

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕРПЕНОВ И КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ ТЕРПЕНОИДОВ В ОТНОШЕНИИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

© 2024 г. А. И. Колесникова^а, А. Р. Каюмов^а, И. Р. Гильфанов^а, Л. Л. Фролова^с,
Л. Е. Никитина^б, Е. Ю. Тризна^{а, *}

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

^бКазанский государственный медицинский университет, Казань, 420111, Россия

^сИнститут химии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167000, Россия

*e-mail: trizna91@mail.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 09.11.2023 г.

Принята к публикации 10.11.2023 г.

Staphylococcus aureus при различных патологических состояниях может вызывать многие заболевания. В связи с быстрым развитием устойчивости к антибиотикам, поиск альтернативных путей противомикробной терапии стафилококка является актуальной задачей. Природные и синтетические терпеноиды, благодаря мембранотропным свойствам, способны оказывать как антимикробное действие, так и потенцировать действие других антибиотиков. Проведена оценка противомикробной активности 53 природных терпенов и их синтетических кислородсодержащих производных, а также их способность потенцировать действие уже имеющихся антимикробных препаратов в отношении *S. aureus*. Показано, что (+)-3β,4β-карандиол и (–)-миртеневая кислота повышают эффективность амикацина, цефтриаксона и мирамистина от 2 до 4 раз, что говорит о возможности их использования для комбинированной терапии с лекарственными препаратами для снижения действующих концентраций последних.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, эфирные масла, терпены, антимикробные препараты, потенцирование

DOI: 10.31857/S0026365624030167

За последнее десятилетие скорость разработки новых антибиотиков стала значительно ниже скорости приобретения устойчивости к ним среди большинства микроорганизмов. В результате, набор доступных антибиотиков для лечения инфекций становится ограниченным, что приводит к высокой заболеваемости и смертности (Lewis, 2013; Zaman et al., 2017).

Staphylococcus aureus является причиной развития широкого спектра заболеваний. Их можно разделить на острые инфекции, вызванные свободноплавающими формами (бактериemia, кожные абсцессы) и хронические инфекции, связанные с образованием биопленок (остеомиелит, эндокардит и др.) (Lister, Horswill, 2014). *S. aureus* чувствителен к большинству антибиотиков, но быстро приобретает устойчивость практически ко всем имеющимся классам антимикробных препаратов, включая фторхинолоны, ванкомицин, даптомицин, линезолид, цефалоспорины и карбапенемы, а также макролиды, линкозамиды и стрептограмин

(Chambers, Deleo, 2009; Mikłasińska-Majdanik, 2021). Таким образом, поиск и разработка новых подходов к терапии инфекций, обусловленных резистентными штаммами *S. aureus*, является актуальной задачей фармакологии.

Эфирные масла являются вторичными метаболитами — производными изопреновых веществ, называемых терпенами, и в зависимости от количества углеводородных групп, различают дитерпены, тритерпены, тетратерпены и т.д. За счет гидрофобности эфирные масла способны взаимодействовать с липидами, присутствующими в клеточной мембране бактерий и митохондрий, нарушая клеточные структуры, делая их более проницаемыми, что приводит к гибели бактериальной клетки из-за значительной утечки критически важных молекул и ионов (Devi et al., 2010; Chouhan et al., 2017).

Комбинированное действие антибиотиков с различными веществами может уменьшить появление лекарственно-устойчивых вариантов и снизить дозу каждого компонента в комбинации.

Для повышения активности доступных антибиотиков эффективным решением является сочетание последних с адьювантами, такими как терпены (Cheesman et al., 2017; Tarmo, 2018; Shrivastava et al., 2018; Bhattacharya et al., 2021; Puvača, de Frutos, 2021). Показано, что гераниол способен воздействовать на эффлюксные насосы, и может восстанавливать чувствительность к лекарственным препаратам у штаммов *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Сочетание эфирного масла чайного дерева с противомикробным агентом тобрамицином оказывает синергетический эффект против *S. aureus* с множественной лекарственной устойчивостью (D'Arrigo et al., 2010; Chouhan et al., 2017). Миртенол повышает эффективность амикацина и цiproфлоксацина против *S. aureus* (Mahmoud et al., 2022).

Целью настоящей работы было провести оценку антимикробного потенциала природных терпенов и их способность к потенцированию антибактериальных препаратов.

