

На правах рукописи

Маруф Разан

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ
РАСТЕНИЙ НА ПОЛИРЕЗИСТЕНТНЫЕ УРОПАТОГЕННЫЕ E. COLI**

1.5.11 Микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства образования Российской Федерации, медицинский институт, кафедра микробиологии им. В.С. Киктенко.

Научный руководитель: Ермолаев Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии им. В.С. Киктенко Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН).

Официальные оппоненты:

Воропаева Елена Александровна, доктор биологических наук, доцент, руководитель отдела медицинской биотехнологии, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Жуховицкий Владимир Григорьевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО «РМАНПО» МЗ РФ.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Защита диссертации состоится 23.04.2025 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.010 в ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства образования Российской Федерации по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Макля, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г.Москва, ул. Миклухо-Макля, д.6).

Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайтах:

<https://www.rudn.ru/science/dissovet> и <http://vak.minobrnauki.gov.ru>

Автореферат разослан « ___ » ____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета ПДС 0300.010

кандидат медицинских наук, доцент

Подопригора Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) являются распространенной глобальной проблемой и представляют собой серьезные медицинские, экономические и социальные проблемы. Основной причиной обострения ИМП является быстрое появление устойчивых к антибиотикам уропатогенных штаммов. Эта устойчивость во многом обусловлена чрезмерным и частым использованием антибиотиков без должного контроля, что позволило бактериям выработать устойчивость к этим препаратам. Вследствие этого, варианты лечения пациентов во многих тяжелых случаях становятся крайне ограниченными или вовсе отсутствуют (Lodhia et al., 2020; Negus et al., 2020).

Уропатогенная *Escherichia coli* (УПЭК) является наиболее частой причиной ИМП (Kot, 2019). УПЭК способны вызывать инфекции в мочевыводящих путях с помощью сложного многоступенчатого механизма, который опирается на различные факторы вирулентности. Тяжесть инфекций, вызванных УПЭК, может варьировать от легкого цистита до более серьезных состояний, таких как нефрит и бактериемия (Asadi Karam et al., 2019; Wiles et al., 2008). В последние годы в мире возросла распространенность множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) среди штаммов УПЭК, и ситуация продолжает ухудшаться. В России масштабы этой проблемы также представляют серьезную угрозу для общественного здравоохранения. Значительная часть изолятов УПЭК была идентифицирована как МЛУ (Walker et al., 2016).

Из-за сложностей и высокой стоимости разработки новых антибиотиков в последние десятилетия во всем мире наблюдается значимая тенденция к поиску альтернативных методов лечения бактериальных инфекций и преодоления их устойчивости. Наиболее перспективными альтернативами антибиотикам являются вакцины, пробиотики, бактериофаги, наночастицы и фитохимические вещества (Terlizzi et al., 2017; Zalewska-Piątek and Piątek, 2019). Лекарственные растения стали высокоэффективными и перспективными источниками препаратов для альтернативного лечения. Они привлекли значительное внимание в последние десятилетия благодаря положительным результатам в борьбе с микробными патогенами различной этиологии (Khameneh et al., 2019). Считается, что растительные соединения в меньшей степени провоцируют развитие устойчивости у бактерий благодаря их способности одновременно воздействовать на множественные участки бактериальной клетки, что усложняет выработку механизмов устойчивости у последних (Álvarez-Martínez et al., 2021, 2020).

Лекарственные растения содержат широкий спектр веществ, обладающих доказанной эффективностью в качестве противобактериальных средств. К наиболее важным из этих соединений относятся алкалоиды, органические серные соединения, фенольные кислоты, флавоноиды, дубильные вещества, кумарины и терпеноиды. Научные эксперименты показали, что эти фитохимические вещества могут напрямую влиять на различные процессы жизнедеятельности бактерий и подавлять их. Кроме того, они способны проявлять синергетический эффект с традиционными антибиотиками, восстанавливая чувствительность бактерий к ранее неэффективным препаратам (Khameneh et al., 2019). Благодаря таким обнадеживающим открытиям использование лекарственных растений представляет собой перспективное направление в лечении ИМП.

Лекарственные растения находят новые применения в борьбе с инфекционными заболеваниями благодаря технологии, известной как “зеленый синтез наночастиц”. Эта технология использует растительные соединения для восстановления ионов металлов, а также в качестве стабилизаторов и регуляторов формы наночастиц. В качестве противобактериального агента, особое внимание привлекают препараты на основе наночастиц серебра (AgNPs) из-за их эффективности и низкой стоимости. Этот инновационный метод является экономичным, экологически безопасным и эффективным в борьбе как с грамположительными, так и с грамотрицательными бактериями (Dakal et al., 2016; Lee and Jun, 2019).

Таким образом, значимость данного исследования заключается в изучении антибактериального эффекта лекарственных растений по отношению к полирезистентным штаммам УПЭК. Еще одним важным аспектом данного исследования является использование растительных экстрактов в качестве восстановителей и стабилизаторов при синтезе AgNPs, а также оценка их эффективности в качестве антибактериального агента.

Степень разработанности темы

В последние годы растет интерес к изучению эффективности лекарственных растений в отношении широкого спектра патогенов. Однако, несмотря на тщательный поиск по базам данных ScienceDirect и PubMed, а также по поисковой системе Google Scholar в начале исследования в 2019 г., нами не было найдено исследований, посвященных антибактериальному действию сумаха или заатара по отношению к УПЭК. Кроме того, было проведено несколько исследований по антибактериальной активности гвоздики по отношению к УПЭК, но в них использовалось только эфирное масло или коричный альдегид.

В целом, все исследованные нами растения либо мало изучены, либо вообще не изучались на предмет их эффективности по отношению к УПЭК. Необходимо отметить, что антибактериальная активность AgNPs, полученных из гвоздики, заатара, крапивы, лимонной вербены и зеленого чая, по отношению к УПЭК также ранее не исследовалась. Более того, AgNPs из заатара ранее не синтезировались.

Синергетическое действие гвоздики, сумаха и антибиотиков также не было широко изучено. В частности, только одно исследование было посвящено синергическому антибактериальному действию комбинации гвоздики и сумаха.

В последние годы *Galleria mellonella* приобрела все большую популярность в качестве модели *in vivo*. Однако до сих пор существует ограниченное количество исследований, в которых эта модель использовалась для оценки токсичности экстрактов растений и патогенности УПЭК.

Цель исследования

Изучение антибактериального действия растительных экстрактов на штаммы УПЭК *in vitro* и *in vivo*, а также синтез AgNPs с использованием растительных экстрактов и тестирование их антибактериальной активности на УПЭК.

Задачи исследования

1. Определить профиль чувствительности к антибиотикам тестируемых штаммов и их индекс множественной устойчивости к антибиотикам (MAR-индекс) и выявить МЛУ.
2. Приготовить водно-спиртовые растительные экстракты и определить их минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) и минимальную бактерицидную концентрацию (МБК).
3. Изучить способность УПЭК вырабатывать устойчивость к растительным экстрактам и способность растительных экстрактов изменять чувствительность бактерий к антибиотикам после длительного воздействия экстрактов.
4. Изучить влияние растительных экстрактов на свойства УПЭК (адгезию, агглютинацию, морфологию и целостность клеточных мембран) и исследовать синергию между растительными экстрактами и традиционными антибиотиками, а также между самими экстрактами.
5. Синтезировать AgNPs с использованием водных растительных экстрактов и протестировать их антибактериальную активность на УПЭК.
6. Использовать модель *G. mellonella* для исследования *in vivo* токсичности растительных экстрактов и их способности ослаблять патогенность УПЭК.

