

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2020-24(1)-11

УДК: 615.28+582.622.1+582.752.1

БІОАВТОГРАФІЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ АКТИВНИХ КОМПОНЕНТІВ, ЩО ПРОЯВЛЯЮТЬ СИНЕРГІЗМ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ З МАКРОЛІДАМИ, ЕКСТРАКТІВ СУПЛІДЬ ВІЛЬХИ СІРОЇ *ALNUS INCANA* (L.) MOENCH. ТА КОРЕНЕВИЩ ГЕРАНІ ЛУГОВОЇ *GERANIUM PRATENSE* L.

Юрчишин О.І.

Івано-Франківський національний медичний університет (вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, Україна, 76000)

Відповідальний за листування:
e-mail: oyurchyshyn@gmail.com

Статтю отримано 29 листопада 2019 р.; прийнято до друку 27 грудня 2019 р.

Анотація. Зростання кількості виділених антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів стимулює до пошуку альтернативних джерел біологічно активних речовин, що проявляють антибіотикопотенціюючу дію та здатні блокувати механізми стійкості бактерій до антибіотиків. Метою дослідження було провести біоавтографічну ідентифікацію активних компонентів екстрактів суплідь вільхи сірої, кореневищ герані лугової та препарату "Альтан" на 90% водному етанолі, що проявили синергізм протимікробної дії з еритроміцином щодо шкірних ізолятів стафілококів з різними фенотипами MLS-резистентності. Нами проведено хроматографію на папері, тонкошарову хроматографію та біоавтографію. Статистична обробка результатів: WHONET-2017, UTHSCSA ImageTool 3.0, Microsoft Office Excel 2018. На біоавтограмах екстракту суплідь вільхи сірої та препарату "Альтан" з суббактеріостатичними концентраціями еритроміцину, засіяних культурою *S. epidermidis* з індуктивним фенотипом MLS-резистентності, недалеко від лінії старту виявлено зони з чіткими краями вираженого гальмування росту тест-культури, що вказує на наявність гідролізабельних танінів. Біоавтограми екстракту кореневищ герані лугової демонстрували присутність сполук з антибіотикопотенціюючою активністю із вираженими гідрофобними властивостями, що вказує на наявність ефірних олій. В екстрактах суплідь вільхи сірої та кореневищ герані лугової ідентифіковано активні компоненти з антибіотикопотенціюючими властивостями, а саме гідролізабельні таніни та ефірні олії. Супліддя вільхи сірої та кореневища герані лугової рекомендуються для проведення їх доклінічного і поглибленого фармакологічного дослідження.

Ключові слова: рослинні екстракти, біологічно активні речовини, еритроміцин, антибіотикорезистентність, антибіотикопотенціююча активність.

Вступ

За останні роки в світових літературних джерелах зростає число публікацій, присвячених вивченню синергічної взаємодії екстрактів рослин та їх БАР (біологічно активна речовина) з антимікробними препаратами за рахунок блокади ефлюксних pomp резистентності мікроорганізмів. Виділено та вивчено хімічний склад десятків БАР рослинного походження, які є інгібіторами ефлюксних pomp мікроорганізмів, що підвищують їх чутливість до антибіотиків [2, 9]. Досліджено, що діосметин (флавоноїд виділений з цитрусових фруктів) потенціює активність еритроміцину відносно MRSA, який містить у своєму геномі множинні копії гена *msrA* ABC-помпи макролідів [2]. Активний компонент екстракту ревеню хвилястого (*Rheum undulatum*) - рапонтігенін синергічно взаємодіє з кліндамицином щодо чутливих та резистентних штамів пропіонобактерій, знижуючи МБСК антибіотика в 8 і 16 разів відповідно, рапонтігенін руйнує клітинну мембрану, а антибіотик пригнічує синтез білка [5]. Інша БАР - карвакрол (ізолюваний з ефірних олій материнки (*Origanum vulgare* L.) та чебрецю (*Thymus vulgaris* L.)) проявляє виражений синергізм протимікробної дії з еритроміцином щодо стрептококів групи А з комбінованою MLS-резистентністю, що кодується генами *erm*(TR)/iMLS, *erm*(B)/iMLS, *erm*(B)/cMLS та *mef*(A)/M [7].