В работе использовали штамм *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213™. Терпены, исследуемые в работе, были приобретены в компании “Sigma-Aldrich” и приведены в таблице S1 или получены по известным методикам. Антибиотики амикацин, мирамистин, цефтриаксон и цiproфлоксацин были приобретены в компании “Sigma” (США).

Для культивирования бактерий использовали питательную среду Mueller-Hinton (МН; “Sigma”, США).

МПК антимикробных препаратов определяли методом серийных микроразведений в среде МН согласно рекомендациям EUCAST (Leclercq et al., 2013). Противомикробные препараты разводили средой в 96-луночном пластиковом планшете (Eppendorf Cell Culture Plates) в концентрациях 1–2048 мкг/мл. Лунки засеивали 200 мкл бактериальной культуры (КОЕ $2-9 \times 10^6$) в среде МН и инкубировали при 37°C. Минимальную подавляющую концентрацию определяли как наименьшую концентрацию вещества, при которой полностью отсутствовал бактериальный рост на 24-й час инкубации.

Анализ комбинированного применения антимикробных агентов изучали с помощью метода шахматной доски (den Hollander, 1998). Каждый планшет содержал серийные разведения терпенов и противомикробных препаратов в шахматном порядке. Начальная концентрация каждого из исследуемых антимикробных агентов составляла $4 \times$ МПК. Конечная концентрация бактерий в лунках планшета составляла 0.5×10^5 КОЕ/мл. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C в течение 20 ч. Затем измеряли оптическую плотность ОП₆₀₀ на планшетном спектрофотометре Infinite 200 PRO (“Tecan”, США). Каждый тест проводился в трех повторах и включал контроль роста без

добавления какого-либо антимикробного агента. Показателем характера совместного антимикробного действия веществ являлся индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК), который рассчитывали, как было описано ранее (den Hollander et al., 1998).

Для определения жизнеспособности бактерий в присутствии противомикробных препаратов в лунки с исследуемыми веществами вносили 5 мкл раствора натриевой соли резазурина (alamarBlue™ Cell Viability Reagent, “Sigma”) до конечной концентрации 120 мкМ и проводили визуальную оценку. При наличии розовой окраски культуральной жидкости бактерии идентифицировали как жизнеспособные, синяя окраска свидетельствовала о гибели клеток.

На первом этапе была исследована противомикробная активность 53 терпенов, имеющих различное происхождение и строение и обозначенных условными номерами от 1 до 53 (дополнительные материалы, табл. S1). В качестве препаратов сравнения использовали антибиотики и антисептики, используемые в клинической практике. Исследуемые терпены не обладали ярко выраженным противомикробным эффектом. МПК 35 соединений варьировала в пределах 256–2048 мкг/мл, 18 соединений не подавляли рост бактерий в концентрациях 2048 мкг/мл. Среди всех исследуемых терпенов абиетиновая кислота проявляла наибольшее противомикробное действие с МПК в отношении *S. aureus* 16 мкг/мл (табл. S1), в то время как МПК препаратов сравнения составила 0.5–64 мкг/мл.

Оценку способности терпенов повышать эффективность амикацина, цефтриаксона, цiproфлоксацина и мирамистина в отношении *S. aureus* проводили методом шахматной доски. Для этого бактерии выращивали в присутствии антибиотиков в комплексе с терпенами в концентрации $0.125 \times$ МПК. После 24 ч инкубации рассчитывали индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК).

Выраженный синергетический эффект с амикацином наблюдался для 3 веществ: (+)-3β,4β-карандиола, (+)-4-(1-оксиэтил)карена-2, (-)-миртеневой кислоты, при этом МПК амикацина снижалась до четырех раз. При взаимодействии с цефтриаксоном синергизм был обнаружен только для (+)-3β,4β-карандиола, при этом МПК антибиотика снижалась в 2 раза (табл. 1).

