

ВИВЧЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ІМУНОСТИМУЛЮЮЧОЇ ДІЇ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК ЕКСТРАКТІВ *DUSCHEKIA VIRIDIS*

С.Ю. Біляєвська¹, М.А. Кулагіна², Т.П. Осолодченко¹, О.В. Радько², А.Г. Сербін², О.В. Порт¹

¹Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова АМН України, Харків

²Національний фармацевтичний університет, Харків

РЕЗЮМЕ

Вивчена антибактеріальна активність та імуностимулююча дія поліфенольних сполук *Duschekia viridis* на музейних і клінічних штамів мікроорганізмів. Етилацетатний екстракт із стиглих суплідь володіє протимікробною дією по відношенню до широкого спектру мікроорганізмів та в подальшому може бути використований для отримання нового антибактеріального та імуностимулюючого препарату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мікроорганізми, рослинні екстракти, антибактеріальна активність, імуностимулююча дія

Зростання стрімкими темпами процесів урбанізації, використання великої кількості продуктів хімії (фармацевтичні препарати, побутові речовини) та значний вплив фізичних факторів (електромагнітне та інше випромінювання) останнім часом привело до зростання алергічних процесів у людини при незначних захворюваннях. Тому лікарі частіше стали звертатися до ліків рослинного походження, які, по-перше, менш безпечні, по-друге, їх можна застосовувати у великих терапевтичних дозах та дуже тривалий час. При цьому забезпечується терапевтичний ефект та знижується ризик алергічного впливу.

Інтерес багатьох дослідників до антимікробних засобів рослинного походження виявив ряд антибіотиків, які дозволені для застосування в медицині. Синтетичні антибіотики, що зараз використовуються в клінічній практиці, можуть сприяти розвитку деяких побічних ефектів (алергічні реакції, пригнічуючий вплив на імунологічну реактивність організму, дизбіоз ротоглотки, кишкового тракту та ін.). Властивості рослинних антибіотиків підвищувати імунобіологічну реактивність організму та нормалізувати деякі з них параметрах способу забезпечує одержання екстракту з вираженою антимікробною та протизапальною дією.

Робота виконана в рамках НДР Інституту мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова АМН України “Вивчити показники імунологічної реактивності та визначити можливість імунокорекції у хворих на виразкову хворобу шлунка і дванадцятипалої кишки, асоційовану з *H.pylori*”, № держреєстрації 0100 U000405.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Поставлене завдання вирішується таким чином, що літом та восени збирали кору, ли-

його фізіологічні функції обумовлюють значимість і перспективність пошуку антибіотичних препаратів серед рослин для потреб клінічної медицини [1, 2].

Серед численних представників лікарської флори в народній медицині здавна використовуються відвари й настої з різних частин рослин роду Вільха (*Alnus g.*). Вільха клейка розповсюджена на території України, Росії, Білорусії, країнах Європи, Азії, Америки. Відомо, що вільха клейка містить тритерпеноїди, дубильні речовини, органічні кислоти, цукрі та багато інших речовин. За даними літератури, біологічно активні речовини (поліфенольні сполуки, полісахариди та ін.), які були вилучені з кори, листків, зелених та стиглих суплідь вільхи клейкої, мають протизапальну, антимікробну, репаративну, антиоксидантну дію та інші фармакологічні властивості [3, 4].

Однак на території України є ще один рід Вільхи-Душекія зелена, яка розповсюджена в Карпатах, де екологічні умови значно кращі, ніж у промислових районах Східної України. Тому було зроблена спроба отримати речовину з *Duschekia viridis*, який шляхом спиртової екстракції суплідь при задаття та супліддя дерева. Водорозчинні фракції полісахаридів з листя, стиглих та зелених суплідь, етилацетатні та спиртові екстракти отримували шляхом екстрагування 70% етанолом або дистильованою водою протягом 13-15 годин при співвідношенні сировина – екстрагент – 1:9- 1:11 з подальшою фільтрацією упареного екстракту і обробкою етилацетатом у співвідношенні 1:2. Всього було отримано 9 композицій:

1. Розчинна фракція полісахаридів кори Душекії зеленої;
2. ВРПС (водорозчинні полісахариди) зі стиглих суплідь;
3. ВРПС зелених суплідь;

4. Етілацетатний екстракт із стиглих суплідь;
5. 30% спиртовий екстракт із стиглих суплідь;
6. Водний екстракт із стиглих суплідь;
7. 50-% спиртовий екстракт із стиглих суплідь;
8. ПР із стиглих суплідь;
9. ПР з зелених суплідь.

