

Н.В. Кашпур¹, А.Ю. Волянський¹, А.М. Ковальова², Т.В. Ільїна², В.В. Казмірчук¹, О.В. Очкур²

Дослідження формування резистентності патогенних мікроорганізмів і грибів роду *Candida* до ліпофільних фракцій *Artemisia absinthium* L.

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України», м. Харків,²Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: полин, *Artemisia*, ліпофільні фракції, антибіотикорезистентні штами мікроорганізмів.

Ключевые слова: полынь, *Artemisia*, липофильные фракции, антибиотикорезистентные штаммы микроорганизмов.

Key words: wormwood, *Artemisia*, lipophilic fractions, antibiotic-resistant strains of microorganisms.

В умовах розповсюдження антибіотикорезистентності актуальним є пошук субстанцій, до яких не формується стійкість патогенних мікроорганізмів. Доцільним стало вивчення формування резистентності грампозитивних, грамнегативних мікроорганізмів і грибів роду *Candida* до найбільш перспективних за протимікробною активністю ліпофільних фракцій представників роду *Artemisia*. Науковий інтерес представляє, насамперед, офіцинальний вид полин гіркий (*Artemisia absinthium*). При багаторазових пересівах штамів грампозитивних, грамнегативних мікроорганізмів і грибів *C. albicans* на середовищах, що містили зростаючі концентрації ліпофільних фракцій трави *Artemisia absinthium*, встановлено досить повільне формування резистентності до них *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885-653. Повільне формування резистентності свідчить про перспективність дослідження ліпофільних фракцій трави *Artemisia absinthium* з метою створення на їх основі протимікробних засобів.

В умовах розповсюдження антибіотикоустойчивости актуальним является поиск субстанций, к которым не формируется стойкость патогенных микроорганизмов. Целесообразным стало изучение формирования резистентности грамположительных, грамотрицательных микроорганизмов и грибов рода *Candida* к наиболее перспективным по противомикробной активности липофильных фракций представителей рода *Artemisia*. Научный интерес представляет, в первую очередь, официальный вид полынь горькая (*Artemisia absinthium*). При многократных пересевах штаммов микроорганизмов и грибов на средах, которые содержали растущие концентрации липофильных фракций травы *Artemisia absinthium*, установлено достаточно медленное формирование резистентности к ним *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885-653. Медленное формирование устойчивости свидетельствует о перспективности исследования липофильных фракций травы *Artemisia absinthium* с целью создания на их основе противомикробных средств.

In the conditions of the drug resistance distribution a search of substances to which pathogenic microorganisms do not form resistance is an urgent question. It was appropriate to study the forming of resistance of gram-positive, gram-negative microorganisms and fungi of *Candida* genus to the most perspective lipophilic fractions of representatives of *Artemisia* genus, which posse antimicrobial activity. *Artemisia absinthium*, an official specie, is of the strongest scientific interest. At the multiple subculturings of cultures of microorganisms and fungi on the environments which contained the encreasing concentrations of lipophilic factions of *Artemisia absinthium* herb, the slow forming of resistance was characteristic for *S. aureus* ATSS 25923, *E. coli* ATSS 25922, *C. albicans* ATSS 885-653. The slow forming of resistance testifies a perspective of further research of lipophilic factions of *Artemisia absinthium* herb with the purpose of creation of antimicrobial preparations.

Однією з найважливіших проблем охорони здоров'я залишається антибіотикорезистентність, що набула глобального характеру [8]. Розвиток резистентності багатьох бактеріальних патогенів до протимікробних засобів часто робить терапію неефективною. Труднощі лікування і профілактики інфекційних захворювань, пов'язаних з різноманітністю біологічних форм їх збудників, постійним виникненням резистентних форм, появою нових видів небезпечних патогенних мікроорганізмів визначають актуальність проблеми створення ефективних антимікробних лікарських засобів [1,4,5,7,9]. В умовах розповсюдження антибіотикорезистентності

актуальним є пошук субстанцій, до яких не формується стійкість патогенних мікроорганізмів.

Раніше виявлено протимікробну активність комплексів біологічно активних речовин представників роду *Artemisia* [1,2].

Мета роботи

Вивчення формування резистентності грампозитивних, грамнегативних мікроорганізмів і грибів роду *Candida* до найбільш перспективних за протимікробною активністю ліпофільних фракцій представників роду *Artemisia*. Науковий інтерес представляє, насамперед, офіцинальний вид полин гіркий (*Artemisia absinthium*).

