка перешкоджає зв'язуванню рибосоми з антибіотиком. Дане метилювання опосередковується ферментами родини генів *erm* (найчастіше *ermA* та *ermC*). Другий механізм – інактивація молекули антибіотика спеціалізованими ферментами естеразами (*EreA*, *EreC*) і фосфотрансферазою (*mphC*). Третій механізм забезпечується активним викидом антибіотика з клітини за рахунок наявності двох класів ефлюкських помп: АТФ-залежної помпи ABC-класу (АТФ-Binding Cassette) *MsrA*, яка кодується плазмідним геном *msrA*, та протонних помп із надродини основних полегшуючих транспортерів (Major Facilitator Superfamily) *MefA* та *MefE* [3]. Існує достатньо обґрунтована гіпотеза, що компонент ефлюкської системи *MsrA* – білок ABC-F може виступати в якості протектора процесу трансляції на рибосомах, який інгібується макролідами [4]. Зазначені детермінанти можуть слугувати в якості потенційних мішеней впливу речовин, які визначаються як модифікатори антибіотикорезистентності (або ад'юванти антибіотиків). Модуляція механізмів набуття антибіотикорезистентності є трендовим напрямком сучасної хіміотерапії (як експериментальної, так і клінічної),

спрямованим на підвищення її ефективності. Зокрема, описано ряд природних сполук, здатних підвищувати чутливість стафілококів до макролідів, у тому числі, за рахунок блокування ефлюксної помпи MsrA [5].

Обґрунтування дослідження. Стрімке поширення стійкості до традиційних антибіотиків спонукає дослідників до пошуку нових речовин з протимікробною активністю. Високим антибактеріальним потенціалом володіють різні вторинні метаболіти рослинного походження, такі як: флавоноїди, алкалоїди, таніни, терпеноїди та компоненти ефірних олій [6].

Багато офіційних рослинних препаратів знайшли своє місце у лікуванні різноманітних захворювань, у тому числі й шкірних. У Німеччині спеціальна комісія контролює наявні рослинні препарати та їх застосування. До прикладу, такі рослини, як арніка гірська (*Arnica montana*), ромашка лікарська (*Matricaria chamomilla*), паслін солодко-гіркий (*Solanum dulcamara*) та пивні дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*) були затверджені комісією Commission E для топічного лікування запальних захворювань шкіри завдяки протизапальним та антибактеріальним властивостям. У країнах Азії є багатий тисячолітній досвід лікування травами, фармакологічні властивості яких сьогодні інтенсивно досліджуються найсучаснішими експериментальними методами. У США відсутня регуляція використання рослинних препаратів, оскільки вони вважаються дієтичними добавками [7].

Враховуючи велику територію, географічне розташування та різні кліматичні умови, флора України є досить різноманітною і включає в себе багато лікарських рослин. Зокрема, рута садова (*Ruta graveolens* L. завдяки своєму багатому хімічному складу володіє широким спектром активностей: протизапальними, антипіретичними, антибактеріальними, протигрибковими, смазмолітичними, гіпотензивними, діуретичними, жовчогінними та слабкими седативними, а також деякі літературні джерела вказують на наявність у трави РС протипухлинних властивостей [8, 9].

У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що водно-етанольні екстракти рути садової характеризуються відносно слабкою протимікробною активністю (активні протимікробні концентрації екстрактів становили 5500,0 - 687,5 мкг/мл, в залежності від екстрагенту), проте здатні потенціювати дію тетрацикліну щодо ТЕТ-резистентних штамів стафілококів з ефлюксным механізмом стійкості [10].

Мета дослідження: дослідити синергічну взаємодію екстрактів трави рути садової з еритроміцином щодо шкірних ізолятів стафілококів з MLS-резистентністю.

Матеріали і методи. Для дослідження було використано 5 водно-етанольних екстрактів рути садової (екстрагенти – 40%, 50%, 70%, 90% та 96% етанол). Виготовлення екстрактів трави РС проводили методом дробної мацерації з розділенням екстрагенту на частини, згідно з рекомендаціями Державної Фармакопеї України.

Дослідження антибіотикопотенціюючих властивостей досліджуваних екстрактів проводили на клінічних штамів мікроорганізмів. В якості тест-культури було використано 12 клінічних штамів стафілококів шкірного походження з різними ступенями

резистентності до еритроміцину. Бактеріальні культури ідентифікували на основі біохімічних мікротестів «STAPHYtest 16» (Lachema, Чехія), а також із урахуванням комплексу морфологічних і культуральних властивостей, згідно з рекомендаціями 9-го видання «Визначника бактерій Берджі».

Мінімальну пригнічуючу концентрацію (МПК) еритроміцину щодо досліджуваних штамів стафілококів вивчали методом двократних серійних розведень у бульйоні Мюллера-Хінтона (МХ). Інтенсивність росту тест-культур у лунках полістиролових планшет оцінювали за зміною оптичної густини середовища при довжині хвилі 495 нм (OD₄₉₅). Вимірювання проводили кожні 2 години впродовж 24 годин інкубації при температурі 37°C у герметичній камері із достатнім рівнем вологості за допомогою багато режимного спектрофотометра Synergy™HTX S1LFTA (BioTek Instruments, Inc., США). Найбільше розведення антибіотика, при якому спостерігалась повна відсутність росту тест-штамів, приймалась за мінімальну пригнічуючу концентрацію (МПК).

Встановлення MLS-резистентності (макроліди, лінкозаміди та стрептограмін В) проводили диско-дифузійним методом, згідно з рекомендаціями EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Чутливість проводили до 6 антибіотиків: еритроміцину (ЕРІ, 15 мкг/диск), кларитроміцину (КТМ, 15 мкг/диск), рокситроміцину (РКМ, 30 мкг/диск), спіраміцину (СП, 30 мкг/диск), лінкомицину (ЛН, 15 мкг/диск) та кліндаміцину (КЛІ, 2 мкг/диск). Для встановлення індуцибельного чи конститутивного фенотипу резистентності використовували дводисковий (ЕРІ-КЛІ) метод, відомий з іноземних джерел як D-test, при якому диски з еритроміцином та кліндаміцином розташовують на відстані 12-20 мм один від одного. Наявність D-подібної зони навколо диска з кліндаміцином, індукованої еритроміцином, визначає наявність індуцибельного механізму резистентності [2].