Для мирамистина синергия была обнаружена с (+)-3β,4β-карандиолом, (-)-миртеневой кислотой и (-)-миртеналем, где эффективность антисептика повышалась до 4 раз. При взаимодействии с цiproфлоксацином ни для одного исследуемого вещества не было обнаружено синергетических взаимодействий (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика синергетического взаимодействия терпенов с антимикробными препаратами

Антибиотик	Терпен	МПК терпена, мкг/мл	МПК антибиотика, мкг/мл	ФИК терпена, мкг/мл	ФИК антибиотика, мкг/мл	иФИК	Снижение МПК, раз
Амикацин	(+)-3 β ,4 β -Карандиол	2048	4	128	1	0.31	4
	(+)-4-(1-Оксиэтил)карен-2	2048	16	128	8	0.52	2
	(-)-Миртеновая кислота	2048	16	128	8	0.53	2
Цефтриаксон	(+)-3 β ,4 β -Карандиол	2048	0.5	128	0.25	0.44	2
Мирамистин	(+)-3 β ,4 β -Карандиол	2048	2	128	0.5	0.31	4
	(-)-Миртеновая кислота	2048	2	128	1	0.53	2
	(-)-Миртеналь	2048	2	128	1	0.52	2

Таким образом, терпены способны повышать эффективность антибиотиков и антисептиков в отношении *S. aureus*. Однако синергетический эффект распространяется на отдельные классы противомикробных препаратов, что, скорее всего, связано с различиями в химической структуре исследуемых веществ и антибиотиков, а также внутриклеточными мишенями этих препаратов. Наибольшую перспективу для дальнейших исследований представляет вещество (+)-3 β ,4 β -карандиол, проявивший синергизм с тремя из четырех исследованных антимикробных препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А. И. Колесникова, Л. Л. Фролова, И. Р. Гильфанов — экспериментальные процедуры, А. Р. Каюмов, Е. Ю. Тризна., Л. Е. Никитина — руководство работой; все авторы участвовали в написании и утверждении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bhattacharya R., Rolta R., Dev K., Sourirajan A. Synergistic potential of essential oils with antibiotics to combat fungal

pathogens: present status and future perspectives // *Phytother. Res.* 2021. V. 35. P. 6089–6100.

Chambers H. F., Deleo F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era // *Nat. Rev. Microbiol.* 2009. V. 7. P. 629–641.

Cheesman M. J., Ilanko A., Blonk B., Cock I. E. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/Compounds with conventional antibiotics the solution? // *Pharmacogn. Rev.* 2017. V. 11. P. 57–72.

Chouhan S., Sharma K., Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils — present status and future perspectives // *Medicines.* 2017. V. 4. Art. 58.

D'Arrigo M., Ginestra G., Mandalari G., Furneri P. M., Bisignano G. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* // *Phytomedicine.* 2010. V. 17. P. 317–322.

Devi K. P., Nisha S. A., Sakthivel R., Pandian S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane // *J. Ethnopharmacol.* 2010. V. 130. P. 107–115.

den Hollander J. G., Mouton J. W., Verbrugh H. A. Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1998. V. 42. P. 744–748.

Leclercq R., Cantón R., Brown D. F., Giske C. G., Heisig P., MacGowan A.P., Kahlmeter G. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing // *Clin. Microbiol. Infect.* 2013. V. 19. P. 141–160.

Lewis K. Platforms for antibiotic discovery // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. V. 12. P. 371–387.

Lister J. L., Horswill A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014. V. 4. Art. 178.

Mahmoud R. Y., Trizna E. Y., Sulaiman R. K., Pavelyev R. S., Gilfanov I. R., Lisovskaya S. A., Ostolopovskaya O. V., Frolova L. L., Kutchin A. V., Guseva G. B., Antina E. V., Berezin M. B., Nikitina L. E., Kayumov A. R. Increasing the efficacy of treatment of *Staphylococcus aureus*–*Candida albicans* mixed infections with myrtenol // *Antibiotics.* 2022. V. 11. Art. 1743.

- Miklasińska-Majdanik M.* Mechanisms of resistance to macrolide antibiotics among *Staphylococcus aureus* // Antibiotics. 2021. V. 10. Art. 1406.
- Puvača N., de Llanos Frutos R.* Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from humans and pet animals // Antibiotics. 2021. V. 10. P. 1–63.
- Shrivastava S. R., Shrivastava P. S., Ramasamy J.* World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics // Med. Soc. 2018. V. 32. P. 7–76.
- Tarmo N.* Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus* // Eur. J. Med. Chem. 2018. V. 157. P. 198–228.
- Zaman S. B., Hussain M. A., Nye R., Mehta V., Mamun K. T., Hossain N.* A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing // Cureus. 2017. V. 9. Art. e1403.