Матеріали і методи дослідження

Об'єктами дослідження були хлороформна та етилацетатно-спиртова (8:2) фракції, отримані з повітряно-сухої трави полину гіркокого *Artemisia absinthium* методом циркуляційної екстракції в апараті Сокслета шляхом послідовної обробки сировини розчинниками у порядку зростання їх діелектричної сталості [6]. У досліджах використовували спиртові розчини густих екстрактів, отриманих шляхом випаровування розчинників за кімнатної температури. У хлороформній фракції полину гіркокого ідентифіковано терпеноїди (ліналоол і сабінол), сесквітерпеноїди та сесквітерпенові лактони, дитерпеноїди (абсинтин і анабсинтин), в етилацетатно-спиртовій – органічні кислоти, ефіри та фенольні сполуки (кумарини, флавоноїди) [3].

Вплив ліпофільних фракцій *Artemisia absinthium* на формування резистентності у мікроорганізмів досліджували *in vitro* методом пасажів [10]. Формування резистентності до досліджуваних витягів вивчали на тест-штамах *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 і *Candida albicans* ATCC 885-653; як препарати порівняння використовували відомі антибіотики гентаміцин і ністатин, а також препарат рослинного походження хлорофіліпт, що широко використовується у медицині. Всього здійснено по 30 пасажів мікроорганізмів на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) за наявності досліджуваних фракцій. МПБ розли-

вали по 2 мл у пробірки, в які додавали розчини фракцій, паралельно у пробірки з МПБ додавали препарати порівняння. Після цього додавали тест-мікроорганізми в об'ємі 0,2 мл з посівною дозою 109 КУО/мл. Інкубували дослідні пробірки протягом 24 годин в термостаті за температури 27°C. Матеріалом для кожного наступного пасажу була культура, що давала ріст на середовищі, в якому міститься найбільша кількість субстанції. Культури мікроорганізмів виділяли з колоній, що утворювались на твердому поживному середовищі. Результати досліджень статистично обробляли, використовуючи непараметричний метод хі-квадрат, за допомогою програми Biostat.

Результати та їх обговорення

Результати дослідження формування резистентності *S. aureus* до ліпофільних фракцій *Artemisia absinthium* (табл. 1, рис. 1) свідчать, що формування резистентності тест-штаму *S. aureus* до хлороформного (ХЛАаб) та етилацетатно-спиртового (ЕТАаб) витягів полину гіркокого відбувалось повільно, проте нерівномірно.

Якщо після 5 пасажів вихідна мінімальна бактеріостатична концентрація (МБстК) не зростала для обох фракцій, то після 10 пасажів для хлороформної фракції вона зберігалась на вихідному рівні, а для етилацетатно-спиртової – зростала у двічі. Після 15 пасажів чутливість *S. aureus* до досліджуваних субстанцій знизилась у двічі й залишалась такою для хлороформної фракції, а для етилацетатно-спиртової – знизилась у 4 рази після 20

Таблиця 1

Формування резистентності *S. aureus* ATCC 25923 до ліпофільних фракцій *Artemisia absinthium*

Ліпофільні витяги		Вихідна МБстК фракцій (М±m) *	МБстК фракцій після n кількості пасажів (М±m)					
			5	10	15	20	25	30
ХЛ Ааб	МБстК (мкг/мл) (М±m)	31,25±0,1	31,25±0,2	31,25±0,3	62,5±0,3	62,5±0,4	125±0,4	125±0,6
	кратність збільшення МБстК	0	0	0	2	2	4	4
ЕТ Ааб	МБстК (мкг/мл) (М±m)	62,5±0,3	62,5±0,3	125±0,6	125±0,7	250±0,8	500±0,9	500±0,8
	кратність збільшення МБстК	0	0	2	2	4	8	8
Хлорофіліпт	МБстК (мкг/мл) (М±m)	31,25±0,1	31,25±0,1	31,25±0,3	125±0,7	125±0,6	125±0,5	500±0,9
	кратність збільшення МБстК	0	0	0	4	4	8	16
Гентаміцин	МБстК (мкг/мл) (М±m)	0,4±0,02	0,8±0,02	1,6±0,03	3,2±0,01	6,25±0,02	6,25±0,02	12,8±0,01
	кратність збільшення МБстК	0	2	4	8	16	16	32

Примітки: n – кількість пасажів; * – хі-квадрат = 11,255, P ≤ 0,01; М ± m – середнє значення концентрації ± похибка середнього значення.