Научная новизна

1. Впервые был исследован антибактериальный эффект экстрактов растений сумаха и заатара по отношению к УПЭК.
2. Было оценено антибактериальное действие водно-спиртового экстракта гвоздики по отношению к УПЭК, которое ранее не изучалось в этом контексте.
3. Впервые изучен синергетический эффект гвоздики, сумаха и антибиотиков по отношению к УПЭК и выявлено, что экстракты гвоздики и сумаха могут проявлять синергетический антибактериальный эффект в их сочетании с нитрофурантоином или друг с другом по отношению к УПЭК.
4. Впервые была изучена антибактериальная активность AgNPs, изготовленных из различных растительных экстрактов (гвоздики, заатара, крапивы, лимонной вербены и зеленого чая) по отношению к УПЭК. AgNPs из заатара впервые были синтезированы.
5. Впервые использована модель личинок *Galleria mellonella* для исследования токсичности экстракта сумаха и его способности снижать патогенность УПЭК.

Теоретическая и практическая значимость работы

Учитывая постоянно растущую устойчивость патогенных бактерий к антибиотикам, лекарственные растения представляются очень перспективной стратегией в борьбе с этой проблемой. Разработка антибактериальных средств из лекарственных растений является крайне выгодным подходом с точки зрения экономической эффективности и экологической безопасности. При этом, включение лекарственных растений в рацион питания может служить профилактической мерой в отношении ИМП, а также их можно использовать в качестве легкодоступных пищевых добавок. Данное исследование продемонстрировало антибактериальные свойства трех лекарственных растений – сумаха, гвоздики и заатара – по отношению к устойчивым к антибиотикам штаммам УПЭК, а также их влияние на различные биологические процессы и свойства бактериальных клеток. Кроме того, нами была обнаружена выраженная противoadгезивная активность сумаха по отношению к УПЭК. Результаты работы могут служить основой более комплексных исследований, направленных на выявление активных антибактериальных веществ и изучение специфических механизмов их действия, обуславливающих антибактериальную активность этих растений.

Кроме того, было продемонстрировано синергетическое действие сумаха и гвоздики с нитрофурантоином, а также друг с другом. Это открывает перспективы для разработки комбинированной терапии, направленной на воздействие на несколько мишеней в

бактериальной клетке и снижение риска возникновения устойчивости бактерий к соответствующим препаратам.

Методология диссертационного исследования

Предмет исследования — штаммы УПЭК.

Объекты исследования — антибактериальная активность экстрактов растений по отношению к УПЭК.

Для достижения цели исследования был выбран комплексный методологический подход, объединяющий микробиологические, микроскопические и биотехнологические методы. Полученные в ходе экспериментов результаты были обработаны с использованием современных статистических методов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эффективные антибактериальные свойства в отношении МЛУ-УПЭК были выявлены у водно-спиртовых экстрактов сумаха, гвоздики и заатара. МИК и МБК этих экстрактов составляют 3.125-50 мг/мл, при этом сумах проявляет наибольшую эффективность, а гвоздика и заатар следуют за ним. Все эти растения демонстрируют бактерицидные свойства в отношении УПЭК. Оценка токсичности экстракта сумаха в личинках *G. mellonella* показывает что он безопасен и нетоксичен (LD50=9.10 г/кг).
2. Ингибирование маннозочувствительной агглютинации УПЭК с *S. cerevisiae* экстрактами сумаха, гвоздики и заатара свидетельствует о подавлении активности фимбрий 1-го типа. Гвоздика оказывает наиболее выраженное ингибирующее действие на лектины УПЭК, подавляя также агглютинацию с ДПГ *C. albicans*.
3. Ингибирование гемагглютинации УПЭК с эритроцитами человека и значительное подавление адгезии УПЭК к полистирольным поверхностям достигаются при воздействии экстракта сумаха.
4. Переход бактериальных клеток УПЭК в нестабильную L-форму был вызван экстрактами гвоздики, сумаха и заатара в различных процентах (до 99% с экстрактом гвоздики). Сумах также вызывает значительное удлинение и филаментацию у одного штамма УПЭК.
5. Синергетический антибактериальный эффект в отношении МЛУ-УПЭК был выявлен при воздействии экстрактов гвоздики и сумаха в сочетании с нитрофурантоином или друг с другом. Комбинация антибиотиков (ципрофлоксацин или нитрофурантоин) с экстрактами растений (гвоздика или сумах) или только растительных экстрактов (гвоздика и сумах) привела к снижению МИК всех агентов по отношению к УПЭК.

Степень достоверности полученных результатов

Обоснованность научных положений и выводов обеспечивается объемом проведенных исследований, использованием современных методов, адекватных поставленным задачам, и применением методов статистической обработки данных.

Апробация работы

Тема диссертационного исследования «ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ НА ПОЛИРЕЗИСТЕНТНЫЕ УРОПАТОГЕННЫЕ E. COLI» обсуждена и утверждена на заседании Ученого совета медицинского факультета ФГАОУ ВО РУДН 20 февраля 2020 года, протокол №8.

Материалы и результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на Российских научно-практических конференциях: ежегодный всероссийский конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И.Покровского (г. Москва, март 2023 года); XIV International scientific conference #SCIENCE4HEALTH (г. Москва, 14 – 15 апрель 2023 года); XV International scientific conference #SCIENCE4HEALTH (г. Москва, 25 – 26 апрель 2024 года).

Материалы диссертационного исследования были доложены и представлены к апробации на кафедре микробиологии им. В. С. Киктенко МИ РУДН. Работа рекомендована к защите (Протокол заседания кафедры микробиологии им. В. С. Киктенко ФГАОУ ВО РУДН от 31.08.2023 г. № 1).

Личный вклад автора

В ходе выполнения диссертационной работы автором был проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. На основе анализа сформулированы цели и задачи исследования, а также разработан дизайн исследования. Автором самостоятельно разработаны протоколы исследования и подготовлены материалы для статистической обработки полученных данных. Автором самостоятельно был осуществлен сбор, обработка и интерпретация полученных данных. На основе проведенного исследования автором подготовлены и опубликованы научные статьи.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности: 1.5.11. Микробиология п.7 «Свойства отдельных видов микроорганизмов, как патогенных, так и населяющих организм человека, а также видов, используемых в качестве пробиотиков и продуцентов биотехнологических продуктов.» п.11 «Закономерности биосинтеза

антибактериальных субстанций бактериального происхождения (антибиотики и бактериоцины), молекулярные механизмы чувствительности бактерий к антибиотикам, методы фенотипического и генотипического исследования механизмов лекарственной устойчивости, фундаментальные основы их преодоления.».

Публикации по теме диссертации

В рамках диссертации опубликовано 7 научных работ, 2 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и РУДН, 4 статьи в журналах из перечня международной базы цитирования (WoS и Scopus), и 1 в материалах конференций.

Объем и структура диссертации.