Мета - дослідити біоавтографічним методом БАР екстрактів суплідь вільхи сірої (*Alnus incana* L.) і кореневищ герані лугової (*Geranium pratense* L.), а також препарату "Альтан" на 90% водному етанолі, що показали еритроміцинпотенціюючу активність щодо штамів стафілококів з різними фенотипами MLS-резистентності, виділених від амбулаторних пацієнтів з піодерміями.

Матеріали та методи

В якості тест-культур використано штами *S. epidermidis* з індуктивним (МБСК ЕРІ - 1000 мкг/мл) та неіндуктивним (МБСК ЕРІ - 125 мкг/мл) фенотипами MLS-резистентності. З метою біохімічної ідентифікації штамів використаних у дослідженні застосовували тест-систему "STAPHYtest 16" (Lachema, Чехія). Визначення фенотипів стійкості до антибіотиків MLS-групи у тест-штамів визначали дискодифузійним методом на агарі Мюллера-Хінтона щодо рекомендацій NCCLS (Національний комітет клініко-лабораторних стандартів США, 2013) на основі результатів тестування щодо шести антибіотиків MLS групи [6].

Для проведення дослідження використано екстракти суплідь вільхи сірої та кореневищ герані лугової, а також препарат "Альтан", що містить очищені екстракти суплідь вільхи клейкої та вільхи сірої (екстрагент 90%

водний етанол). З метою розділення досліджуваних екстрактів на окремі фракції БАР нами проведено тонкошарову та хроматографію на папері на пластинах "Sorbifil" у 2-х системах розчинників [3, 4]. Для виявлення поліфенольних сполук хроматограми оброблено 3% розчином хлориду заліза (FeCl_3). Крім того, хроматограми досліджували у двох спектрах УФ випромінювання (254 та 365 нм) за допомогою опромінювача хроматографічного ЛАБ-ХРОМО FSA21320. Біоавтографічну ідентифікацію дослідних екстрактів проведено за методикою А. Nostro [8]. Хроматограми екстрактів покривали розтопленим агаром, засівали тест-культурами (10^7 КУО/мл) та інкубували при температурі 37°C при достатній вологості. З метою чіткої візуалізації меж зон затримки росту стафілококів, колонії обробляли 1% водним розчином 1,3,5-трифеніл-тетразолію хлориду. Таким способом досліджено пряму протимікробну дію активних компонентів рослинних екстрактів. Еритроміцин-потенціюючі властивості досліджували аналогічним способом з додаванням 1/4 МБСК антибіотика (8 та 250 мкг/мл). Для статистичного оброблення результатів мікробіологічних досліджень застосовано комп'ютерні програми WHONET-2017, UTHSCSA ImageTool 3.0 та Microsoft Office Excel 2018.

Результати. Обговорення

Виконані нами раніше дослідження мікрометодами дифузії в агар та серійних розведень в м'ясо-пептон-

ному бульйоні, методом "титрувальної панелі" та кривої "час-бактерицидний ефект" показали, що досліджувані екстракти проявляють достовірний синергізм протимікробної дії з ЕРІ щодо шкірних ізолятів стафілококів з різними фенотипами MLS-резистентності [1, 11].

При проявці хроматограм досліджуваних екстрактів та Альтану 3% розчином хлориду заліза спостерігали появу чорно-фіолетового забарвлення, що свідчила про наявність дубильних речовин, а саме гідролізабельних танінів (полімерів елагової та галової кислот). Дослідження хроматограм екстракту кореневищ герані лугової під ультрафіолетовим світлом показало наявність у екстракті речовин з гідрофобними властивостями, а саме ефірних олій (рис. 1).

Нами проведено біоавтографічні дослідження вибраних екстрактів лікарських рослин з метою попереднього виявлення хімічної природи БАР з антибіотикопотенціюючими властивостями. Біоавтограми екстракту суплідь вільхи сірої та препарату "Альтан" залили агаром, що містив суббактеріостатичні концентрації еритроміцину (1/4 МБСК), засіяні тест-культурою, поблизу лінії старту показали ділянки з чіткими краями вираженої затримки росту мікроорганізмів ($R_f = 0,26-0,32$ та $R_f = 0,11-0,14$ відповідно) (рис. 2).