Для фенотипової ідентифікації ефлюксного механізму резистентності використали резерпін та арсенат калію, які, за даними літературних джерел, можуть виступати блокаторами ефлюкських помп [11].

Для скринінгового аналізу про потенційну здатність до синергічної взаємодії екстрактів РС з еритроміцином щодо шкірних ізолятів стафілококів був використаний метод мікродифузії в агар [12]. Штами, у яких спостерігалось збільшення діаметрів зон затримки росту навколо лунок, у які вносили екстракти, на чашках з суббактеріостатичними концентраціями ЕРІ, порівнюючи з контрольними посівами (МПА без антибіотика), були відібрані для встановлення достовірності результатів, отриманих методом титрувальної панелі («checkerboard titration»). Даний метод дозволяє вивчити характер росту тест-штамів під впливом взаємодії двох досліджуваних речовин.

Оцінку характеру взаємодії досліджуваних екстрактів РС з еритроміцином проводили з визначенням індексу FIC (Fractional Inhibition Concentration Index), значення якого рахували за формулою:

$$FICI = \frac{MB_{ск}(E + EPI)}{MB_{ск}E} + \frac{MB_{ск}(EPI + E)}{MB_{ск}EPI}$$

де: МБсК (Е+ЕРИ) – мінімальна бактеріостатична концентрація екстракту в комбінації з ЕРИ; МБсК (ЕРИ+Е) – мінімальна бактеріостатична концентрація ЕРИ в комбінації з екстрактом. Результати оцінювали за значенням індексу: $FICI \leq 0,5$ – синергічна взаємодія; $0,5 < FICI < 1$ – сумарна (адитивна) дія; взаємодія; $1 < FICI < 4$ – відсутність достовірної взаємодії; $FICI > 4$ – антагоністичний ефект [13].

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерних програм Gene5 та Microsoft Office Excel 2007 з використанням методів варіаційної статистики, одно- і двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA).

Результати дослідження. На основі даних про чутливість до 6-ти антибіотиків MLS-групи диско-дифузійним методом, а також результатів дводискового тесту встановлено, що досліджувані тест-штами стафілококів характеризувалися різними фенотипами MLS-резистентності: 6 штамів проявили повну резистентність до антибіотиків MLS-групи (МПК ЕРИ 500-8000 мкг/мл), 4 штами виявилися стійкими до ЕРИ без індукції резистентності на кліндаміцин (МПК ЕРИ 62,5-250 мкг/мл) та 2 штами були резистентні до ЕРИ з індукцією на кліндаміцин (МПК ЕРИ 8000-4000 мкг/мл).

Якісним методом мікродифузії в агар було встановлено, що суббактеріостатичні концентрації еритроміцину збільшували діаметри ЗЗР навколо лунок з всіма досліджуваними екстрактами у $50 \pm 1,3\%$ тест-штамів. Діаметри зон затримки росту під дією суббактеріостатичних концентрацій ЕРИ та екстрактів РС становив $9,77 \pm 0,54$ - $12,74 \pm 0,2$ мм. Найкращі результати проявив 96% екстракт РС, який збільшував діаметри ЗЗР на $49,7$ - $75,5\%$ ($p < 0,05$). Навколо лунок з 70% та 90% екстрактами діаметри ЗЗР збільшувались на $32,4$ - $48,3\%$ ($p < 0,05$) та $34,6$ - $52,4\%$ ($p < 0,05$), відповідно.

Штами, для яких була запідозрена синергічна взаємодія еритроміцину та екстрактів РС, були використані для подальшого дослідження методом титрувальної панелі. Порівнювали характер росту культур стафілококів у рядах з двократними серійними розведеннями ЕРИ у бульйоні МХ у присутності суббактеріостатичних концентрацій екстрактів РС та відомих інгібіторів ефлюксоної помпи MsrA.

При використанні суббактеріостатичних концентрацій ЕРИ або екстрактів РС (1/4, 1/8, та 1/16 МПК) окремо, характер росту досліджуваних культур MLS-резистентних стафілококів відповідав росту культур у контрольних лунках (засіяний бульйон МХ без антибіотика та екстрактів РС).

Для верифікації ефлюксоного механізму резистентності проводили визначення чутливості тест-штамів до ЕРИ у присутності резерпіну (20 мкг/мл) та арсенату калію (в суббактеріостатичній концентрації – 1/2 МПК). Протимікробні концентрації арсенату калію для кожного досліджуваного штаму визначали за допомогою методу двократних серійних розведень у бульйоні МХ. МПК арсенату калію становила 250-500 мкг/мл. Зниження МПК ЕРИ в присутності резерпіну та арсенату калію в 2-4 рази спостерігали в чотирьох штамів з повною резистентністю до антибіотиків MLS-групи, удвічі – в одного штаму з конститутивним

механізмом резистентності та в одного штаму з індукційним фенотипом MLS-резистентності (табл. 1). Результати аналізу фенотипових маркерів резистентності до ЕРИ вказують на те, що в половини (6 із 12) тест-штамів стафілококів спостерігається поєднання різних механізмів. У решти 6 штамів стафілококів ми взагалі не спостерігали зниження МПК ЕРИ ні в присутності резерпіну, ні в присутності арсенату калію.