Диссертация представлена на 137 страницах машинописного текста, содержит 18 рисунков и 10 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения собственных исследований, заключения, выводов, списка принятых сокращений и списка литературы. Список литературы включает 251 источник.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследовательская работа проводилась с 2019 по 2023 гг. в бактериологической лаборатории кафедры микробиологии им. В. С. Киктенко МИ РУДН.

Объектом исследования являлись полирезистентные штаммы УПЭК. В качестве контрольного штамма был использован референсный штамм *Escherichia coli* ATCC 25922, а дрожжеподобные грибы (ДПГ) *Candida albicans* ATCC 10321 применялись в реакции агглютинации. Все микроорганизмы были получены из коллекции бактериологической лаборатории кафедры микробиологии им. В. С. Киктенко МИ РУДН, г. Москва.

Первоначально антибактериальная активность растений исследовалась путем тестирования их водных экстрактов по отношению к устойчивому штамму УПЭК. Тесту были подвергнуты двадцать растений: лавровый лист, черный тмин, цикорий, гвоздика, брусника, фенугрек, садовая шалфейка, имбирь, иссоп, вербена лимонная, кукуруза, нальта джут, гранат, розмарин, мята перечная, сумах, майоран сладкий, куркума, йерба-мате и заатар. Растения, продемонстрировавшие эффективность в ингибировании роста бактерий, были отобраны для дальнейшего приготовления водно-спиртовых экстрактов и оценки их антибактериальной активности.

В рамках исследования были применены различные методы *in vitro* для оценки антибактериальной активности отобранных на первом этапе экстрактов. Эти методы

включали определение МИК и МБК, изучение влияния экстрактов на некоторые жизненно важные процессы, такие как адгезия и агглютинация с дрожжами и эритроцитами, а также морфологические изменения и целостность клеточной мембраны. Кроме того, было исследовано синергическое действие экстрактов с двумя антибиотиками, а также между самими экстрактами. Используя модель *Galleria mellonella*, была изучена токсичность экстракта сумаха и его антибактериальная активность по отношению к УПЭК. Заключительный этап исследования заключался в синтезе AgNPs методом зеленого синтеза с использованием пяти растений и тестировании их антибактериальной активности.

Дизайн диссертационного исследования

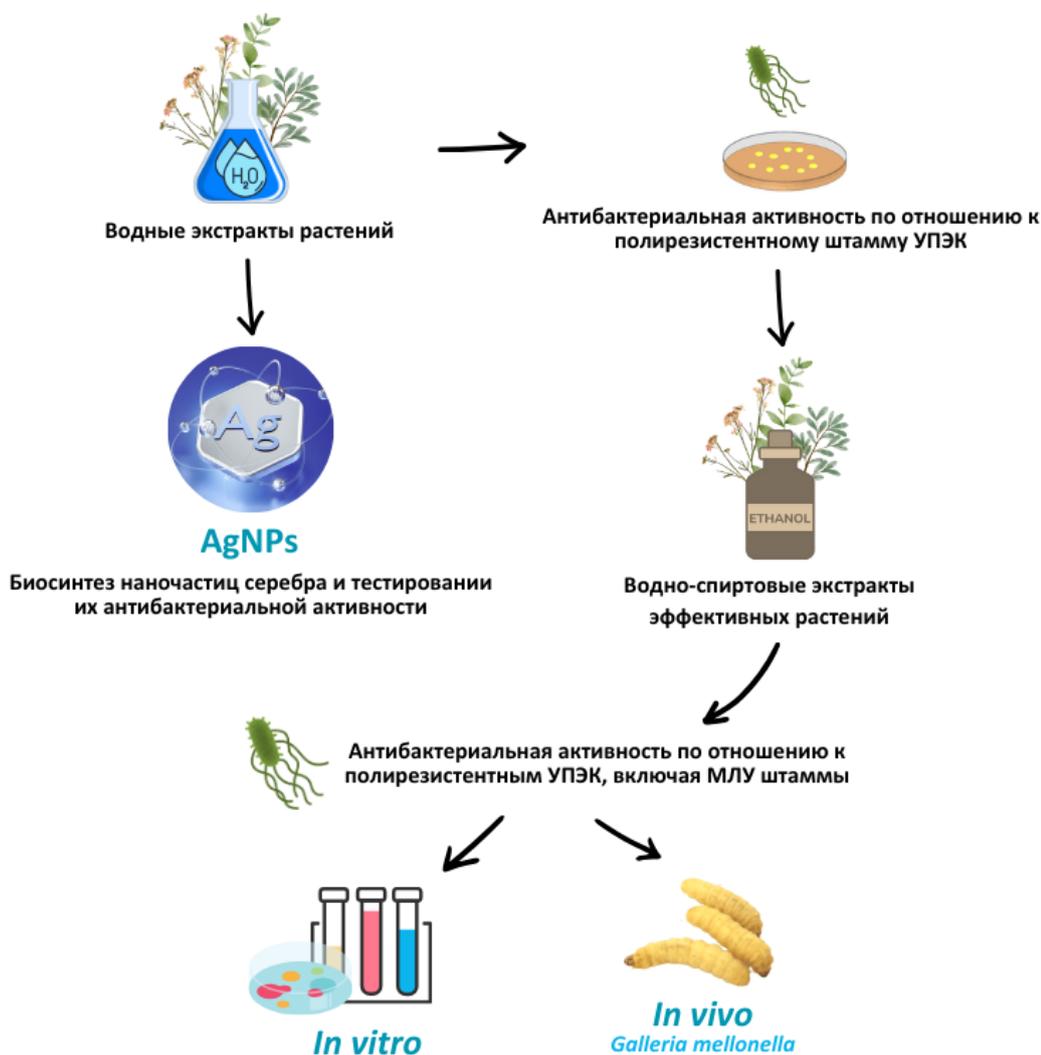


Рисунок 1. Краткий дизайн диссертационного исследования.

Статистическая обработка данных

Для анализа данных, расчета средних значений, стандартных отклонений (SD) и построения гистограмм использовали программу Excel 2019. Для сравнения полученных

данных применяли t-критерий Стьюдента с уровнем значимости $p < 0.05$, указывающим на статистически значимую разницу. Для оценки синергизма использовали аддитивную модель Лоэве и дополнительно подтверждали его путем расчета баллов синергизма с использованием HSA, Bliss и ZIP моделей с помощью веб-приложения SynergyFinder+. Для анализа результатов исследования токсичности использовали пробит-анализ, выполненный с помощью программы XLSTAT 2023. Для сравнения выживаемости личинок применяли анализ кривых выживаемости по методу Каплана-Майера, выполненный с помощью статистического программного обеспечения MedCalc® версии 22.021. Программа построила кривые выживаемости и использовала логранговый тест (logrank test) для сравнения кривых и определения наличия статистически значимой разницы в выживаемости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Профиль чувствительности к антибиотикам (антибиотикограмма)

В данном исследовании определяли чувствительность штаммов УПЭК к 8 антибиотикам. Среди общего числа из 8 штаммов наибольшая устойчивость наблюдалась к ампициллину (5 штаммов), тогда как наибольшая чувствительность – к имипенему (7 штаммов) и ципрофлоксацину (6 штаммов). Тетрациклины, цефтазидим/клавулановая кислота, цефтазидим и триметоприм проявляли эффективность по отношению к 5 штаммам. Однако ни один из испытанных антибиотиков не действовал на все штаммы.