Біоавтограми екстракту кореневищ герані лугової показали наявність у рослині зовсім інших речовин з антибіотикопотенціюючою активністю, виявлених неда-

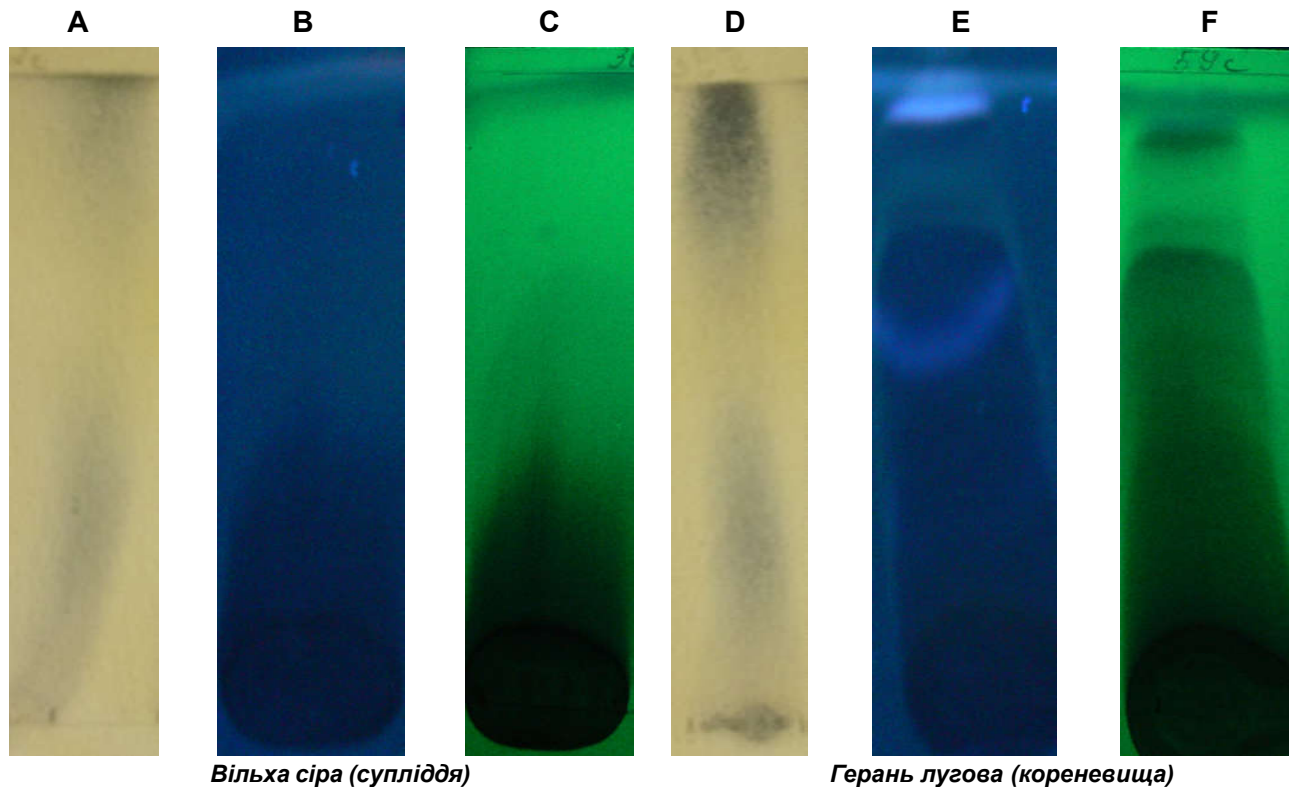


Рис. 1. Хроматограми (система 2) екстракту суплідь вільхи сірої та кореневищ герані лугової: (А, D) - прохідне світло проявлено 3% розчином FeCl_3 , (В, Е) - вигляд в ультрафіолетовому світлі (365 нм), (С, F) - ультрафіолетовому світлі (254 нм). Зменшення 1/2.