Усі мали вигляд випареної речовини зелено-коричневого кольору. Препарати розчинювали у воді та 70° спирті і перевіряли на антибактеріальну активність по відношенню до штамів, які є збудниками запальних інфекцій. Антибактеріальну дію препаратів перевіряли відповідно до нормативних документів методом дифузії в агар та серійних розведень. Дослідна концентрація складала 1,0% розчин [5].

Прототипом є альтан, який являє собою екстракт з суплідь вільхи клейкої та є комплексом речовин поліфенольної природи – похідних елагатанінів. Механізм фармакологічної дії альтану пов'язаний зі спроможністю елагатанінів у малих дозах впливати на клітини мембрани й стан цитоплазми. Антиоксидантний ефект препарату зумовлено наявністю гідроксильних груп у молекулах елагатанінів, а також особливостями будови самих молекул. Відомо, що перспективу кожного антибактеріального препарату, впровадженого в систему охорони здоров'я, крім вираженої антибактеріальної активності, мікробіологічно визначають наявність етіоспецифічності чи широкого спектру дії щодо різних таксономічних груп мікроорганізмів; переважна чи обрана бактерицидна дія; наявність чи відсутність мінімально вираженої селективної дії на чутливість мікроорганізмів [6, 7, 8].

Одержані дані про фармакодинаміку та теоретичні відомості про властивості елагатанінів дозволили обґрунтувати доцільність застосування екстрактів душекї зеленої при хронічних захворюваннях шлуночно-кишкового тракту, санації носоглотки бактеріоноVIN, впливають на функціональні властивості

T-лімфоцитів, головне місце займає реакція гіперчутливості повільного типу (ГПТ). Вона націлена на визначення здатності імуномодулюючих засобів впливати на продукцію сенсibiliзованими лімфоцитами медіаторів різнонаправленої дії.

Досліджена дія етілацетатного екстракту на формування реакції ГПТ у інтактних мишей, лінії СВА, вагою 16-18 г. Реакцію проводили, імунізуючи тварин в/в еритроцитами барана у дозі 2×10^5 клітин. Для визначення сенсibiliзації, мишам на 5 добу, вводили

сіів.

Дослідження по антибактеріальній активності проводили з використанням стандартних тест-штамів мікроорганізмів, які рекомендовані ВОЗ:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
2. *Escherichia coli* ATCC 25922;
3. *Proteus vulgaris* ATCC 4636;
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;
5. *Candida albicans* ATCC 885/653

Додаткові дослідження проводили по відношенню до музейних та клінічних штамів мікроорганізмів.

За даними літератури була встановлена імуномодулююча активність фракції водорозчинних полісахаридів, отриманих з різних частин вільхи клейкої. Тому ми вирішили вивчити вплив досліджуваної сполуки на клітинну ланку імунної відповіді. Вивчення дії імуномодуляторів на клітинну ланку імунної відповіді передбачає використання модельної системи, які дають нам уявлення про функціональну активність лімфоцитів T-ряду; реакцію гіперчутливості повільного типу (ГПТ) та реакцію “трансплантат проти хазяїна” (РТПХ).

Реакція «трансплантат проти хазяїна» дає можливість оцінити дію досліджуваної речовини на ефекторну здатність T-лімфоцитів в реакції трансплантаційного імунітету.