Дальше определили MAR-индекс. Четыре штамма были идентифицированы с множественной устойчивостью к антибиотикам; один из них проявлял устойчивость ко всем тестируемым антибиотикам (MAR-индекс = 1), а 3 MAR-индекса выше 0.2 (0.75; 0.625; 0.375). Все штаммы, которые были идентифицированы с множественной устойчивостью к антибиотикам также являются МЛУ, что составляет 50% от общего числа исследованных штаммов.

2. Первичный антибактериальный скрининг водных растительных экстрактов

Результаты показали, что из 20 исследованных растений заметное ингибирование роста штамма УПЭК наблюдалось только у гвоздики, сумаха и заатара. Гвоздика и сумах продемонстрировали полное ингибирование роста бактерий по сравнению с контролем, в то время как заатар ингибировал его на $52 \pm 4.2\%$. В связи с этим данные три растения были выбраны для дальнейшего изучения с использованием их водно-спиртовых экстрактов с использованием 80% этанолом.

3. Антибактериальный скрининг водно-спиртовых экстрактов растений *in vitro*

3.1. Диффузионный метод в агаровых лунках

Таблица 1. Диффузионный метод в агаровых лунках: диаметры зон задержки роста штаммов *E. coli* действием экстракта сумаха.

Штамм	Экстракт сумаха (мг/мл)		
	50	100	200
УПЭК 1	8 ± 0.7*	12 ± 0.1	14 ± 0.5
УПЭК 2	9 ± 0.9	12 ± 0.0	14 ± 0.3
УПЭК 3	9 ± 1.1	12 ± 0.4	15 ± 0.0
УПЭК 4	8 ± 0.5	13 ± 0.8	14 ± 0.0
УПЭК 5	8 ± 0.3	11 ± 0.1	15 ± 0.2
УПЭК 6	8 ± 0.0	10 ± 0.0	14 ± 0.3
УПЭК 7	7 ± 1.5	10 ± 0.2	13 ± 0.0
УПЭК 8	8 ± 0.2	12 ± 0.1	14 ± 0.0
АТСС 25922	17 ± 0.0	19 ± 0.4	23 ± 0.2

* Диаметр зоны задержки роста в мм, представлено как среднее значение 3 повторных испытаний ± SD.

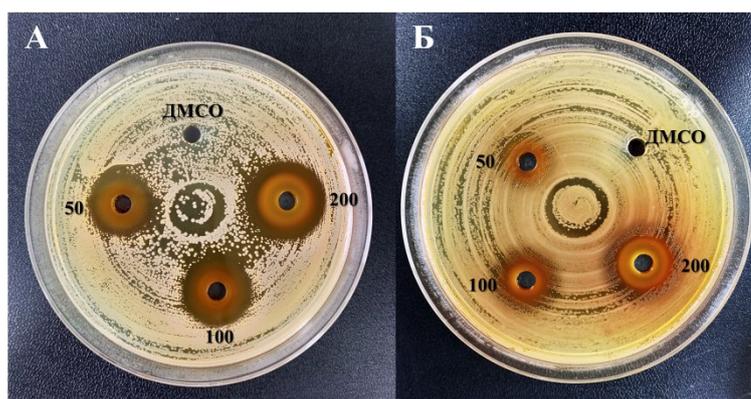


Рисунок 2. Диффузионный метод в агаровых лунках: зоны задержки роста бактерий действием экстракта сумаха при концентрации 50, 100 и 200 мг/мл. А: *E. coli* АТСС 25922. Б: УПЭК. ДМСО: контроль.

Таблица 2. Диффузионный метод в агаровых лунках: диаметры зон задержки роста штаммов *E. coli* действием экстракта гвоздики.

Штамм	Экстракт гвоздики (мг/мл)			
	25	50	100	200
УПЭК 3	0 ± 0.0*	0 ± 0.0	6 ± 0.0	8.5 ± 0.3
УПЭК 4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	6 ± 0.2	9 ± 0.12
УПЭК 8	0 ± 0.0	0 ± 0.0	7 ± 0.76	10 ± 0.0
АТСС 25922	10 ± 0.41	11 ± 0.15	12 ± 0.43	15 ± 0.25

* Диаметр зоны задержки роста в мм, представлено как среднее значение 3 повторных испытаний ± SD.

Экстракт заатара был протестирован в одной концентрации (100 мг/мл), которая вызвала зону задержки роста только по отношению к референсному штамму (12 мм ± 0.6) и не показала зоны задержки роста по отношению к УПЭК.

3.2. МИК и МБК

Экстракт сумаха продемонстрировал значение МИК 3.125 мг/мл по отношению к всем штаммам УПЭК, а 0.0244 мг/мл по отношению к референсному штамму. Было показано, что значения МИК для 7 штаммов также являются значениями МБК, тогда как для одного штамма и референсного штамма МБК составили 6.25 и 1.563 мг/мл соответственно. Было исследовано, адаптируются ли бактерии к экстракту сумаха при длительном воздействии (4 дня). Результаты показали, что чувствительность к экстракту не изменилась, поскольку МИК были такими же, как и для необработанных бактерий.

МИК и МБК экстракта гвоздики по отношению к УПЭК составили 25 мг/мл. Экстракт продемонстрировал более низкую МИК по отношению к референсному штамму (6.25 мг/мл), однако МБК для данного штамма составила 25 мг/мл. Экстракт заатара продемонстрировал МИК 50 мг/мл по отношению к УПЭК, в то время как по отношению к референсному штамму МИК составила 12.5 мг/мл. МБК экстракта заатара составила 50 мг/мл для всех исследованных штаммов.

Соотношение МБК/МИК показало, что экстракты гвоздики и заатара обладают бактерицидным действием по отношению к всем исследованным штаммам, при этом соотношение для УПЭК составляет 1, а для референсного штамма – 4. В то же время, экстракт сумаха проявил бактерицидное действие по отношению к УПЭК с соотношением 1 и 2, однако, обладает бактериостатическим действием по отношению к референсному штамму (соотношение = 64.1).

3.3. Агглютинация дрожжей и гемагглютинация

В данном исследовании изучалась адгезия 4 штаммов УПЭК к клеткам дрожжей (*S. cerevisiae* и *C. albicans*) после воздействия экстрактами сумаха, гвоздики и заатара в субингибирующей концентрации. Все исследованные штаммы УПЭК в разной степени агглютинировались с обоими типами дрожжей. Было отмечено, что более устойчивые штаммы демонстрировали более сильную агглютинацию. Экстракт гвоздики во всех исследованных случаях ингибировал агглютинацию с обоими типами дрожжей. Тем временем экстракт сумаха ингибировал агглютинацию с *S. cerevisiae* только у двух штаммов, тогда как на агглютинацию с ДПГ *C. albicans* он не оказал влияния. Такой же эффект наблюдался и с экстрактом заатара – он также ингибировал только агглютинацию с *S. cerevisiae*.

Далее исследовалась адгезия УПЭК к эритроцитам человека (группы крови В+) после воздействия экстракта сумаха в субингибирующей концентрации. Результаты показали, что только два наиболее устойчивых штамма продемонстрировали гемагглютинацию по маннозочувствительному и маннозоустойчивому типам. Однако экстракт сумаха смог ингибировать эту гемагглютинацию.