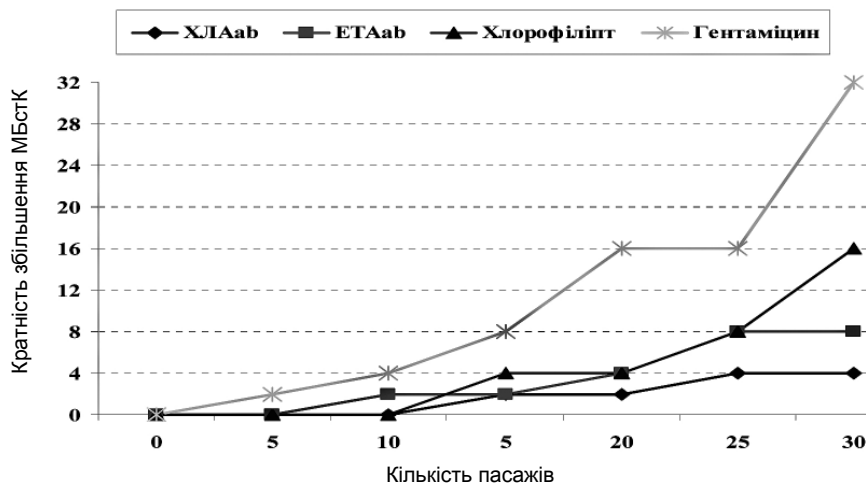


Рис. 1. Формування резистентності *S. aureus* ATCC 25923 до хлороформної та етилацетатно-спиртової фракції *Artemisia absinthium*.

пасажів. Після 25 пасажів для хлороформного витягу зареєстровано зростання МБстК у 4 рази, що залишалась незмінною до 30 пасажів; надалі її зростання не спостерігали. Для етилацетатно-спиртової фракції МБстК у порівнянні з вихідним рівнем після 10 пасажів збільшилась у двічі; після 15 – зберігалась на тому ж рівні, після 20 пасажів – збільшилась у 4 рази; від 25 до 30 пасажів відзначено її зростання у 8 разів; після 30 пасажів МБстК залишалась на тому ж рівні.

Вихідна МБстК хлорофіліпту для штаму *S. aureus* становила 31,25 мкг/мл; після 15 пасажів вона зросла у 4 рази та після 25 пасажів досягла 250,0 мкг/мл, перевищуючи вихідний рівень у 8 разів. На момент закінчення експерименту МБстК хлорофіліпту становила 500,0 мкг/мл, що перевищувало вихідну концентрацію у 16 разів.

Вихідна МБстК гентаміцину для *S. aureus* становила 0,4 мкг/мл. Після 5 пасажів вона зросла у двічі, після 10 досягла 1,6 мкг/мл, тобто перевищила вихідний рівень у 4 рази. Після 15 пасажів МБстК гентаміцину зросла у 8 разів, а після 20 – у 16 разів та зберігалась на цьому рівні

після 25 пасажів. На момент закінчення експерименту МБстК гентаміцину становила 12,8 мкг/мл, що перевищувало вихідну концентрацію у 32 рази.

Отже, після 30 пасажів чутливість *S. aureus* ATCC 25923 до хлороформного й етилацетатно-спиртового витягів *Artemisia absinthium* зменшилась відповідно у 4 і 8 разів, що свідчить про досить повільне формування резистентності *S. aureus* до досліджуваних об'єктів. Відносно препаратів порівняння гентаміцину та хлорофіліпту формування резистентності відбувалось досить активно.

Подібною була швидкість зростання резистентності *E. coli* ATCC 25922 до досліджуваних фракцій (табл. 2, рис. 2).