Серед досліджених ізолятів стафілококів виділяється штам *S.epidermidis* 03, у якого арсенат калію (інгібітор синтезу АТФ, що є енергетичним субстратом помпи MsrA) зумовлює 4-кратне зниження МПК ЕРИ. Разом з тим, достатньо високий рівень залишкової резистентності до ЕРИ в присутності арсенату свідчить про подвійну природу механізму резистентності даного штаму. Виявлена залишкова резистентність (не чутлива до дії арсенату) у штаму *S.epidermidis* 03 та інших протестованих ізолятів, швидше за все, пов'язана з продукцією модифікуючого мішені макролідів фермента – рРНК-метилази. Слабке зниження МПК ЕРИ в присутності резерпіну пояснюється тим, що останній є неспецифічним інгібітором помпи MsrA і проявляє на неї слабкий блокуючий вплив. Таким чином, на основі одержаних результатів можна стверджувати, що резистентність до ЕРИ штаму *S.epidermidis* 03 частково зумовлюється мембранною ефлюксоною помпою MsrA.

Синергічну взаємодію з ЕРИ щодо найбільшої кількості штамів, незалежно від фенотипу MLS-резистентності, проявили 90% та 96% екстракти РС (кратність зниження МПК ЕРИ у 4-128 разів). У штаму *S.epidermidis* 19 з фенотипом Neg MLS-резистентності спостерігалось зниження МПК ЕРИ навіть до терапевтичних концентрацій (0,125 – 4,0 мкг/мл). Найменшу антибіотикопотенціюючу здатність проявили 40% та 50% екстракти РС, під впливом яких МПК ЕРИ зменшувалась у 2-32 та 2-64 рази, відповідно (табл. 2).

В цілому, зниження МПК ЕРИ в присутності 90% та 96% екстрактів РС зареєстровано у $41,7 \pm 4,1\%$ штамів з досліджуваної вибірки, у присутності 70% екстракту РС – у $33,3 \pm 3,9\%$ штамів та у присутності 40% та 50% екстрактів РС – у $25,0 \pm 3,6\%$ штамів. Синергізм відсутній у $50 \pm 4,2\%$ досліджуваних штамів, незалежно від фенотипу MLS-резистентності (у 2 штамів з фенотипом R, у 3 штамів з фенотипом Neg та у одного штаму з фенотипом D).

Оцінку результатів взаємодії досліджуваних екстрактів з еритроміцином методом титрувальної панелі проводили за значенням індексу FICI. Синергічній взаємодії відповідає значення індексу $FICI \leq 0,5$. Екстракти РС на 90% та 96% етанолі проявили синергізм з ЕРИ (середні значення $FICI$ $0,49 \pm 0,42$ та $0,42 \pm 0,25$, відповідно; $p < 0,05$). Екстракти на 40%, 50% та 70% етанолі в цілому характеризувались адитивною дією (середні значення $FICI$ $0,72 \pm 0,47$, $0,63 \pm 0,24$ та $0,68 \pm 0,38$, відповідно; $p < 0,05$) (табл. 3). Проте для штамів стафілококів, які продемонстрували найбільші кратності зниження МПК ЕРИ, значення індексу $FICI \leq 0,5$ (синергічна взаємодія) отримані і для екстрактів РС на 40%, 50% та 70% етанолі.

Таблиця 1

Зміни чутливості тест-штамів стафілококів до еритроміцину в присутності резерпіну та арсенату калію

	Тест-штами	Фенотип MLS- резистентності	МПК ЕРИ, мкг/мл	ЕРИ+резерпін (20 мкг/мл)		ЕРИ+арсенат калію (1/2 МПК)	
				МПК ЕРИ+ резерпін, мкг/мл	Кратність зниження МПК ЕРИ	МПК ЕРИ+арсенат калію, мкг/мл	Кратність зниження МПК ЕРИ
1.	<i>S.epidermidis</i> 18	R	250	250	1	250	1
2.	<i>S.epidermidis</i> 07	R	500	250	2	250	2
3.	<i>S.epidermidis</i> 03	R	500	250	2	125	4
4.	<i>S.epidermidis</i> 120	R	1000	1000	1	1000	1
5.	<i>S.epidermidis</i> 101	R	4000	2000	2	2000	2
6.	<i>S.epidermidis</i> 119	R	8000	8000	1	4000	2
7.	<i>S.epidermidis</i> 19	Neg	62,5	31,25	2	31,25	2
8.	<i>S.epidermidis</i> 14	Neg	250	250	1	250	1
9.	<i>S.epidermidis</i> 10	Neg	125	125	1	125	1
10.	<i>S.epidermidis</i> 01	Neg	125	125	1	125	1
11.	<i>S.epidermidis</i> 213	D	4000	4000	1	4000	1
12.	<i>S.aureus</i> 23	D	8000	4000	2	4000	2

Примітки: R – повна резистентність до антибіотиків MLS-групи;

Neg – штами резистентні до 14-членних макролідів без індукції резистентності на лінкозаміди;

D – штами резистентні до 14-членних макролідів з індукцією резистентності на лінкозаміди.

Таблиця 2

Кратність зниження МПК ЕРИ щодо штамів стафілококів з різними фенотипами MLS-резистентності в присутності 1/4 МПК екстрактів РС

№	Штами	МПК ЕРИ, мкг/мл	Фенотип MLS- резистен- тності	МПК _{ЕРИ+} 1/4 МПК _Е , мкг/мл					Кратність зниження МПК ЕРИ				
				Екстракти РС					Екстракти РС				
				40%	50%	70%	90%	96%	40%	50%	70%	90%	96%
1.	<i>S.epidermidis</i> 19	62,5	Neg	2	0,5	0,13	0,25	0,5	32	64	256	128	64
2.	<i>S.epidermidis</i> 119	8000	R	8000	4000	4000	4000	4000	1	2	2	2	2
3.	<i>S.epidermidis</i> 03	500	R	62,5	250	31,25	31,25	62,5	8	2	16	16	8
4.	<i>S.epidermidis</i> 07	500	R	250	125	125	125	125	2	4	4	4	4
5.	<i>S.epidermidis</i> 101	4000	R	250	125	500	125	125	16	32	8	8	8
6.	<i>S.aureus</i> 23	8000	D	4000	4000	4000	1000	1000	2	2	2	8	8