3.4. Адгезия к поверхности из полистирола

В данном исследовании изучалось влияние экстракта сумаха на адгезивную способность УПЭК к полистиролу. Результаты показали, что при субингибирующей концентрации экстракт сумаха статистически значимо ($p < 0.05$) ингибировал адгезию 7 из 8 исследованных штаммов на следующие показатели: 95.1%, 94.3%, 92.1%, 91.8%, 85.4%, 82.7% и 79.1%.

3.5. Влияние экстрактов растений на морфологию УПЭК

Результаты показали, что экстракты вызывают у всех штаммов УПЭК морфологические изменения в сферическую L-форму в различных процентах: гвоздика 96-99%, заатар 64-82%, сумах 10-30% (рисунок 3). Однако клетки первого поколения, выращенные без экстрактов, восстанавливали исходную форму палочек с клеточной стенкой, что означает нестабильность L-формы. Интересно, что экстракт сумаха вызвал значительное удлинение у одного штамма, при этом длина 56% обработанных клеток превышала 4 мкм и достигала 8.4 мкм (короткие филаменты) (рисунок 4).

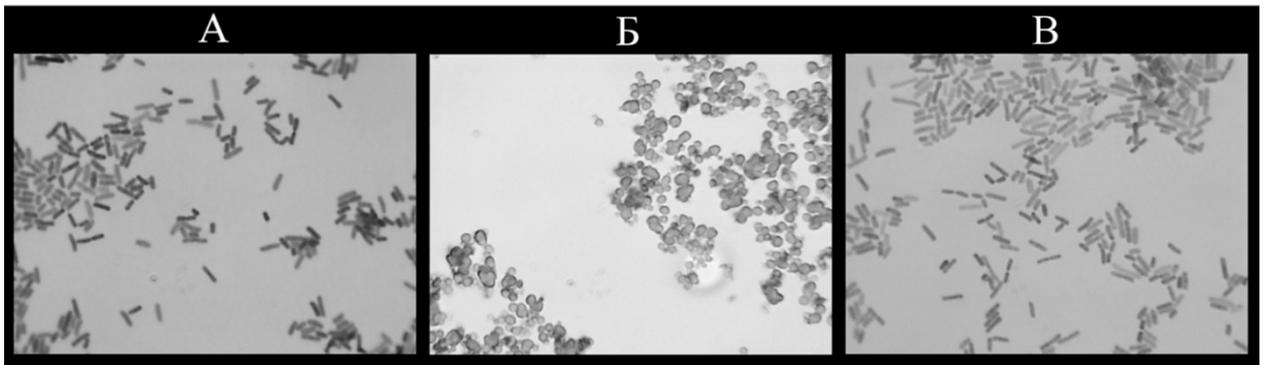


Рисунок 3. Морфологические изменения УПЭК после воздействия экстракта гвоздики. А: контроль (нормальные палочки). Б: с экстрактом (сферические клетки L-формы). В: первое поколение без экстракта (нормальные палочки). Увеличение 1000х. Изображения получены с помощью цифровой камеры Levenhuk M300 BASE.

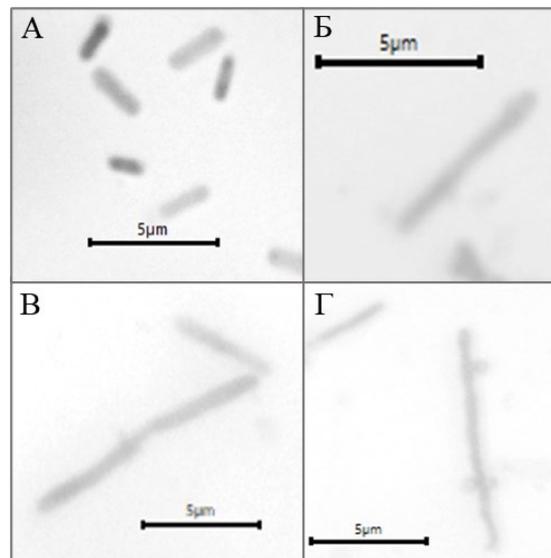


Рисунок 4. Морфологические изменения УПЭК после инкубации с экстрактом сумаха. А: нормальные клетки. Б, В, Г: короткие филаменты (5–10 мкм). Увеличение 1000х. Изображения получены с помощью цифровой камеры Levenhuk M300 BASE.

3.6. Влияние длительного воздействия экстракта сумаха на чувствительность УПЭК к антибиотикам

Исследовалась способность экстракта сумаха изменять чувствительность бактерий к антибиотикам. Для этого бактерии инкубировались с экстрактом сумаха при концентрации МИК/2 в течение 4 дня. Результаты показали, что длительное воздействие экстракта сумаха не вызвало статистически значимых изменений ($p > 0.05$) у всех исследованных штаммов УПЭК, а также у референсного штамма.

3.7. Синергизм

В данном исследовании оценивался синергический эффект между экстрактами гвоздики, сумаха и двумя антибиотиками из разных классов противомикробных средств: нитрофурантоином (NIT) и ципрофлоксацином (CIP), которые обычно используются для лечения ИМП (Chu and Lowder, 2018; Uppala et al., 2019). Результаты представлены в таблице 3. МИК отдельных антибиотиков по отношению к УПЭК составили 8 и 64 мкг/мл для NIT и 0.5 и 1024 мкг/мл для CIP. Аддитивная модель Лоэве показала, что комбинация антибиотиков и растительных экстрактов не привела к взаимодействию по отношению к УПЭК ($0.51 < FICI \leq 1$), за исключением одного штамма, по отношению к которому комбинации NIT + гвоздика и NIT + сумах проявляли синергический эффект ($FICI = 0.25$ и 0.19 соответственно). Интересно, что данный штамм обладает высокой МЛУ. Также оценивался синергизм между экстрактами гвоздики и сумаха. Результаты показали синергический эффект по отношению к всем исследованным штаммам ($FICI = 0.25, 0.37$). Независимо от интерпретации FICI, было отмечено, что МИК всех противомикробных агентов в комбинациях снижались в различной степени.

Комбинации, показавшие синергический эффект в модели Лоэве, были дополнительно проанализированы с использованием моделей HSA, Bliss и ZIP. Баллы синергизма, полученные по всем моделям, превышали 10 и достигали 17.74, при p -значениях < 0.05 , что указывает на статистически значимый синергизм. Эта согласованность подтверждает наличие синергизма во всех четырех различных моделях.

Таблица 3. Тест на синергизм: МИК экстрактов растений (мг/мл) и антибиотиков (мкг/мл), в отдельности (А) и в комбинации (Б), и значения FICI. NIT: нитрофурантоин, CIP: ципрофлоксацин.

Штамм	NIT + Гвоздика					CIP + Гвоздика				
	NIT		Гвоздика		FICI	CIP		Гвоздика		FICI
	А	Б	А	Б		А	Б	А	Б	
УПЭК 1	8	4	25	6.25	0.75	0.5	0.125	25	12.5	0.75
УПЭК 3	8	4	25	6.25	0.75	1024	128	25	12.5	0.63
УПЭК 8	64	8	25	3.125	0.25	1024	512	25	12.5	1

Штамм	NIT + Сумах					Гвоздика + Сумах				
	NIT		Сумах		FICI	Гвоздика		Сумах		FICI
	А	Б	А	Б		А	Б	А	Б	
УПЭК 1	8	4	3.125	0.195	0.56	25	3.125	3.125	0.781	0.37
УПЭК 3	8	4	3.125	0.024	0.51	25	3.125	3.125	0.781	0.37
УПЭК 8	64	8	3.125	0.195	0.19	25	3.125	3.125	0.391	0.25

3.8. Утечка белка, ДНК и РНК

Исследование способности экстракта сумаха вызывать нарушение целостности клеточной мембраны и утечку цитоплазматических компонентов из клеток УПЭК проводилось с помощью анализа утечки белка, ДНК и РНК. Результаты показали, что при МБК экстракт не вызывает утечки ни какого-либо из этих компонентов ($p > 0.05$).