Так, після 5 пасажів у жодній фракції вихідна МБстК не зростала. Після 10 пасажів МБстК етилацетатно-спиртової фракції залишалась на вихідному рівні, а для хлороформної – зростала у двічі. Після 15 пасажів для обох фракцій вона перевищувала вихідні рівні у двічі, а до 25 пасажів МБстК фракцій зростала та перевищила вихідний рівень у 4 рази. Після завершення експерименту

Таблиця 2

Формування резистентності *E. coli* ATCC 25922 до ліпофільних фракцій *Artemisia absinthium*

Ліпофільні витяги		Вихідна МБстК фракцій (M±m) *	МБстК фракцій після n кількості пасажів (M±m)					
			5	10	15	20	25	30
ХЛ Ааб	МБстК (мкг/мл) (M±m)	250±0,8	250±0,8	500±0,7	500±0,8	1000±14,2	1000±12,3	2000±22,2
	кратність збільшення МБстК	0	0	2	2	4	4	8
ЕТ Ааб	МБстК (мкг/мл) (M±m)	250±0,9	250±0,7	250±0,8	500±0,8	500±0,9	1000±10,2	1000±14,2
	кратність збільшення МБстК	0	0	0	2	4	8	8
Хлорофіліпт	МБстК (мкг/мл) (M±m)	250±0,6	250±0,7	250±0,8	1000±11,2	2000±22,2	4000±32,6	8000±51,2
	кратність збільшення МБстК	0	0	0	4	8	16	32
Гентаміцин	МБстК (мкг/мл) (M±m)	0,4±0,01	0,8±0,03	1,6±0,03	3,2±0,03	6,25±0,01	6,25±0,01	12,8±0,02
	кратність збільшення МБстК	0	2	4	8	16	16	32

Примітки: n – кількість пасажів; * – хі-квадрат = 11,255, P ≤ 0,01; M ± m – середнє значення концентрації ± похибка середнього значення.

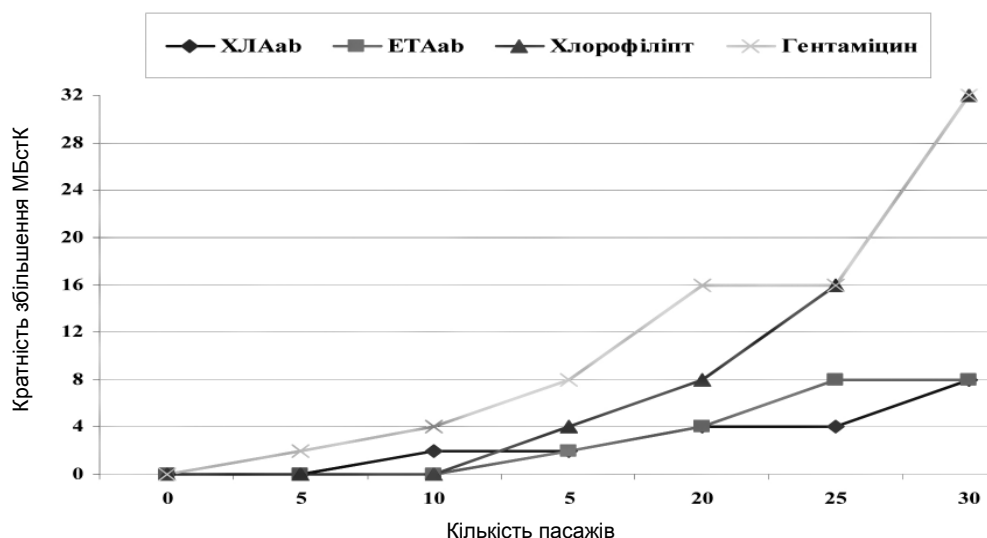


Рис. 2. Формування резистентності *E. coli* ATCC 25922 до хлороформного й етилацетатно-спиртового витягів *Artemisia absinthium*.

ту МБстК етилацетатно-спиртової фракції залишилися на такому ж рівні, а хлороформної – зросла у 8 разів після 30 пасажів.

Отже, після 30 пасажів чутливість *E. coli* ATCC 25922 до хлороформної та етилацетатно-спиртової фракцій полину гіркокого зменшувалась у 4–8 разів. Отримані результати свідчать про повільне формування резистентності грамнегативних мікроорганізмів до ліпофільних фракцій *Artemisia absinthium*.

Формування резистентності *C. albicans* ATCC 885-653 до хлороформної та етилацетатно-спиртової фракції відбувалось дуже повільно і однаково (табл. 3, рис. 3). Після 5 і 10 пасажів вихідна мінімальна фунгістатична концентрація (МФстК) не зростала. Після 15 пасажів МФстК зросла у двічі. Чутливість *C. albicans* до досліджуваних субстанцій після 20 пасажів зросла у 4 рази,

після 25 пасажів зростання МФстК не спостерігалось, після 30 пасажів МФстК зросла у порівнянні з вихідним рівнем у 8 разів.