Слід зазначити, що синергічна взаємодія еритроміцину та суббактеріостатичних концентрацій (1/4, 1/8, 1/16 МПК) екстрактів РС щодо досліджуваних шкірних ізолятів стафілококів мала дозозалежний характер (рис. 1). На основі двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) підтверджено достовірність впливу концентрації екстракту РС на 70% етанолі ($F=6,9812$; $F>F_{\text{крит.}}=2,8916$; $p=0,000917$) на

інтенсивність росту культури *S. Epidermidis* 03 в присутності ЕРИ в діапазоні концентрацій 0,25÷500 мкг/мл. Водночас, нами не встановлено достовірного впливу концентрації етанолу в екстрагуючому розчині ($F=0,6369$; $F<F_{\text{крит.}}=2,3828$; $p=0,6724$) на ступінь прояву ЕРИ-потенціюючої здатності екстрактів РС (рис. 2).

Таблиця 3

Значення FICI комбінацій суббактеріостатичних концентрацій еритроміцину та екстрактів рути садової

№	Штами	Фенотип MLS- резистентності	Екстракти рути садової				
			40%	50%	70%	90%	96%
1.	<i>S.epidermidis</i> 19	Neg	0,53	0,5	0,5	0,25	0,25
2.	<i>S.epidermidis</i> 119	R	1,5	1,0	1,0	0,75	0,75
3.	<i>S.epidermidis</i> 03	R	0,25	0,625	0,185	0,185	0,25
4.	<i>S.epidermidis</i> 07	R	0,75	0,75	1,25	1,25	0,75
5.	<i>S.epidermidis</i> 101	R	0,31	0,28	0,62	0,28	0,28
6.	<i>S.aureus</i> 23	D	1,0	0,625	0,56	0,25	0,25
	Середнє значення		0,72±0,47	0,63±0,24	0,68±0,38	0,49±0,42	0,42±0,25

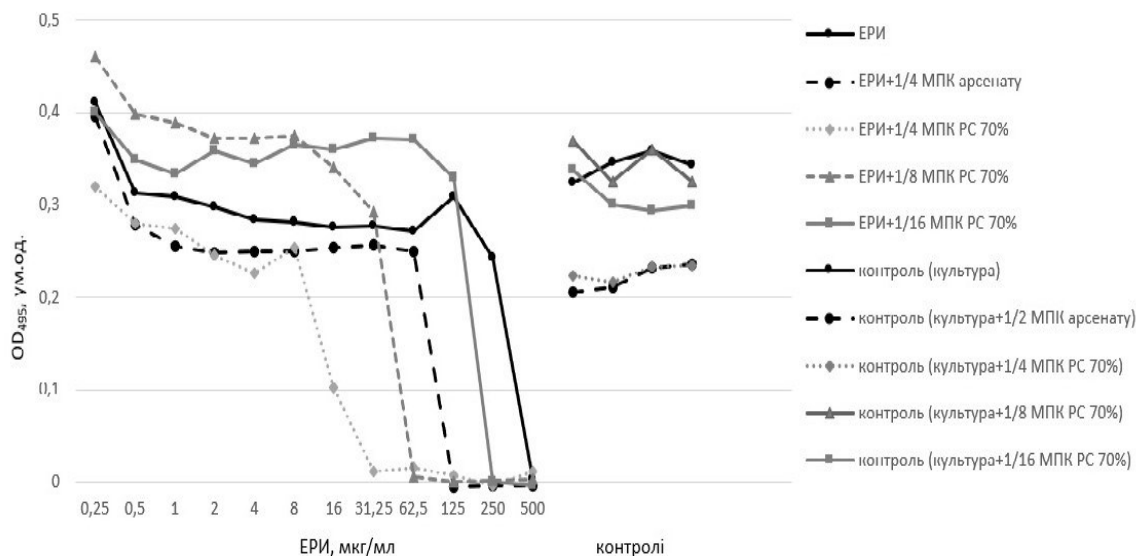


Рис. 1. Ріст тест-штаму *S. epidermidis* 03 (R-тип MLS-резистентності) у присутності еритроміцину та суббактеріостатичних (1/4, 1/8, 1/16) концентрацій 70% екстракту рути садової (час інкубації 24 год).