4. Исследования *in vivo* с использованием *Galleria mellonella*

В данном исследовании использовали модель *G. mellonella* для изучения патогенности бактерий и токсичности экстракта сумаха. Используемый штамм является МЛЮ с MAR-индексом, равным 0.75. УПЭК подвергались длительному воздействию (9 дней) и кратковременному воздействию (24 часа) экстракта сумаха в субингибирующих концентрациях, после чего их патогенность исследовали на личинках GM. Анализ выживаемости по Каплану-Мейера показал, что не было статистически значимой разницы в выживаемости личинок между группами, инфицированными бактериями, обработанными экстрактом, и группами, инфицированными бактериями, обработанными ДМСО ($p > 0.05$). Кривые выживаемости представлены на рисунке 5.

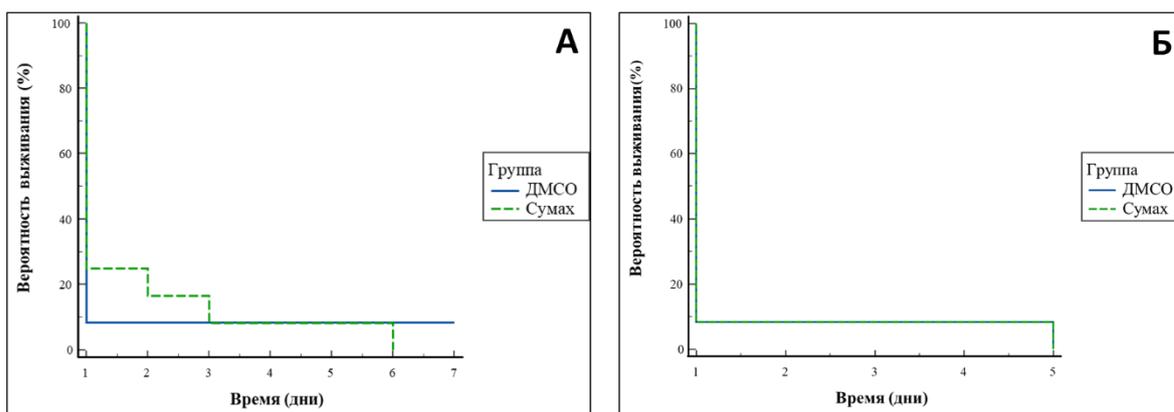


Рисунок 5. Кривая выживаемости личинок *G. mellonella*. УПЭК подвергались длительному (9 дней) (А) и кратковременному (24 часа) (Б) воздействию экстракта сумаха.

Также оценивалась токсичность экстракта сумаха на личинках *G. mellonella*. Экстракт вводили в различных дозах, варьирующихся от 0.36 до 11.43 г/кг массы тела. Результаты показали, что личинки переносил все тестируемые дозы со 100% выживаемостью через 24 часа, за исключением самой высокой дозы (11.43 г/кг массы тела), которая вызывала 90% смертности через 24 часа. Эти показатели не изменились после 7 дней наблюдения. Значения LD для экстракта составили: LD1 – 6.36, LD50 – 9.10, LD90 – 11.08 и LD99 – 13.02 г/кг массы тела. Логистическая регрессионная кривая смертности личинок в зависимости от логарифма дозы (мг/мл) представлена на рисунке 6.

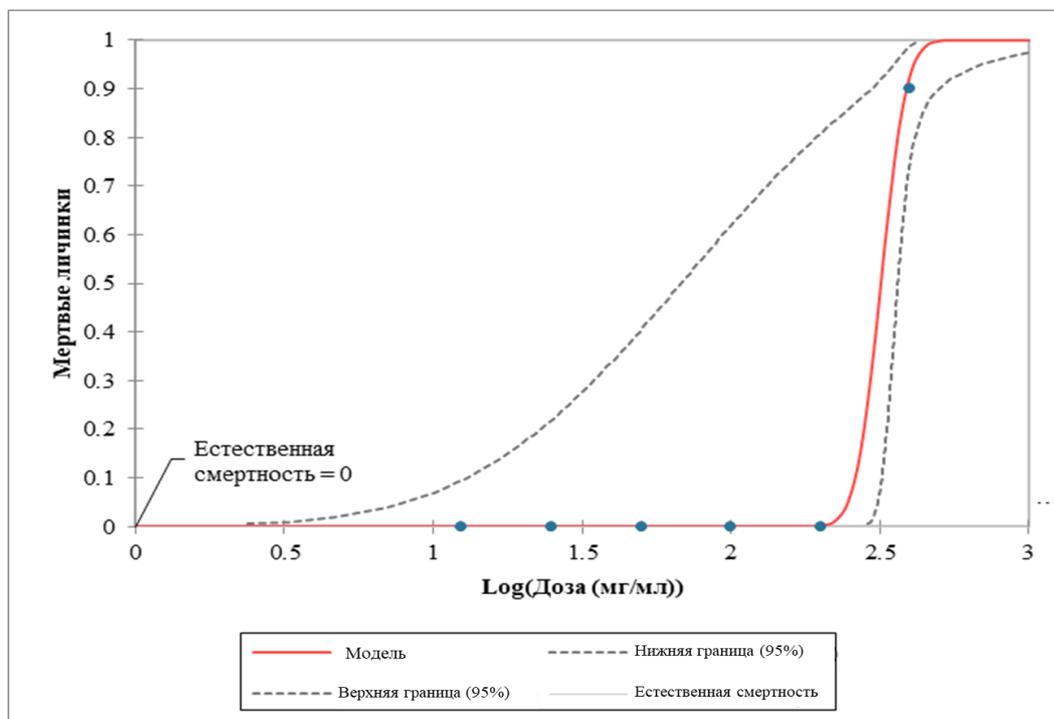


Рисунок 6. Токсичность экстракта сумаха: логистическая регрессия смертности личинок *G. mellonella* по логарифму дозы (мг/мл).

Далее изучалось влияние экстракта сумаха на выживаемость личинок *G. mellonella* после инфицирования их УПЭК. Личинок инфицировали УПЭК, а затем обрабатывали нетоксичными концентрациями экстракта сумаха (0.36, 1.43 и 5.71 г/кг массы тела). Результаты, проанализированные с помощью анализа выживаемости по Каплану-Мейеру, показали, что ни одна из доз экстракта не повлияла на выживаемость личинок. Смертность в группах, обработанных экстрактом, была такой же, как и в контрольных группах.

5. Биосинтез, характеристика и антибактериальный скрининг AgNPs

AgNPs были успешно синтезированы с использованием пяти растительных экстрактов (гвоздика, заатар, лимонная вербена, крапива и зеленый чай). Первоначальным подтверждением образования AgNPs стало изменение цвета растворов на более темный оттенок, который со временем становился еще темнее. Окончательный цвет всех растворов варьировался в пределах темно-коричневых оттенков (рисунок 7).