Вихідна МФстК препарату порівняння ністатину становила 50,0 мкг/мл. Після 5 пасажу вона зростала у двічі, а після 10 перевищувала вихідний рівень у 4 рази, після 15 – у 8 разів, після 20 – у 16, після 25 – у 32 рази та залишалась на цьому рівні (1600,0 мкг/мл) до закінчення експерименту.

Вихідна МФстК препарату порівняння хлорофіліпту становила 1000,0 мкг/мл. Після 10 пасажів вона зросла у двічі, після 15 перевищувала вихідний рівень у 4 рази, після 25 – у 8 разів, після 30 – у 16 разів і залишалась на цьому рівні (16000,0 мкг/мл) до закінчення експерименту.

Чутливість цього штаму до препарату порівняння ністатину змінювалась набагато швидше, та після завершення експе-

Таблиця 3

Формування резистентності *C. albicans* ATCC 885-653 до ліпофільних фракцій *Artemisia absinthium*

Ліпофільні витяги		Вихідна МБстК фракцій (M±m) *	МБстК фракцій після л кількості пасажів (M±m)					
			5	10	15	20	25	30
ХЛАаб	МБстК (мкг/мл) (M±m)	250±2,1	250±2,7	500±2,8	500±2,2	1000±13,4	1000±12,2	2000±5,8
	кратність збільшення МБстК	0	0	2	2	4	4	8
ЕТАаб	МБстК (мкг/мл) (M±m)	250±2,3	250±2,5	250±1,9	500±2,9	1000±13,6	1000±10,4	2000±5,4
	кратність збільшення МБстК	0	0	0	2	4	4	8
Хлорофіліпт	МБстК (мкг/мл) (M±m)	1000±11,2	1000±13,4	2000±5,5		4000±12,7	8000±25,8	16000±45,2
	кратність збільшення МБстК	0	0	2	4	4	8	16
Ністатин	МБстК (мкг/мл) (M±m)	50±0,3	100±0,7	200±0,9	400±1,3	800±4,3	1600±4,9	1600±5,2
	кратність збільшення МБстК	0	2	4	8	16	32	32

Примітки: n – кількість пасажів; * – хі-квадрат = 11,255, P ≤ 0,01; M ± m – середнє значення концентрації ± похибка середнього значення

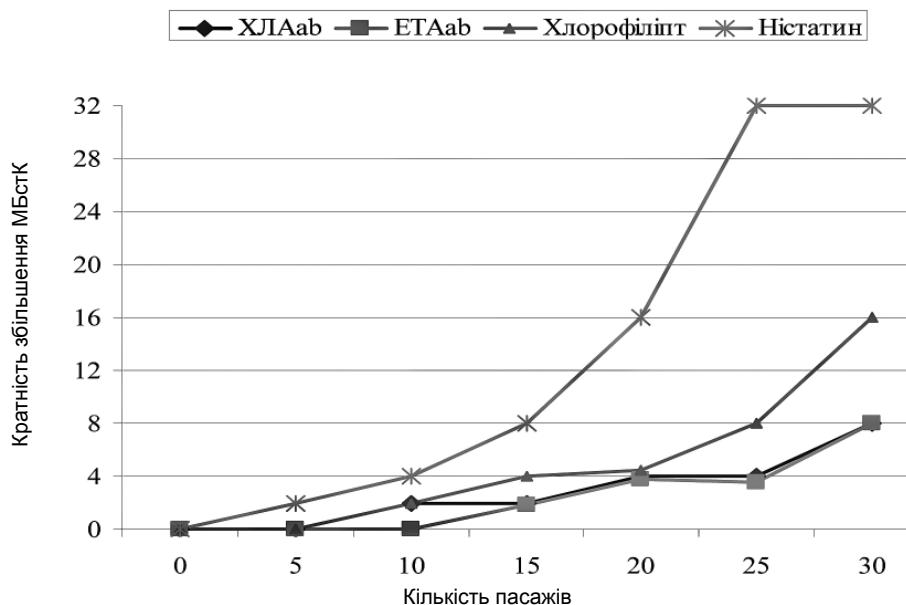


Рис. 3. Формування резистентності *C. albicans* ATCC 885-653 до етилацетатно-спиртової фракції *Artemisia absinthium*.