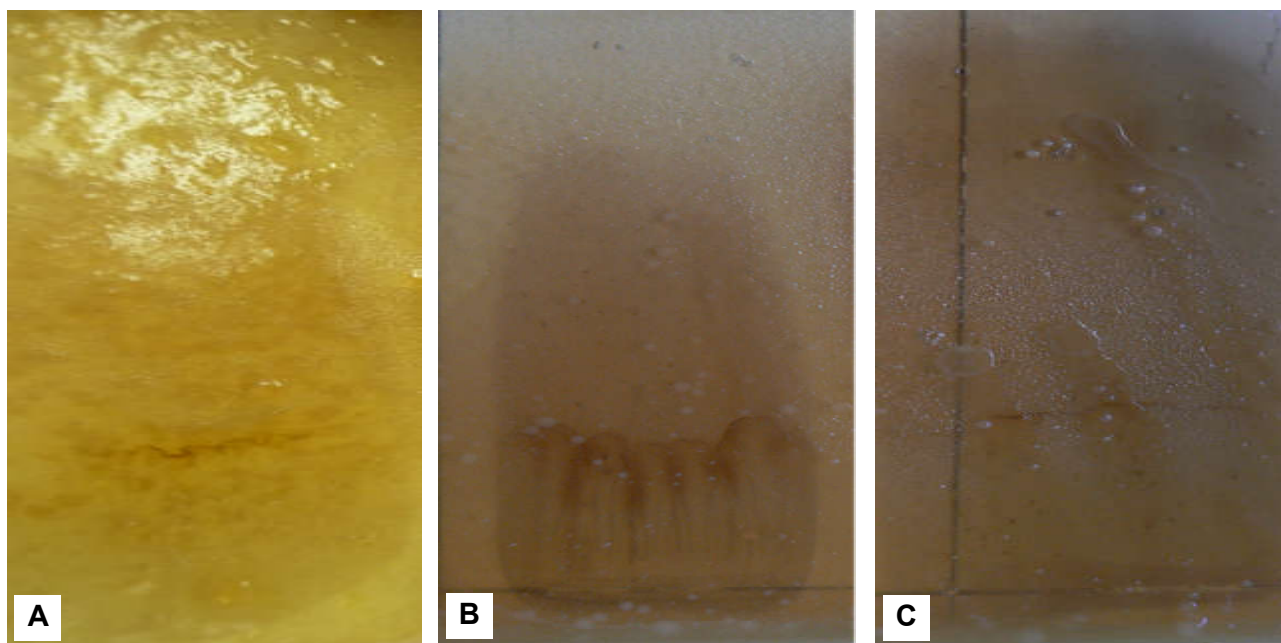


Рис. 2. Біоавтограми екстракту плодів вільхи сірої (А), "Альтану" (В) та кореневищ герані лугової (С). Ріст культур *S. epidermidis* з індуктивним фенотипом MLS-резистентності на МПА з 1/4 МБсК еритроміцину 1/4 125 мкг/мл. Зменшення 1/2.

леко від лінії фінішу ($R_f=0,82-0,96$), що володіють вираженими гідрофобними властивостями. Можна вважати, що дані речовини відносяться до ефірних олій. Цікавим є те, що прямої антибактеріальної дії жоден з компонентів екстрактів що досліджувалися та препарату не проявив.

Аналогічні біоавтографічні дослідження екстрактів та "Альтану" щодо штаму *S. epidermidis* з неіндуктивним фенотипом стійкості до антибіотиків MLS-групи також продемонстрували, що прямої протимікробної та еритроміцин-потенціюючої активності вони не проявляють. Отже, синергічний потенціал БАР екстрактів, що нами досліджені щодо тест-штамів стафілококів доводить, що основною мішенню їх активних компонентів не є ефлюксна помпа *MsrA*. Тоді як, зниження стійкості до макролідів (до еритроміцину) у стафілококів з індуктивним фенотипом під впливом екстрагованих компонентів рослин дає можливість припустити присутність в них речовин, що впливають на активність ферменту аденін-N6-метилази, або експресію хромосомних генів родини *erm*. [10].