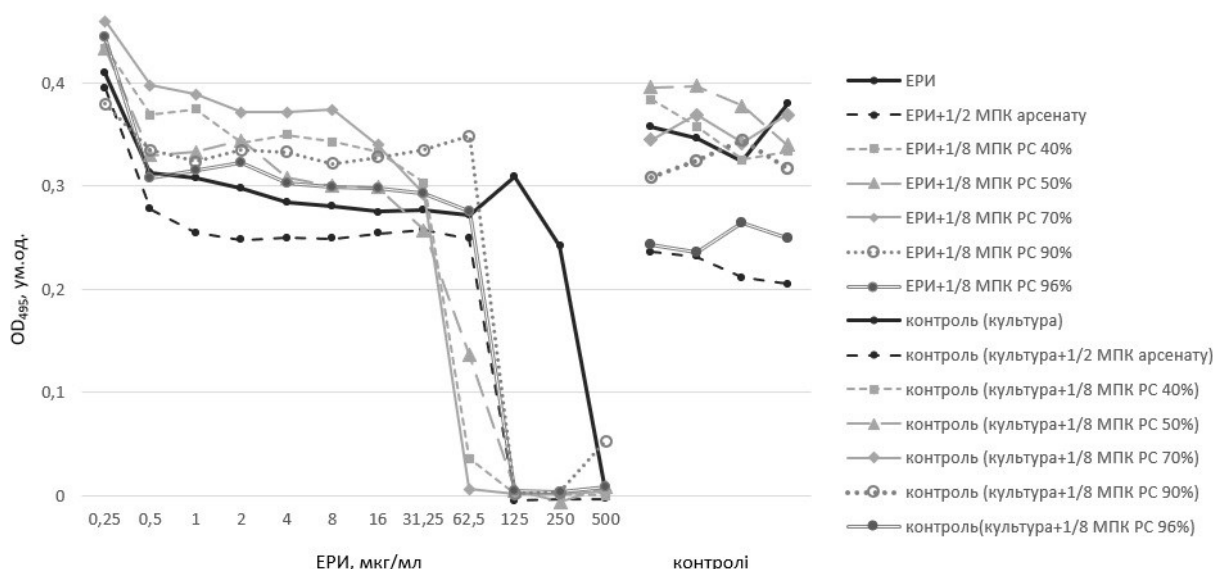
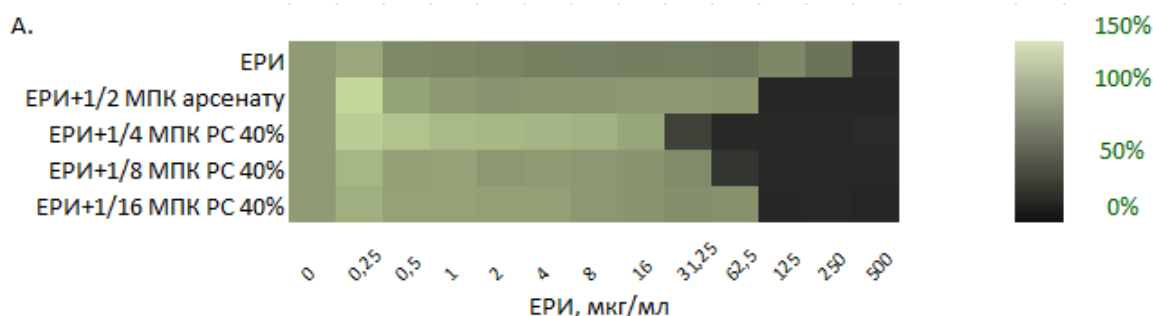


Рис. 2. Ріст тест-штаму *S. epidermidis* 03 (R-тип MLS-резистентності) у присутності еритроміцину та 1/8 МПК екстрактів рути садової (час інкубації 24 год).

Для наглядної візуалізації великого масиву експериментальних даних нами застосовано технологію діаграми теплових карт (heat maps). Інтенсивність росту культур у присутності еритроміцину та суббактеріостатичних концентрацій екстрактів РС оцінювалася за зміною оптичної щільності (OD_{495})

поживного середовища після культивування протягом 24 годин при температурі 37°C та представлена як відсоток від контролю (ріст на середовищі без антибіотика та суббактеріостатичних концентрацій зразків екстрактів) (рис. 3).