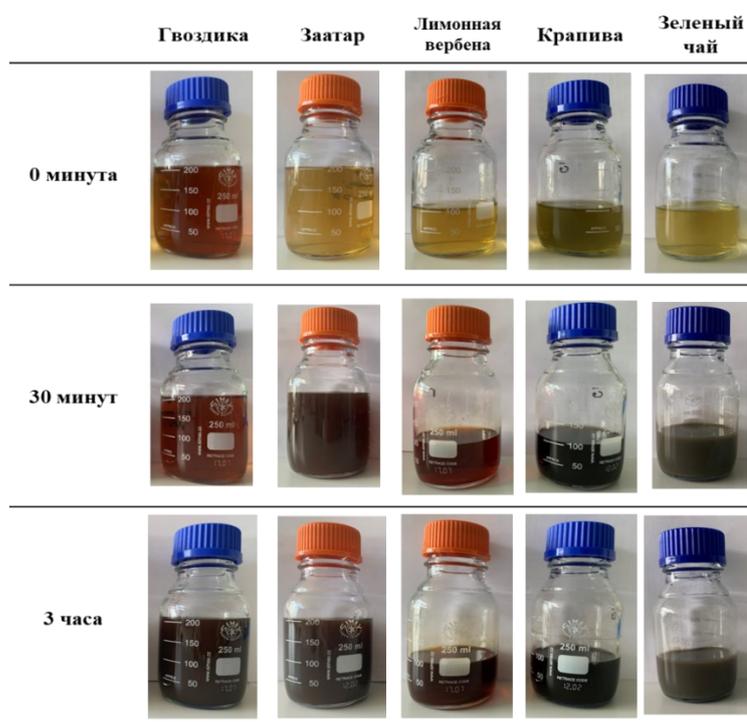


Рисунок 7. Изменение цвета растворов AgNPs в различные временные промежутки.

Спектры поглощения в УФ-видимом диапазоне показали одиночный и широкий пик поверхностного плазмонного резонанса при длине волны около 450 нм для всех растворов (рисунок 8). Интенсивность пика увеличивалась со временем, что указывает на рост концентрации AgNPs.

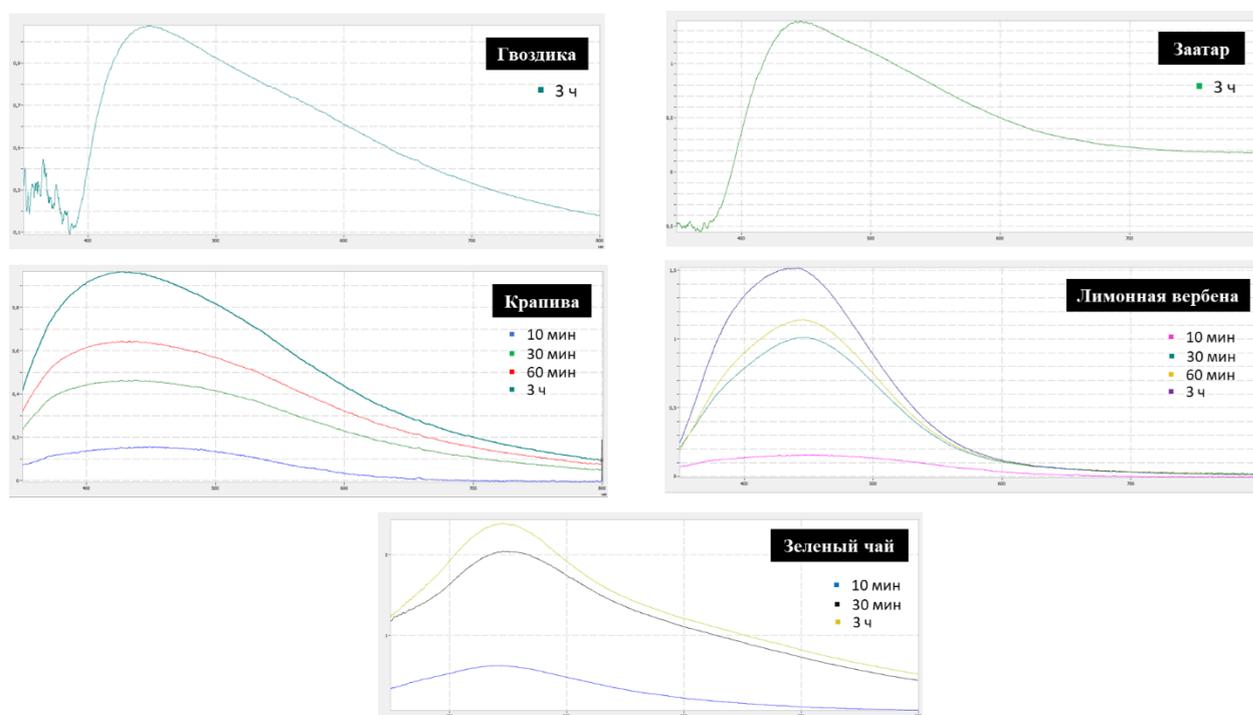


Рисунок 8. УФ-видимые спектры AgNPs в различные временные промежутки.

Согласно измерениям на установке Nanophox, размер наночастиц распределен в диапазоне 56-96 нм.

Антибактериальную активность синтезированных AgNPs исследовали на *E. coli* ATCC 25922 и УПЭК. Результаты не показали никакого антибактериального эффекта ни диффузионным методом в агаровых лунках, ни методом микроразведения в бульоне.

ВЫВОДЫ

1. Высокая устойчивость штаммов УПЭК наблюдалась к ампициллину, тогда как наибольшая чувствительность была к имипенему, за ним следовали ципрофлоксацин, тетрациклины, цефтазидим/клавулановая кислота, цефтазидим и триметоприм. 50% исследованных штаммов УПЭК обладали множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ); один из них проявлял устойчивость ко всем протестированным антибиотикам (индекс MAR=1), а у остальных MAR-индекс превышал 0.2.
2. Антибактериальная активность водно-спиртовых экстрактов сумаха, гвоздики и заатара была продемонстрирована в отношении всех исследованных штаммов УПЭК и *E. coli* ATCC 25922 (МИК и МБК составили 3.125-50 мг/мл). Сумах является самым эффективным растением за ним следуют гвоздика и заатар. Все экстракты обладают бактерицидным действием в отношении УПЭК. Экстракт сумаха не повреждает клеточную мембрану УПЭК и не вызывает адаптации бактерий к нему после его длительного воздействия.
3. Исследуемые штаммы УПЭК агглютинировались с *S. cerevisiae* и ДПГ *C. albicans* по маннозочувствительному типу. Более устойчивые штаммы проявляли более сильную агглютинацию. Экстракт гвоздики ингибировал агглютинацию УПЭК с обоими видами дрожжей. Сумах и заатар ингибировали агглютинацию УПЭК с *S. cerevisiae*, но не влияли на агглютинацию с *C. albicans*. Штаммы УПЭК, обладающие наибольшей устойчивостью к антибиотикам, проявляли маннозочувствительную и маннозоустойчивую гемагглютинацию с эритроцитами человека. Экстракт сумаха смог ингибировать эту агглютинацию.
4. Адгезия штаммов УПЭК к поверхности из полистирола была существенно снижена (на 79.1-95.1%) при воздействии субингибирующей концентрации экстракта сумаха.
5. Переход УПЭК в нестабильную L-форму был вызван субингибирующими концентрациями экстрактов гвоздики, сумаха и заатара в различных процентах: гвоздика 96-99%, заатар 64-82%, сумах 10-30%. Экстракт сумаха вызвал значительное удлинение у одного из исследованных штаммов, при этом длина 56% обработанных клеток была > 4 мкм и достигала 8.4 мкм (короткие филаменты).