Список посилань

1. Юрчишин, О. І., & Куцик, Р. В. (2017). Дослідження впливу синергічних комбінацій еритроміцину і екстрактів лікарських рослин флори Прикарпаття на динаміку росту культури *Staphylococcus aureus* з індукційним фенотипом резистентності до макролідів. *Вісник Української медичної стоматологічної академії*, 4(60), 110-118.
2. Chan, B. C., Ip, M., Gong, H., Lui, S. L., See, R. H., Jolival, C., ... Lau, C. B. (2013). Synergic effects of diosmetin with erythromycin against *ABO* transporter over-expressed methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *Phytomedicine*, 20 (7), 1-4. doi:10.1016/j.phymed.2013.02.007.
3. Cortes-Herrera, C., Artavia, G., Astrid, L., & Granados-Chinchilla, F. (2019). Liquid Chromatography Analysis of Common Nutritional Components, in Feed and Food. *Foods*, 8 (1), 1. doi:10.3390/foods8010001.
4. Doshi, G. M., & Une, H. D. (2016). Quantification of Quercetin and Rutin from Benincasa hispida Seeds and Carissa Congesta Roots by High-performance Thin Layer Chromatography and High-performance Liquid Chromatography. *Pharmacognosy Research*, 8 (1), 37-42. doi:10.4103/0974-8490.171098.
5. Kim, J. K., Kim, N., & Lim, Y. H. (2010). Evaluation of the antimicrobial activity of rhapontigenin produced from rhapontin by biotransformation against *P. acnes*. *Journal of Microbiology*

- and *Biotechnology*, 20 (1), 82-87. doi:10.4014/jmb.0907.07022.
6. Le Bouter, A., Leclercq, R., & Cattoir, V. (2011). Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus saprophyticus* clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37 (2), 118-123. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.10.008.
 7. Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant group A *Streptococci*. *Frontiers in Microbiology*, 6 (165), 1-11. doi:10.3389/fmicb.2015.00165.
 8. Nostro, A., Germanó, M. P., D'angelo, V., Marino, A., & Cannatelli, M. A. (2000). Extraction method and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 379-384. doi:10.1046/j.1472-765x.2000.00731.x.
 9. Sharma, A., Gupta V. K., & Pathania, R. (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian Journal of Medical Research*, 149 (2), 129-145. doi:10.4103/ijmr.IJMR_2079_17.
 10. Tkadlec, J., Vařeková, E., Pantůček, R., Doškař, J., Růžicková, V., Botka, T., Fila, L., & Melter, O. (2015). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Czech cystic fibrosis patients: high rate of ribosomal mutation conferring resistance to MLSB antibiotics as a result of long-term and low-dose azithromycin treatment. *Microbial Drugs Resistance*, 1 (1), 1-8. doi:10.1089/mdr.2014.0276.
 11. Yurchyshyn, O. I., Rusko, H. V., & Kutsyk, R. V. (2017). Synergistic interaction of medicinal plant ethanolic extracts with erythromycin against skin strains of staphylococci with inducible phenotype of MLS-resistance. *Annals of Mechnikov Institute*, 3, 71-79. doi:10.5281/zenodo.1000150.
 - methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *Phytomedicine*, 20 (7), 1-4. doi:10.1016/j.phymed.2013.02.007.
 3. Cortes-Herrera, C., Artavia, G., Astrid, L., & Granados-Chinchilla, F. (2019). Liquid Chromatography Analysis of Common Nutritional Components, in Feed and Food. *Foods*, 8 (1), 1. doi:10.3390/foods8010001.
 4. Doshi, G. M., & Une, H. D. (2016). Quantification of Quercetin and Rutin from *Benincasa hispida* Seeds and *Carissa Congesta* Roots by High-performance Thin Layer Chromatography and High-performance Liquid Chromatography. *Pharmacognosy Research*, 8 (1), 37-42. doi:10.4103/0974-8490.171098.
 5. Kim, J. K., Kim, N., & Lim, Y. H. (2010). Evaluation of the antimicrobial activity of rhapontigenin produced from rhapontin by biotransformation against *P. acnes*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 (1), 82-87. doi:10.4014/jmb.0907.07022.
 6. Le Bouter, A., Leclercq, R., & Cattoir, V. (2011). Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus saprophyticus* clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37 (2), 118-123. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.10.008.
 7. Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant group A *Streptococci*. *Frontiers in Microbiology*, 6 (165), 1-11. doi:10.3389/fmicb.2015.00165.
 8. Nostro, A., Germanó, M. P., D'angelo, V., Marino, A., & Cannatelli, M. A. (2000). Extraction method and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 379-384. doi:10.1046/j.1472-765x.2000.00731.x.
 9. Sharma, A., Gupta V. K., & Pathania, R. (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian Journal of Medical Research*, 149 (2), 129-145. doi:10.4103/ijmr.IJMR_2079_17.
 10. Tkadlec, J., Vařeková, E., Pantůček, R., Doškař, J., Růžicková, V., Botka, T., Fila, L., & Melter, O. (2015). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Czech cystic fibrosis patients: high rate of ribosomal mutation conferring resistance to MLSB antibiotics as a result of long-term and low-dose azithromycin treatment. *Microbial Drugs Resistance*, 1 (1), 1-8. doi:10.1089/mdr.2014.0276.
 11. Yurchyshyn, O. I., Rusko, H. V., & Kutsyk, R. V. (2017). Synergistic interaction of medicinal plant ethanolic extracts with erythromycin against skin strains of staphylococci with inducible phenotype of MLS-resistance. *Annals of Mechnikov Institute*, 3, 71-79. doi:10.5281/zenodo.1000150.