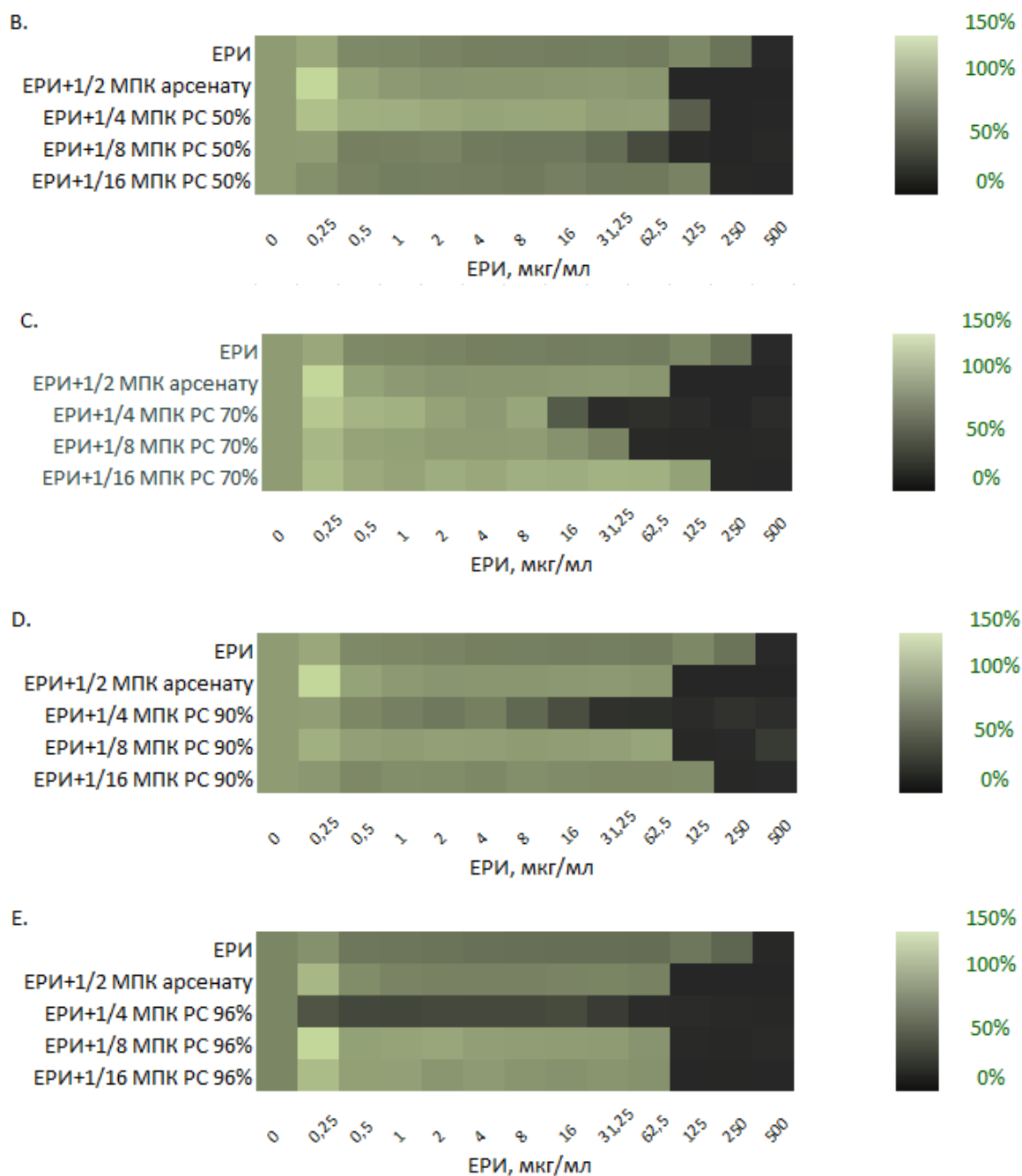


Рис. 3. Інтенсивність росту культури *S. Epidermidis* 03 (R-тип MLS-резистентності) у присутності еритромицину та суббактеріостатичних концентрацій 40% (А), 50% (В), 70% (С), 90% (D) та 96% (Е) екстрактів РС визначався зміною оптичної щільності (OD) поживного середовища після 24 год. культивування при температурі 37°C, представлена як відсоток від контролю (ріст на середовищі без антибіотика та суббактеріостатичних концентрацій зразків екстрактів). Дані представлені у вигляді теплових карт (heat maps). Дані є середніми значеннями результатів технічних дублікатів з одного експерименту, що є репрезентативним для двох біологічних повторів.

Обговорення результатів. Попри наявність різних механізмів антибіотикорезистентності у мікроорганізмів важливу, а можливо й основну роль у набуванні цієї стійкості відіграє саме наявність ефлюксних pomp. Механізм активного ефлюксу може також бути задіяний в якості пускового механізму, який ініціює зниження проникності клітинної мембрани, ферментативну інактивацію препарату, модифікацію його мішені, процесу формування біоплівки та системи відчуття кворуму (Quorum sensing) [14]. Тому виявлення інгібіторів цих pomp є перспективною стратегією, що

може відновити чутливість до антибактеріальних агентів, які є їх субстратами [15]. Найбільш вивченою у цьому відношенні є протонна помпа NorA стафілококів, яка забезпечує їх резистентність до фторхінолонів і ряду структурно не схожих з ними катіонних сполук – берберину, левоміцетину, бромистого етидію, бензалконіуму хлориду, родаміну, акрифлавіну та ін. Описано значну кількість інгібіторів цієї помпи, що є сполуками природного (рослинного) походження, напівсинтетичними та синтетичними структурами [1, 16]. Водночас значно менше уваги дослідників

сфокусовано на вивченні можливостей модифікації чутливості стафілококів до макролідів і блокування їх ефлюксу зокрема.

Резистентність стафілококів як основних збудників шкірних захворювань до макролідів, що є препаратами вибору у лікуванні піодермій, має важливе практичне значення. Вона, як правило, поширюється на споріднені з макролідами лінкозаміди та стрептограмін В, і тому отримала назву MLS-резистентність. В її основі лежить декілька генетичних механізмів, які можуть поєднуватися між собою і, відповідно, зумовлюють різні фенотипові прояви. Основні фенотипи MLS-резистентності диференціюються за допомогою дводискового або тридискового тестів. За даними генетичного аналізу (ПЛР) стафілококів з індуктивними фенотипами продемонстровано наявність генів MLS-резистентності *ermA* у фенотипу D та *ermC* (у поєднанні з геном *ermA*, або без нього) у фенотипу D⁺ [17]. Стафілококи з R-фенотипом MLS-резистентності володіють повними наборами генів рибосомального типу резистентності *ermA*, *ermB* та *ermC* у поєднанні з геном плазмідного походження *mrsA*, що кодує мембранну АТФ-залежну помпу MsrA [17]. Фенотип Neg властивий для стафілококів (головним чином коагулазо-негативних) з класичним конститутивним типом резистентності лише до 14-членних макролідів і забезпечується виключно ефлюксним механізмом плазмідного походження (*mrsA*). Інші ефлюксні помпи макролідів – MefA та MefE властиві в основному стрептококам, а для стафілококів є рідкісними, хоча вони описані і у *S. aureus*, і в коагулазо-негативних стафілококів [18].

АТФ-залежна мембранна помпа MsrA, що належить до родини ABC-транспортерів, є основною детермінантою ефлюксу макролідів у стафілококів. Вона забезпечує активний викид з бактеріальної клітини 14-членних макролідів та стрептограміну В [19]. Функціональними інгібіторами помпи MsrA є інгібітори синтезу АТФ – арсенати, динітрофенол, протонатор м-хлорфенілгідрозону карбонілціанід [4]. Водночас резерпін, що є ефективним інгібітором протонних ефлюксних pomp (зокрема помпи NorA), мало впливає на функціональну активність помпи MsrA. У зв'язку із недоступністю глибокого генетичного аналізу клінічних ізолятів стафілококів нами здійснено спробу виявлення цього ефлюксного механізму резистентності за допомогою фенотипового та функціонального підходів. Особливу увагу було зосереджено на штамів стафілококів з R- та Neg-фенотипами MLS-резистентності. Нами встановлено, що у 4 із 6 використаних у дослідженні штамів *S. epidermidis* з R-фенотипом спостерігалася 2-4 кратне зниження МПК ЕРИ в присутності специфічного інгібітора помпи MsrA арсенату калію. Це дозволяє припускати поєднання ефлюксного та рибосомального механізмів MLS-резистентності у даних штамів. Аналогічні досліди з резерпіном (який здійснює на помпу MsrA слабкий неспецифічний вплив) дали малопоказові результати. Проте, індивідуальні реакції штамів на арсенат і резерпін, як правило, співпадали. На наш погляд, це є вагомим підтвердженням функціонування у них ефлюксу макролідів. Водночас, досить несподіваною виявилася відповідь як на арсенат, так і на резерпін більшості штамів *S. epidermidis* з

Neg-фенотипом MLS-резистентності. Всупереч очікуванню, у 3 із 4 протестованих штамів змін МПК ЕРИ в присутності згаданих інгібіторів помпи MsrA зареєстровано не було. У цих 3 штамів *S. epidermidis* з Neg-фенотипом зміни чутливості до ЕРИ під впливом суббактеріостатичних концентрацій екстрактів РС не спостерігалася. Такий результат може вказувати на цілковиту відсутність ефлюксу макролідів у даних штамів. Проте, не можна виключати можливість функціонування у них інших типів ефлюксних pomp, взагалі не чутливих ні до арсенату, ні до резерпіну. Адже в літературі трапляються повідомлення про виявлення у стафілококів ефлюксних pomp макролідів MefA і MefE [18], функціональні інгібітори яких поки що не описані.

