

УДК 58.083+615.322

М.А. Краснобородкина
М.С. Иванова
М.Г. Куцев

M.A. Krasnoborodkina
M.S. Ivanova
M.G. Kucev

ВЫДЕЛЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ И КОМПОЗИЦИЙ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТЕНИЙ ЕСТЕСТВЕННОЙ ФЛОРЫ, ПРОЯВЛЯЮЩИХ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

ISOLATION OF THE COMPOUNDS AND COMPOSITIONS OF MATTER FROM A PLANT OF THE NATURAL FLORA, EXHIBITS BIOLOGICAL ACTIVITY AGAINST CONDITIONALLY PATHOGENIC MICROORGANISMS OF CONDITIONALLY PATHOGENIC

Растительные препараты находят широкое применение в медицине, так как обладают малой токсичностью, мягкостью действия и редким проявлением токсических реакций. При исследований CO_2 -экстрактов растений естественной флоры Алтая, при помощи микрометода серийных разведений, выявлены образцы, проявляющие высокую антибиотическую активность в отношении условно-патогенного штамма XL-1 blue *Escherichia coli*. К ним относятся *Pentaphylloides fruticosus* и *Ribes nigrum*. Данные экстракты перспективны для использования в медицинской и фармацевтической промышленности, так как у них низкая минимальная подавляющая концентрация. Экстракт представлен в густом или сухом виде и может быть использован в форме таблеток, горошин, капсул, мазей, суппозиториев, капель, кремов, гелей.

Частота опасных для жизни инфекций вызванных патогенными микроорганизмами увеличивается во всем мире и становится важной причиной заболеваемости и смертности у пациентов с ослабленным иммунитетом в развивающихся странах (Al-Bari et al., 2006). Все большую распространенность приобретают штаммы бактерий с множественной лекарственной устойчивостью и, недавно появившиеся, штаммы со сниженной чувствительностью к антибиотикам, увеличивается спектр «неизлечимых» бактериальных инфекций (Zu et al., 2005). В результате чего требуется поиск более эффективных антибиотических препаратов. В настоящее время широкое применение в медицинской практике находят лекарственные средства растительного происхождения, обладающие малой токсичностью, мягкостью действия и редким проявлением аллергических реакций. При этом далеко не все растения полностью исследованы на наличие веществ, проявляющих свои антимикробные свойства.

В связи с этим, разработка антибиотических препаратов на основе биологически активных веществ из экстрактов растений естественной флоры является актуальным и необходимым направлением исследований. Вырабатываемая со временем микроорганизмами резистентность к большинству антибиотиков обуславливает потребность в поиске все более эффективных лекарственных средств. Разнообразие растений на территории Алтая дает большой потенциал для обнаружения новых химических соединений, в том числе и с антибактериальной активностью.

Целью исследования являлось выявление соединений из растений естественной флоры Алтая, проявляющих антибиотическую активность в отношении условно-патогенных микроорганизмов.

Получение исследуемых экстрактов происходило при помощи сверхкритической флюидной экстракции с CO_2 растворителем. В настоящее время это наиболее эффективный и перспективный метод получения липофильной фракции соединений. Сверхкритическая флюидная экстракция (СКФ) – это технология, заключающаяся в переходе газа до сверхкритической точки, в результате чего газ переходит в сжиженное состояние для наилучшего растворения биологически активных веществ, а также благодаря своим свойствам растворитель легко удаляется, достаточно сбросить давление. Работа проводилась на лабораторной экстракционной системе SFE-200-2-FM, для проведения экстрагирования изначально подбирались оптимальные давление, температура, время для получения наибольшего выхода активных веществ.

Для изучения биологической активности экстрагированных веществ на условно-патогенных микроорганизмах был использован микрометод серийных разведений на жидких средах. Этот метод позволяет

определить основной количественный показатель, характеризующий микробиологическую активность антибиотического препарата – минимальная подавляющая концентрация (МПК). МПК – минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре (Определение..., 2004). Преимуществами этого метода являются высокая производительность и возможность длительного хранения заранее приготовленных планшетов. Тестирование проводится при величине конечного объема 0,2 мл и меньше, что позволяет значительно сократить количество расходных материалов (Веслополова, 1995).

В качестве среды для роста культуры использовалась среда LB (среда Лурия-Бертани). Для ее приготовления на 100 мл берется 1 г триптона бактериального, 0,5 г дрожжевого экстракта, 1 г NaCl. Помещают колбу в автоклав на 30 минут, после чего остужают, разливают на 2 колбы. Одну колбу заселяют бактериями и помещают в термостат при температуре 37 °С на 4 часа, вторую – ставят в холодильник для дальнейшего использования в эксперименте (Галынкин и др., 2006).

Следующий этап – приготовление планшеты. Среду для определения чувствительности бактерий разливают по 100 мкл в каждую лунку. Готовится рабочий раствор с исследуемыми экстрактами 1:1 (LB : экстракт), а также один раствор с антибактериальным препаратом для контроля. Затем рабочий раствор в количестве 100 мкл при помощи микропипетки вносят в первую пробирку, содержащую изначально 100 мкл среды. Тщательно перемешивают и переносят 100 мкл раствора из первой пробирки во вторую, содержащую первоначально 100 мкл бульона. Эту процедуру повторяют, пока не будет приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последней пробирки 100 мкл удаляют. Затем добавляется краситель Alamar blue и бактерии. Помещается в термостат на 2 часа. Краситель Alamar blue необходим для визуализации эксперимента, т. к. при инкубировании с жизнеспособными клетками цвет реагента изменяется от синего к розовому и появляется флуоресценция. Это изменение можно обнаружить с помощью микропланшетного ридера.