6. Синергетический антибактериальный эффект в отношении МЛУ-УПЭК был выявлен при воздействии экстрактов гвоздики и сумаха в сочетании с нитрофурантоином или друг с другом. Комбинация антибиотиков (ципрофлоксацин или нитрофурантоин) с экстрактами растений (гвоздика или сумах) или только растительных экстрактов (гвоздика и сумах) привела к снижению МИК всех агентов по отношению к УПЭК.
7. Синтез AgNPs размером 56-96 нм был успешно проведен с использованием экстрактов пяти растений (гвоздика, заатар, лимонная вербена, крапива и зеленый чай). Полученные AgNPs не продемонстрировали антибактериальной активности по отношению к *E. coli* ATCC 25922 или УПЭК.
8. Патогенность УПЭК у личинок *G. mellonella* не была снижена после обработки бактерий субингибирующими концентрациями экстракта сумаха, также обработка личинок *G. mellonella*, инфицированных УПЭК, экстрактом сумаха в высоких нетоксичных концентрациях не повлияла на их выживаемость. Водно-спиртовой экстракт сумаха является безопасным и нетоксичным средством с значениями LD1, LD50, LD90 и LD99 равные 6.36, 9.10, 11.08 и 13.02 г/кг массы тела соответственно.

Практические рекомендации

Результаты этой работы могут быть использованы для разработки новых методов лечения ИМП, а также новых пищевых продуктов, содержащих растения с антибактериальными свойствами. Это позволит снизить риск устойчивости к антибиотикам, поскольку бактерии с меньшей вероятностью вырабатывают устойчивость к фитохимическим веществам по сравнению с антибиотиками.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Отдельное внимание следует уделить оптимизации метода экстракции для сумаха, гвоздики и заатара с целью максимизации их антибактериальной активности. Анализ фитохимического состава позволит глубже понять механизмы данной активности, что потребует дальнейшего изучения. Кроме того, перспективным направлением является исследование синергического эффекта с различными антибиотиками. Более того, оптимизация процесса зеленого синтеза наночастиц серебра с использованием растений, использованных в данном исследовании, может привести к разработке эффективных антибактериальных агентов. Проведение исследований *in vivo* с применением различных моделей также является важнейшим шагом для подтверждения полученных результатов и их перевода в клинически значимые приложения.

Используемые в автореферате сокращения:

1. AgNPs – Наночастицы серебра
2. dH₂O – Дистиллированная вода
3. MAR-индекс – Индекс множественной устойчивости к антибиотикам
4. ДМСО – Диметилсульфоксид
5. ДППГ – Дрожжеподобные грибы
6. ИМП – Инфекции мочевыводящих путей
7. МБК – Минимальная бактерицидная концентрация
8. МИК – Минимальная ингибирующая концентрация
9. МЛУ – Множественная лекарственная устойчивость
10. УПЭК – Уропатогенная *Escherichia coli*

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Marouf R.S., Mbarga J.A.M., Ermolaev A.V. et al. Antibacterial activity of medicinal plants against uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2022; 14(1): 1-12. DOI: 10.4103/jpbs.jpbs_124_21.
2. Razan Marouf, Andrey Ermolaev, Irina Podoprighora et al. Syrian sumac (*Rhus coriaria* L.)— An effective medicinal plant against multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2022; 12(5): 230-239. DOI: 10.7324/JAPS.2022.120522.
3. Marouf R., Ermolaev A.B., Podoprighora I.V. et al. Antibacterial activity of clove *syzygium aromaticum* L. and synergism with antibiotics against multidrug-resistant uropathogenic *E. coli*. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2023; 27(3): 379-390. DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-3-379-390.
4. Mbarga Manga Joseph Arsène, Podoprighora Irina Viktorovna, Anyutoulou Kitio Linda Davares et al. Antibacterial activity of grapefruit peel extracts and green-synthesized silver nanoparticles. *Veterinary World*. 2021; 14(5): 1330-1341. DOI: 10.14202/vetworld.2021.1330-1341.
5. Mbarga M. J. Arsène, Anyutoulou K. L. Davares, Smolyakova L. Andreevna et al. The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. *Veterinary World*. 2021; 14(2): 319-328. DOI:10.14202/vetworld.2021.319-328.
6. Mbarga M.J.A., Marouf R., Podoprighora I.V. et al. Long exposure impact of antibiotics subinhibitory doses and silver nanoparticles on uropathogenic bacteria. *Вестник Российского*

университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023; 27(3): 391-402. DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-3-391-402.

7. Маруф Р. Влияние растительных экстрактов на способность клинических изолятов уропатогенных *E. coli* (УПЕК) к агглютинации с дрожжами. В сб.: XV Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И.Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы»; 2023: С. 143-143

Аннотация диссертации

Маруф Разан

«ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ НА ПОЛИРЕЗИСТЕНТНЫЕ УРОПАТОГЕННЫЕ E. COLI»

Диссертационная работа посвящена исследованию антибактериальной активности экстрактов сумаха (*Rhus coriaria* L.), гвоздики (*Syzygium aromaticum* L.) и заатара (*Thymus syriacus* Boiss.) по отношению к полирезистентным уропатогенным *E. coli*. В рамках исследования были применены различные методы *in vitro*, включая определение МИК и МБК, изучение влияния экстрактов на некоторые жизненно важные процессы, такие как адгезия и агглютинация с дрожжами и эритроцитами, а также морфологические изменения и целостность клеточной мембраны. Кроме того, было исследовано синергическое действие экстрактов с двумя антибиотиками, а также между самими экстрактами. Используя модель *Galleria mellonella*, была изучена токсичность экстракта сумаха и его антибактериальная активность. Заключительный этап исследования включал синтез наночастиц серебра методом зеленого синтеза с использованием пяти растений и тестировании их антибактериальной активности.

Abstract of the dissertation

«STUDY OF THE ANTIBACTERIAL EFFECTS OF PLANT EXTRACTS ON POLYRESISTANT UROPATHOGENIC E. COLI»

This dissertation is dedicated to the investigation of the antibacterial activity of sumac (*Rhus coriaria* L.), clove (*Syzygium aromaticum* L.), and zaatar (*Thymus syriacus* Boiss.) extracts against polyresistant uropathogenic *E. coli*. The research employed various *in vitro* methods, including the determination of MIC and MBC, the study of the influence of extracts on some vital processes such as adhesion and agglutination with yeast and erythrocytes, as well as morphological changes and cell membrane integrity. Additionally, the synergistic action of extracts with two antibiotics, as well as between the extracts themselves, was investigated. Using the *Galleria mellonella* model, the toxicity of sumac extract and its antibacterial activity were studied. The final stage of the research involved the synthesis of silver nanoparticles by the green synthesis method using five plants and testing their antibacterial activity.