У попередніх серіях дослідів визначали дозу введення батьківських лімфоцитів, які викликають 50% пригнічення росту ендогенних колонієутворюючих клітин (КУК) в селезінці мишей F1. Ця доза складала $0,8 \times 10^6$ та була використована в подальших дослідях. Мишей (СВА×С₅₇BL)F₁ випромінювали в дозі 5 Гр і вводили в/в $0,8 \times 10^6$ в 0,5 мл клітин лімфатичних вузлів мишей СВА. 1% розчин етілацетатного екстракту стиглих суплідь вводили реципієнтам підшкірно відразу після трансплантації.

Серед модельних систем, які вивчають імунотропні властивості препаратів та речо-

1×10^8 клітин (ЕБ) в 0,5 мл фізіологічного розчину у подушечку задньої лапи (дозволяюча ін'єкція). У контрольну лапу вводили фізіологічний розчин у тому ж об'ємі.

Місцеву запальну реакцію оцінювали через 24 години по різниці ваги досліджуваної (P_o) і контрольної (P_к) лап. Індекс реакції (IP) вираховували для кожної миші за формулою:

$$ID = \frac{P_o - P_k}{P_k} \cdot 100 \%,$$

где IP – індекс реакції;

P_o – вага досліджуваної лапи;

P_k – вага контрольної лапи.

Контролем були інтактні не імунізовані миші, які отримували допустиму дозу антигена. Вплив екстракту на ГПП оцінювали по зсуванню індекса реакції [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У дослідах було показано, що поліфенольні сполуки, які отримані з екстрактів душекї зеленої, найбільш вираженою антибактеріальною дією володіють етілацетатний, спиртовий та водний екстракти стиглих суплідь. Діаметри зон затримки росту по відношенню до стафілококів, кишкової палички, протею та палички синьо-зеленого гною

складали на рівні 18-27 мм, що вказувало на виражену або високу протимікробну активність. Найбільшу активність розчини показали по відношенню до стафілококів (25-27 мм), чутливість спостерігалась у грамнегативних бактерій (18-25 мм). Крім цього, встановлена слабка протигрибкова дія (14-16 мм). Достовірно вище діаметри зон затримки росту спостерігались у етілацетатного екстракту стиглих суплідь. У порівнянні з контрольним препаратом – альтаном, за виключенням стафілокока та кандиди, по відношенню до грамнегативної флори у екстрактах зони затримки були вище. Дані надані в табл. 1.

Таблиця 1

Антибактеріальна активність різних сполук душекї зеленої по відношенню до штамів різних мікроорганізмів

Сполуки	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>P.vulgaris</i> ATCC 4636	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C.albicans</i> ATCC 885/653
Діаметр зони затримки росту в мм $M \pm m$					
Розчинна фракція полісахаридів кори Душекї зеленої	14±0,1	12±0,2	11±0,1	ріст	ріст
ВРПС (водорозчинні полісахариди) зі стиглих суплідь	14±0,1	15±0,1	16±0,2	13±0,1	ріст
ВРПС зелених суплідь	15±0,2	16±0,2	17±0,3	13±0,1	ріст
Етілацетатний екстракт із стиглих суплідь	27±0,5	25±0,3	24±0,6	22±0,4	15±0,2
30-% спиртовий екстракт із стиглих суплідь	24±0,4	22±0,3	21±0,5	19±0,2	14±0,1
Водний екстракт із стиглих суплідь	25±0,7	21±0,5	20±0,4	20±0,4	14±0,2
50-% спиртовий екстракт із стиглих суплідь	25±0,5	23±0,4	21±0,2	18±0,3	14±0,2
ПР із стиглих суплідь	15±0,2	18±0,3	16±0,2	14±0,1	ріст
ПР з зелених суплідь	15±0,2	17±0,2	12±0,1	ріст	ріст
Контроль-альтан	25±0,5	21±0,3	14±0,1	12±0,1	14±0,2

Примітка: $p < 0,05$

З метою поглибленого вивчення антибактеріальних властивостей розчинів наступним етапом наших досліджень було визначено мінімально-прігнічуючу (МПК) та мінімальну бактерицидну концентрацію (МБК) методом серійних розведень в бульйоні. Встановлено, що середнє арифметичне значення МПК розчинів з кори, зелених суплідь та дилась у межах від 0,2 до 1,5 млг/мл (для розчинів з стиглих суплідь – 0,5 млг/мл, для інших – 0,8-1,5 млг/мл, для альтану – 0,6 млг/мл).