Таблица 1

Влияние CO₂-экстрактов растений на штамм *Escherichia coli* XL-1 blue

Название вида	Степень разведения											
	*2	*4	*8	*16	*32	*64	*128	*256	*512	*1024	*2048	*4096
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>Silybum marianum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. <i>Antennaria dioica</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3. <i>Thymus marschallianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4. <i>Inula salicifolia</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. <i>Inula helenium</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6. <i>Picea obovata</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7. <i>Geranium sibirica</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8. <i>Trollius altaicus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9. <i>Hippophae rhamnoides</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10. <i>Ribes nigrum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
11. <i>Hesperis sibirica</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
12. <i>Vaccinium vitis-idea</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13. <i>Penthaphylloides fruticosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
14. <i>Onobrichis arenaria</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
15. <i>Ranunculus submarginatus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
16. <i>Papaver pseudocanescens</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17. <i>Panzerina lanata</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Анализ проводился в 96 луночных иммуноферментных планшетах, делались серийные разведения 7 экстрактов (в каждом горизонтальном ряду разведение одного экстракта), 8 ряд использовался для контроля, где находился антибиотик широкого спектра действия – канамицин. Лунку H12 заполняли только средой LB, чтобы ридер мог снять опорный спектр.

Канамицин – антибиотик широкого спектра, бактерицидное и противотуберкулезное средство. Активен в отношении *Mycobacterium tuberculosis*, в т.ч. штаммов, устойчивых к стрептомицину, изониазиду и другим противотуберкулезным средствам, кроме виомицина и капреомицина. Действует на большинство гамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus* spp., кроме метициллинорезистентных штаммов), включая микроорганизмы, устойчивые к тетрациклину, эритромицину, хлорамфениколу и кислотоустойчивые бактерии. Не действует на *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., анаэробы, дрожжевые грибы, вирусы и простейшие (Канамицин. ГРЛС).

Из данных, представленных в таблице 1, следует, что антимикробные свойства при наиболее низких концентрациях проявил экстракт *Pentaphylloides fruticosus*. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) экстракта *Pentaphylloides fruticosus* сопоставима с концентрацией канамицина 0,0353 мг/мл. Под МПК понимается наименьшая концентрация антибиотика (мг/л или мкг/мл), которая *in vitro* полностью подавляет видимый рост бактерии (NCCLS., 1999). МПК характеризует степень чувствительности возбудителя к антибиотику: чем ниже МПК, тем выше чувствительность. Полученный экстракт потенциально возможно использовать в медицинской и фармацевтической промышленности, так как у него низкая МПК, экстракт представлен виде густого или сухого экстракта и может быть использован в форме таблеток, горошин, капсул, мазей, суппозиторий, капель, кремов, гелей.

Также хорошую антибиотическую активность против условно-патогенного штамма *Escherichia coli* XL-1 blue проявил экстракт *Ribes nigrum*. Его МПК проявляется при разведении в 32 раза, что соответствует концентрации канамицина 0,283 мг/мл. Данный экстракт также перспективен для использования в медицинской и фармацевтической промышленности.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет» Код проекта: 316. Также при поддержке проекта проекта НШ-1417.2014.4.

ЛИТЕРАТУРА

- Весполова Е.Ф. Микрометод определения численности колониеобразующих микроорганизмов // Микробиология, 1995. – Т. 64, №2. – С. 279–284.
- Галынкин В.А., Заикина Н.А., Кочеровец В.И., Курбанова И.З. Питательные среды. – СПб., 2006. – 336 с.
- Канамицин. ГРЛС [Электрон. ресурс]: режим доступа – <http://grls.rosminzdrav.ru/>.
- Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04) // Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия, 2004. – Т. 6, № 4. – С. 306–359.
- Al-Bari M.A., Sayeed M.A., Rahman M.S., Mossadik M.A. Characterization and antimicrobial activities of a phenolic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshensis*, a novel species collected in Bangladesh // Res. J. Medicine & Med. Sci., 2006. – № 1. – P. 77–81.
- NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement M100-S9, 1999. – Vol. 19, № 1. – 53 p.
- Zy E.A., Area A., Aam K. Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts in Palestine // Pak. J. Med. Sci., 2005. – № 21. – P. 187–193.

SUMMARY

Herbal preparations are widely used in medicine, as they have low toxicity, soft action and a rare manifestation of toxic reactions. When research of CO₂-extracts of plants of the natural flora of the Altai, with the help micromethod serial dilutions, revealed samples exhibiting high antibiotic activity against opportunistic pathogenic strain XL-1 blue *Escherichia coli*. These include *Pentaphylloides fruticosus* and *Ribes nigrum*. These extracts are promising for use in the medical and pharmaceutical industries, as they have a low minimum inhibitory concentration. The extract was submitted to a thick or dry form and may be used in the form of tablets, peas, capsules, ointments, suppositories, drops, creams, gels.