В ході проведених нами досліджень встановлено, що водно-етанольні екстракти рути садової *Ruta graveolens* L. проявляють здатність до 4-128-кратного зниження МПК ЕРИ у MLS-резистентних штамів *S. epidermidis* та *S. aureus*. Екстракти на 90% та 96% етанолі володіють більш вираженими ЕРИ-потенціуючими властивостями, порівняно з екстрактами, виготовленими на 40%, 50% та 70% етанолі. В цілому, можна констатувати факт, що синергічна взаємодія еритроміцину з екстрактами РС проявляється на тих штамів стафілококів, у яких має місце навіть мінімальне зниження МПК ЕРИ в присутності блокувальних ефлюксної помпи – арсенату калію і резерпіну. І навпаки, для тих штамів, у яких не спостерігалася зниження МПК ЕРИ в присутності відомих блокувальних синергізму еритроміцину з екстрактами РС, не встановлено. Одержані експериментальні дані дають можливість висловити припущення про присутність в екстрактах РС сполук, здатних блокувати MsrA-опосередкований ефлюкс макролідів із клітин стафілококів.

Перспективи подальших досліджень. Припущення про присутність в екстрактах РС інгібіторів ефлюксної помпи стафілококів MsrA потребує підтвердження на штамів стафілококів з генетично ідентифікованою цією детермінантою резистентності. Важливо також виконати біоавтографічне виявлення діючих компонентів екстрактів РС та встановити їх хімічну природу.

Висновки:

1. Водно-етанольні екстракти рути садової *Ruta graveolens* L. проявляють здатність до 4-128-кратного зниження МПК ЕРИ у MLS-резистентних штамів *S. epidermidis* та *S. aureus*.
2. Синергічна взаємодія еритроміцину з екстрактами РС проявляється на штамів стафілококів з ефлюксним і комбінованим механізмом MLS-резистентності.
3. Екстракти рути садової на 90% та 96% етанолі володіють більш вираженими ЕРИ-потенціуючими властивостями, порівняно з екстрактами, виготовленими на 40%, 50% та 70% етанолі.
4. Жоден екстракт рути садової не проявив антагоністичної взаємодії з еритроміцином.

References:

1. Handzlik J, Matys A, Kieć-Kononowicz K. Recent Advances in Multi-Drug Resistance (MDR) Efflux Pump Inhibitors of Gram-Positive Bacteria *S. aureus*.

- Antibiotics (Basel). 2013 Feb 5; 2(1):28-45. DOI: 10.3390/antibiotics2010028.
2. Petinaki E, Papagiannitsis C. Resistance of Staphylococci to Macrolides-Lincosamides- Streptogramins B (MLS_B): Epidemiology and Mechanisms of Resistance. *Staphylococcus Aureus* [Internet]. IntechOpen. 2018. 144 p. DOI: 10.5772/intechopen.75192
 3. Fyfe C, Grossman TH, Kerstein K, Sutcliffe J. Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Oct 3; 6(10):a025395. DOI: 10.1101/cshperspect.a025395.
 4. Sharkey LK, Edwards TA, O'Neill AJ. ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. *mBio*. 2016 Mar 22; 7(2):e01975. DOI: 10.1128/mBio.01975-15.
 5. Seuкеp AJ, Kuete V, Nahar L, Sarker SD, Guo M. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. *J Pharm Anal*. 2020; 10(4):277-290. DOI: 10.1016/j.jpha.2019.11.002
 6. Savoia D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol*. 2012 Aug; 7(8):979-90. DOI: 10.2217/fmb.12.68.
 7. Bedi MK, Shenefelt PD. Herbal therapy in dermatology. *Arch Dermatol*. 2002 Feb; 138(2):232-42. DOI: 10.1001/archderm.138.2.232.
 8. Orlanda JFF, Nascimento AR. Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. *South African Journal of Botany*. 2015 Jul; 99:103-6. DOI: 10.1016/j.sajb.2015.03.198.
 9. Loonat F, Amabeoku GJ. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities of the leaf methanol extract of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) in mice and rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2014 Apr 3; 11(3):173-81. DOI: 10.4314/ajtcam.v11i3.25.
 10. Pavliuk NV, Kutsyk RV. Synerhizm protymikrobnoi dii ekstraktiv ruty sadovoi *Ruta graveolens* L. z tetratsyklinom vidnosno *Staphylococcus epidermidis*. In: Brovin OV, editor. Mikrobiolohichni chytannia pamiati profesora Yurii Leonidovycha Volianskoho: materialy naukovo-praktychnoi konferentsii. Kharkiv. Kharkiv: Kharkiv. med. akad. pisladyplom. osvity MOZ Ukrainy. 2020 Liutyi 12. P. 54-5.
 11. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol*. 1990; 4(7):1207-14. DOI:10.1111/j.1365-2958.1990.tb00696.x
 12. Yurchyshyn OI. Vychennia protymikrobnoi aktyvnosti ekstraktiv likarskykh roslyn vidnosno shkirnykh izoliativ stafilocokiv – zbudnykiv piodermii z riznymi mekhanizmamy MLS-rezystentnosti. *Prykarpatskyi visnyk NTSh. Puls*. 2017; 8:148-62. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Pvntsh_pul_2017_8_19
 13. Van Vuuren S, Viljoen A. Plant-based antimicrobial studies--methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Med*. 2011 Jul; 77(11):1168-82. DOI: 10.1055/s-0030-1250736.
 14. Spengler G, Kincses A, Gajdacs M, Amaral L. New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules*. 2017 Mar 15; 22(3):468. DOI: 10.3390/molecules22030468.
 15. Poole K, Lomovskaya O. Can efflux inhibitors really counter resistance? *Drug Discov. Today: Therapeutic Strategies*. 2006 Jun; 3:145-52. DOI: 10.1016/j.ddtec.2006.06.011
 16. Zhang L, Ma S. Efflux pump inhibitors: a strategy to combat P-glycoprotein and the NorA multidrug resistance pump. *ChemMedChem*. 2010 Jun 7; 5(6):811-22. DOI: 10.1002/cmde.201000006.
 17. Steward CD, Raney PM, Morrell AK, Williams PP, McDougal LK, Jevitt L, et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2005 Apr; 43(4):1716-21. DOI: 10.1128/JCM.43.4.1716-1721.2005.
 18. Jeric PE, Azpiroz A, Lopardo H, Centron D. Survey of molecular determinants in Gram-positive cocci isolated from hospital settings in Argentina. *J Infect Dev Ctries*. 2007 Dec 1; 1(3):275-83.
 19. Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008 Jun; 72(2):317-64. DOI: 10.1128/MMBR.00031-07.