У дослідах *in vitro* була вивчена антимікробна активність різноманітних сполук, отриманих різними способами екстрактів з кори, листя та суплідь душекї зеленої. Було встановлено, що етілацетатні та спиртові екстракти з стиглих суплідь володіють високою антибактеріальною дією по відношенню до штамів мікроорганізмів, які є збудниками гнійно-запальних процесів.

У подальшому ми вирішили розширити спектр мікроорганізмів і перевірити дію еті-

листа складало на рівні 0,5 млг/мл і цей показник достовірно не відрізнявся для різних штамів мікроорганізмів, за виключенням палички синьо-зеленого гною та протею – 1,0 млг/мл. МПК для екстрактів із стиглих суплідь складало 0,2-0,35 млг/мл. Для контрольного препарату – 0,35 млг/мл.

Також було встановлено, що МБК знаходилацетатного та спиртових екстрактів на патогенні штами, які викликають інфекційні захворювання (дифтерію, сальмонелез, дизентерію).

Для визначення антибактеріальної дії досліджуваних речовин по відношенню до патогенних штамів (сальмонела, шигела, коринебактерія дифтерії) – збудників інфекційних захворювань, проводили методом дифузії в агар та серійних розведень. У дослід брали тільки музейні штами. Було встановлено, що спиртові екстракти поліфенольних сполук душекї зеленої володіють антимікробною дією по відношенню до штамів дифтерії, сальмонел та шигели. Діаметри зон

затримки росту складала по відношенню до дифтерії 20-22 мм, по відношенню до грам-

негативної флори (сальмонела і шигела) 17-19 мм. Дані надані в табл. 2.

Таблиця 2

Антибактеріальна активність екстрактів стиглих суплідь по відношенню до мікроорганізмів, що викликають інфекційні захворювання

Мікроорганізми	Діаметри зон затримки росту в мм $M \pm m$			
	Етілацетатний екстракт із стиглих суплідь	30% спиртовий екстракт із стиглих суплідь	Водний екстракт із стиглих суплідь	50% спиртовий екстракт із стиглих суплідь
<i>Shigella flexneri</i> 170	21±0,4	17±0,2	17±0,1	18±0,3
<i>Salmonella paratyphi A</i> 290	20±0,3	18±0,2	17±0,1	18±0,1
<i>Salmonella paratyphi B</i> 42	18±0,1	15±0,3	16±0,1	17±0,3
<i>Salmonella typhimurium</i> 144	19±0,1	16±0,2	16±0,1	18±0,2
<i>Enterobacter aerogenes</i> 418	23±0,4	18±0,2	16±0,1	17±0,1
<i>Corynebacterium diphtheria mitis</i> 6	23±0,4	20±0,3	18±0,1	19±0,2
<i>Corynebacterium diphtheria gravis</i> 14	24±0,5	20±0,3	18±0,2	19±0,2

Примітка: $p < 0,05$

З метою поглибленого вивчення антибактеріальної активності було вирішено провести дослід на клінічних штамів мікроорганізмів, які виділялись від хворих з різними гнійно-запальними процесами (стафілококи, кишкова паличка та паличка синьо-зеленого гною, кандиди, протей, стрептококи). Однак ми не змогли отримати клінічні штами патогенних бактерій (дифтерії, сальмонели, шигели) за відсутності їх або по запобіганню порушень санітарно-епідемічного режиму.

Вивчення антибактеріальної активності досліджуваних препаратів по відношенню до клінічних штамів показало, що ці сполуки володіють чутливістю до отриманих бактерій. Діаметри зон затримки росту складала 13-20 мм і відрізнялись за цими показниками від стандартних. Однак у етілацетатного та спиртових екстрактів ці показники відрізнялись на 2-3 мм і не впливали на загальні результати дослідів (табл. 3).