рименту після 30 пасажів його МФстК знизилась у 32 рази. Відносно хлорофіліпту чутливість знизилась у 16 разів.

Висновки

При багаторазових пересівах штамів грам-позитивних, грам-негативних мікроорганізмів і грибів *C. albicans* на середовищах, що містили зростаючі концентрації ліпофільних фракцій трави *Artemisia absinthium*, встановлено досить повільне формування резистентності до них *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans*

ATCC 885-653. Формування резистентності використаних штамів мікроорганізмів до референс-препаратів відбувалось набагато швидше й у більших концентраціях (значення χ^2 -квдрата дорівнює 11,255 та вище, при $P \leq 0,01$ відображує, що між контролем та експериментальними групами спостерігаються статистично значущі відмінності). Повільне формування резистентності свідчить про перспективність дослідження ліпофільних фракцій трави *Artemisia absinthium* з метою створення на їх основі протимікробних засобів.

Література

1. Галынкин В.А. Фармацевтическая микробиология / В.А. Галынкин, В.И. Кочеровец – М.: Арнебия, 2003. – 352 с.
2. Кашпур Н.В. Визначення антибактеріальної дії активних речовин роду *Artemisia* / Н.В. Кашпур, А.Ю. Волянський, Т.П. Осолодченко, І.О. Мартиросян, О.В. Очкур, А.М. Ковальова, С.М. Лахман // Теоретична і експериментальна медицина. – 2010 – №4 (49). – С. 41–44.
3. Ковальова А.М. Порівняльне хромато-мас-спектрометричне дослідження терпеноїдних сполук ефірних олій полину звичайного та полину гіркого / А.М. Ковальова, О.В. Очкур, А.О. Вальдовський // 36. трудів НМАПО. – 2009. – Вип. 18, кн. 3. – С. 444–448.
4. Сергеев А.Ю. Кандидоз. Природа інфекції, механізми агресії та захисти, лабораторна діагностика, клініка і лічення / А.Ю. Сергеев – М.: Боргес, 2000. – 472 с.
5. Страчунский Л.С. Состояние резистентности к антиинфекционным химиопрепаратам в России / Л.С. Страчунский, Т.М. Богданович, С.Н. Козлов // Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. – М.: Боргес, 2002. – С. 32–39.
6. Практикум по фармакогнозии: Учеб. пособие / Под общ. ред. В.Н. Ковалева. – Х.: Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2003. – 512 с.
7. Aarestrup F.A. Antimicrobial resistance in bacteria of animal / F.A. Aarestrup // ASM Press: Washington DC, 2006. – 442 p.
8. Antibiotic Resistance: An Ecological Perspective on an Old Problem / A report from American Academy of Microbiology, convened October 12–14, 2008, at the conference center of the Fondation Mérieux in Annecy, France. – Copyright, 2009. – 32 p.
9. Poirel L. In vivo selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum β -lactamase / L. Poirel, J.D. Pitout, L. Calvo, J.M. Rodriguez-Martinez, D. Church, P. Nordmann // Antimicrob Agents Chemother. – 2006. – №50. – P. 1525–1527.
10. Strachounski L.S. Antibiotic resistance in Russia / L.S. Strachounski, O.U. Stetsiouk // Antibiotics Chemotherapy. – 1997. - vol.1 N.4. – P. 8 - 9

Відомості про авторів:

Кашпур Н.В., мол. науковий співробітник лабораторії імунореабілітології ДУ «Інститут мікробіології і імунології ім. І.І. Мечникова».
 Волянський А.Ю., к. мед. н., зав. лабораторії імунореабілітології ДУ «Інститут мікробіології і імунології ім. І.І. Мечникова».
 Ковальова А.М., д. фарм. н., професор каф. фармакогнозії НФаУ.
 Ільїна Т.В., к. фарм. н., доцент каф. фармакогнозії НФаУ.
 Казмірчук В.В., к. мед. н., ст. науковий співробітник, зав. лабораторією протимікробних засобів ДУ «Інститут мікробіології і імунології ім. І.І. Мечникова».
 Очкур О.В., аспірант каф. фармакогнозії НФаУ.

Адреса для листування:

Кашпур Наталія Валеріївна, м. Харків, вул. Коломенська, 25, кв. 45. Тел.: (098) 424 15 79.