UDC 615.322+582.745+576.851.252+577.18

SYNERGISTIC EFFECTS OF *RUTA GRAVEOLENS* L. EXTRACTS WITH ERYTHROMYCIN AGAINST SKIN ISOLATES OF MLS-RESISTANT STAPHYLOCOCCI

N.V. Makevych, R.V. Kutsyk

*Ivano-Frankivsk National Medical University,
Department of Microbiology, Virology and Immunology,
Ivano-Frankivsk, Ukraine,
ORCID ID: 0000-0002-5601-4765,
e-mail: npavliuk@ifnmu.edu.ua;
ORCID ID: 0000-0001-9408-9074,
e-mail: rkutsyk@ifnmu.edu.ua*

Abstract. The aim: to research the synergistic interaction of garden ruta ethanolic extracts with erythromycin against skin isolates of MLS-resistant staphylococci.

Materials and methods. The study of the synergistic interaction of 5 water-ethanol extracts of the garden ruta herb (extractants - 40%, 50%, 70%, 90% and 96% ethanol) with erythromycin was performed on 11 clinical strains of skin isolates of MLS-resistant staphylococci. Determination of MLS-resistance was carried out by the disc-diffusion method. MIC of erythromycin of staphylococcal strains was determined by the method of two-fold serial dilutions in Muller-Hinton broth. A screening analysis of the potential ability for synergistic interaction of ruta herb extracts with erythromycin was carried out by the method of microdiffusion in agar. The validity of the synergistic interaction of the studied ruta herb extracts with erythromycin was confirmed by the checkerboard assay with the calculation of the Fractional Inhibition Concentration Index (FICI).

Results. Using the qualitative method of microdiffusion in agar, it was established that subbacteriostatic concentrations of erythromycin increased the diameters of

the zones of inhibition of the bacterial growth around the wells with all the studied extracts in $50 \pm 1.3\%$ of the test strains. The best results were shown by the 96% extract of ruta herb, which increased the diameters of zones by 49.7-75.5%. Around the wells with 70% and 90% extracts, the diameters of zones increased by 32.4-48.3% and 34.6-52.4%, respectively. A decrease in MIC of erythromycin in the presence of efflux pump blockers - reserpine and potassium arsenate was observed in 2-4 times at four strains with R-phenotype, twice - at one strain with Neg-phenotype and one strain with D-phenotype of MLS-resistance. 90% and 96% ruta herb extracts showed a synergistic interaction with erythromycin among the largest number of researched strains, regardless phenotype of MLS-resistance (4-128-fold decrease in MIC of ERY). The least antibiotic potentiating ability was shown by 40% and 50% ruta herb extracts, under the influence of which the MIC of erythromycin decreased by 2-32 and 2-64 times, respectively.

Ruta herb extracts in 90% and 96% ethanol showed a synergistic interaction with erythromycin (average FICI values 0.49 ± 0.42 and 0.42 ± 0.25 , respectively). Extracts in 40%, 50% and 70% ethanol were generally

characterized by an additive effect (FICI values of 0.72 ± 0.47 , 0.63 ± 0.24 and 0.68 ± 0.38 , respectively). It should be noticed, that the synergistic interaction of erythromycin and subbacteriostatic concentrations (1/4, 1/8, 1/16 IPC) of ethanolic ruta herb extracts against the studied skin isolates of MLS-resistant staphylococci had a dose-dependent nature ($F=6,9812$; $F > F_{crit.} = 2,8916$; $p=0,000917$).

Conclusions. Therefore, water-ethanol extracts of garden ruta herb demonstrate the ability to 4-128-fold reduction of MIC of erythromycin in MLS-resistant strains of *S. epidermidis* and *S. aureus*; extracts on 90% and 96% ethanol have more pronounced erythromycin-potentiating properties compared to extracts made on 40%, 50% and 70% ethanol. The synergistic interaction of erythromycin with ruta herb extracts was manifested on staphylococcal strains with efflux and combined mechanisms of MLS-resistance. The obtained experimental data suggest the presence of compounds in the garden ruta extracts which are capable of blocking the MrsA-mediated efflux of macrolides from staphylococcal cells.

Keywords: plant extracts, antibiotic resistance, synergism, staphylococci.

Стаття надійшла в редакцію 25.03.2023 р.

Стаття прийнята до друку 28.05.2023 р.