Таблиця 3

Антибактеріальна активність препаратів по відношенню до клінічних штамів мікроорганізмів, виділених від хворих із запальними процесами

Мікроорганізми	Діаметри зон затримки росту в мм $M \pm m$			
	Етілацетатний екстракт із стиглих суплідь	30% спиртовий екстракт із стиглих суплідь	Водний екстракт із стиглих суплідь	50% спиртовий екстракт із стиглих суплідь
<i>S. aureus</i>	20±0,5	16±0,2	15±0,1	15±0,1
<i>E. coli</i>	18±0,2	15±0,1	12±0,1	17±0,2
<i>P. vulgaris</i>	17±0,1	15±0,2	14±0,1	14±0,1
<i>P. aeruginosa</i>	15±0,1	13±0,1	14±0,1	14±0,1
<i>C. albicans</i>	14±0,1	13±0,1	14±0,1	15±0,1
<i>S. pyogenes</i>	19±0,1	15±0,1	17±0,1	16±0,2

Примітка: $p < 0,05$

Вивчення імуномодулюючої дії свідчать, що сублетальне випромінювання приводило до появи в селезінці 10,1±0,8 КУК, а введення батьківських лімфоцитів у відповідній

дозі знижувало число ендogenous КУК до 4,4±0,48, т.е. інгібіція складала 56,5%.

Таблиця 4

Вплив етілацетатного екстракту на реакцію «трансплантат проти хазяїна»

Речовина	Доза речовини, мг/кг	Доза лімф. клітин ($\times 10^6$)	Середнє число КУК на селезінку сублетально опромінюваних мишей ($M \pm m$)	Індекс інактивації КУК (%)	Вірогідність інгібіції (P)
-	-	-	10,1±0,08	-	-
-	-	0,8	4,4±0,48	56,5	-
Етілацетатний екстракт стиглих суплідь	0,1	0,8	4,6±0,81	54,7	<0,05
T-активін	0,1	0,8	6,0±0,54	40,6	<0,05

Іншими словами, ці дані характеризують активність трансплантованих лімфоцитів

проти ендogenous КУК. Введення етілацетатного екстракту і T-активіна одночасно з

трансплантацією батьківських лімфоцитів суттєво не впливало на число ендогенних КУК, що свідчить про відсутність впливу на пересаджені клітини (табл. 4).

Етілацетатний екстракт у досліджуваній дозі не чинив будь-якої дії на активність трансплантованих лімфоцитів і не впливав на ступінь реакції "трансплантат проти хазяїна".

Як свідчать надані дані табл. 5, при індукції ГПГ у сенсibiliзованих тварин інтенсив-

ність реакції складала 24,7% (2-а група). Після введення розчину етілацетатного екстракту стиглих суплідь ІР дорівнювався до 34,2%. Усе вищесказане свідчить про підвищення активності формування ГПГ під впливом екстракту.

Оскільки ГПГ формується відповідно лімфоцитами-ефекторами, можна зробити висновок, що досліджуваний етілацетатний екстракт є стимулятором клітинної ланки імунітету.

Таблиця 5

Вплив розчину екстракту на реакції ГПГ, індуковану ЕБ у інтактних мишей

Група	Етілацетатний екстракт стиглих суплідь	Доза мг/кг	Число тварин	ІР, %	Р
Контроль – 1 (тільки дозволяюча доза)	-	-	21	8,80±0,89	-
Контроль – 2 (сенсibiliзована + дозволяюча доза*)	-	-	18	24,70±2,68	-
Контроль – 3 (сенсibiliзуюча дозволяюча доза)	Розчин екстракту		18	34,20±3,83	<0,05

* - за 100% прийнята інтенсивність ГПГ в 2-ій групі; Р – по відношенню до групи 2.

ВИСНОВКИ

1. Отримані поліфенольні сполуки з різних частин рослин душекії зеленої володіють антибактеріальною активністю.
2. Етілацетатний екстракт із стиглих суплідь душекії зеленої проявив високі антибактеріальні властивості по відношенню до широкого спектру мікроорганізмів різних таксономічних груп у порівнянні з препаратом альтан, який був отриманий із вільхи клейкої та випускається фармацевтичною промисловістю.