SHORT COMMUNICATIONS

**Antimicrobial Activity of Terpenes and Oxygen-Containing Terpenoids
Against *Staphylococcus aureus***

**A. I. Kolesnikova¹, A. R. Kayumov¹, I. R. Gilfanov¹, L. L. Frolova³,
L. E. Nikitina², and E. Yu. Trizna^{1, *}**

¹Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

²Kazan State Medical University, Kazan, 420111 Russia

³Institute of Chemistry, Komi Science Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167000 Russia
*e-mail: trizna91@mail.ru

Received October 14, 2023; revised November 9, 2023; accepted November 10, 2023

Abstract—At various pathological states, *Staphylococcus aureus* may cause a number of diseases. Rapid spread of antibiotic resistance necessitates the search for alternative approaches to antimicrobial treatment of staphylococci. Due to their membranotropic properties, natural and synthetic terpenoids are capable both of antimicrobial action and of potentiation of the effect of other antimicrobial agents. Antimicrobial activity of 53 natural terpenes and their synthetic oxygen-containing derivatives was determined, as well as their ability to potentiate the effect of known antimicrobials on *S. aureus*. Two- to fourfold increase in efficiency of amikacin, ceftriaxone, and miramistin in the presence of (+)-3β,4β-carandiol and (–)-myrtenic acid indicates the possibility of their application for combined therapy together with medical preparations in order to decrease the concentrations of the latter.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, essential oils, terpenes, antimicrobials, potentiation

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕРПЕНОВ И КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ ТЕРПЕНОИДОВ В ОТНОШЕНИИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

© 2024 г. А. И. Колесникова^а, А. Р. Каюмов^а, И. Р. Гильфанов^а, Л. Л. Фролова^с,
Л. Е. Никитина^б, Е. Ю. Тризна^{а, *}

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

^бКазанский государственный медицинский университет, Казань, 420111, Россия

^сИнститут химии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167000, Россия

*e-mail: trizna91@mail.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 09.11.2023 г.

Принята к публикации 10.11.2023 г.

Таблица S1. Оценка минимальной подавляющей концентрации (МПК) терпенов и кислородсодержащих терпеноидов в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

№	Наименование вещества	МПК, мкг/мл	№	Наименование вещества	МПК, мкг/мл
1	(-)-цис-вербенол	1024	28	(+)- α -пинен	>2048
2	(-)-неоизовербанол	>2048	29	(-) β -пинен	1024
3	(+)-3 α ,4 α -карандиол	2048	30	(+)- β -пинена окись	1024
4	(-)-3 β ,4 α -карандиол	512	31	(-)- α -пинена окись	>2048
5	(+)-3 β ,4 β -карандиол	2048	32	(+)-камфен	>2048
6	(-)-2 α ,3 α -пинандиол	2048	33	(-)-камфен	>2048
7	(-)-2 α ,3 β -пинандиол	2048	34	(\pm)-камфен	2048
8	(+)-4-(1-оксиэтил)карен-2	>2048	35	(-)-ментол	1024
9	(-)-3 α ,4 β -пинандиол	2048	36	(-)-карвеол	512
10	(-)-изопинокамфеол	1024	37	D-(+)-карвон	1024
11	(\pm)-2-экзо-10-эндо-камфандиол	2048	38	(+)-лимонен	>2048
12	(-)-изокаранол-4	512	39	(+)-лимонена диокись	>2048
13	(-)-цис-миртанол	512	40	(+)-лимонена окись	>2048
14	(-)-транс-миртанол	512	41	(-)-перилловый спирт	512
15	(-)-миртенол	512	42	α -терпинеол	1024
16	(-)-нопол	256	43	(-)-терпинен-4-ол	1024
17	(+)-миртенол	1024	44	транс-п-мент-6-ен-2,8-диол	>2048
18	(-)-цис-миртановая кислота	>2048	45	3-карен	>2048
19	(-)-транс-миртановая кислота	>2048	46	мирцен	2048
20	(-)-миртенная кислота	>2048	47	гераниол	1024
21	(-)-миртеналь	>2048	48	вербенон	2048
22	(-)-цис-нопинол	1024	49	(+)-транс-вербенол	1024
23	(+)-3,4,-транс-пинандиол	2048	50	(-)-транс-вербенол	512
24	(-)-борнеол	1024	51	(-)-R-цис-вербенол	1024
25	DL-изоборнеол	2048	52	абиетиновая кислота	16
26	норборнилен	>2048	53	гвайазулен	>2048
27	камфора	2048			