3. Етілацетатний екстракт не чинив будь-якої дії на активність трансплантованих лімфоцитів і не впливав на ступінь реакції "трансплантат проти хазяїна", а також є стимулятором клітинної ланки імунітету.

Проведені дослідження вказують, що етілацетатний екстракт, отриманий із стиглих суплідь душекії зеленої, володіє антибактеріальною та імуностимулюючою активністю і в подальшому може бути використаний при розробці антибактеріального та імуностимулюючого препарату.

ЛІТЕРАТУРА

1. Машковський М.Д. "Лекарственные средства" в 2-х томах, Т. 2. Изд. перераб., исправл. и дополн. - ООО "Новая Волна". - 2002. - С. 398.
2. Кьосев П. А. Полный справочник лекарственных растений. -М.:ЭКСМО-ПРЕСС.- 2001. - 992 с.
3. Радько Е.В., Кулагина М.А., Самура Б.А., и др. // Сб. Лекарства-человеку. - 2001. - Т. XVI. - №1-2. - С.419-425.
4. Данилова О.І., Щелкунов Л.Ф., Дудкін М.С. // Сб. Лекарства-человеку - 2002. - Т. XVIII. - №3. - С.13-15.
5. Мазулин Г.В., Герасимов В.Н., Мазулин А.В. // Сб. Лекарства-человеку. - 2002. - Т. XVIII.- №3.- С. 37-39.
6. Данилова О.І., Денісюк Н.А., Решта С.П., та ін. // Сб. Лекарства-человеку. - 2002. - Т. XVIII. - №3.- С. 10-12.
7. Доля І.С., Стець В.П., Мозуль В.І., та ін. // Сб. Лекарства-человеку. - 2001. - Т. XVI. - № 1-2. - С. 167-174.
8. Патент 56771, Україна, МПКІ А61К35/78 "Спосіб отримання протимікробного, кровоспинного та цитотоксичного засобу". Заявл. 15.05.2003 Бюл. № 5.
9. Беляевская С.Ю., Осолодченко Т.П., Батрак Е.А., и др. // Экспериментальная і клінічна медицина. - 2004. - № 4. - С. 75-79.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И ИМУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЭКСТРАКТОВ DUSCHEKIA VIRIDIS

С.Ю. Беляевская¹, М.А. Кулагина², Т.П. Осолодченко¹, Е.В. Радько², А.Г. Сербин², Е.В. Порт¹

¹Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины, Харьков

РЕЗЮМЕ

Изучена антибактериальная активность и иммуностимулирующее действие полифенольных соединений *Duschekia viridis* на музейные и клинические штаммы микроорганизмов. Этилацетатный экстракт из зрелых соплодий обладает противомикробным действием в отношении широкого спектра микроорганизмов и в дальнейшем может быть использован для получения нового антибактериального и иммуностимулирующего препарата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микроорганизмы, растительные экстракты, антибактериальная активность, иммуностимулирующее действие

THE STUDING ANTIBACTERIAL AND IMMUNOPOTENTIAL ACTIVITY POLYPHENOL SUBSTAINTES OF EXTRAKTIS DUSCHEKIA VIRIDIS

S. Yu. Belyaevskya¹, M. A. Kulagina², T. P. Osolodchenko¹, E. V. Radko², A. G. Serbin², E. V. Port¹

¹I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of AMS of Ukraine, Kharkov

²University of Pharmacology of National, Kharkov

SUMMARY

Antibacterial and immunopotential activity of polyphenolic substaites from *Duschekia viridis* in museums's and clinical strains of microorganisms was studies. Ethylacetac extractis of ripe blossoms has antimicrobial activity to wide spectrum of microorganisms and in future can be used for introduction of new antibacterial and immunopotential drug.

KEY WORDS: microorganisms, extract's of plants, antibacterial and immunopotential activity