References

1. Yurchyshyn, O. I., & Kutsyk, R. V. (2017). Doslidzhennia vplyvu synerhichnykh kombinatsii erytromitsynu i ekstraktiv likarskykh roslin flory Prykarpattia na dynamiku rostu kultury *Staphylococcus aureus* z indutsybelnym fenotypom rezystentnosti do makrolidiv [Investigation of the effect of synergistic combinations of erythromycin and medical plants extracts of the Carpathian flora on the growth dynamics of *Staphylococcus aureus* culture with an inducible macrolide resistance phenotype]. *Visnyk Ukrain'skoi medychnoi stomatolohichnoi akademii - Bulletin of the Ukrainian Medical Dental Academy*, 4 (60), 110-118.
2. Chan, B. C., Ip, M., Gong, H., Lui, S. L., See, R. H., Jolival, C., ... Lau, C. B. (2013). Synergic effects of diosmetin with erythromycin against ABS transporter over-expressed

БІОАВТОГРАФІЧЕСЬКА ІДЕНТИФІКАЦІЯ АКТИВНИХ КОМПОНЕНТІВ, ПРОЯВЛЯЮЩИХ СИНЕРГІЗМ ПРОТИВОМІКРОБНОГО ДІЙСТВА С МАКРОЛІДАМИ, ЕКСТРАКТІВ ПЛОДІВ ОЛЬХИ СЕРОЙ *ALNUS INCANA* (L.) МОЕНШ. І КОРНЕВИЩ ГЕРАНИ ЛУГОВОЇ *GERANIUM PRATENSE* L.

Юрчишин О.І.

Анотація. Ріст кількості виділених антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів стимулює пошук альтернативних джерел біологічно активних речовин, які потенціюють дію антибіотиків і здатні блокувати механізми стійкості бактерій до антибіотиків. Метою дослідження було провести біоавтографічну ідентифікацію активних компонентів екстрактів плодів ольхи серой і корневищ герани лугової, препарату "Альтан" на 90% водно-етанолі, які проявляють синергізм протимікробного дії з еритромицином. Відносно шкірних ізолятів стафілококів з різними фенотипами MLS-резистентності. Нами проведена хроматографія на папері, тонкослойна хроматографія і біоавтографія. Статистична обробка результатів: WHONET-2017, UTHSCSA ImageTool 3.0, Microsoft Office Excel 2018. На біоавтограмах екстракта плодів ольхи серой і препарату "Альтан" з суббактеріостатичними концентраціями еритромицину, засіяних культурою *S. epidermidis* з індуктивним фенотипом MLS-резистентності, недалеко від лінії старту виявлені зони з чіткими краями вираженого затримання росту тест-культури, що вказує на наявність гідролізабельних танінів. Біоавтограми екстракта корневищ герани лугової демонстрували присутність сполучень з антибіотикопотенціюючою активністю з вираженими гідрофобними властивостями, що вказує на наявність ефірних масел. В екстрактах плодів ольхи серой і корневищ герани лугової ідентифіковано активні компоненти з антибіотикопотенціюючими властивостями, а саме

гидролизуемые танины и эфирные масла. Плоды ольхи серой и корневища герани луговой рекомендуются для проведения их доклинического и углубленного фармакологического исследования.

Ключевые слова: растительные экстракты, биологически активные вещества, эритромицин, антибиотикорезистентность, антибиотикопотенцирующая активность.

BIOAUTOGRAPHIC IDENTIFICATION OF ALDER GRAY *ALNUS INCANA* (L.) MOENCH. FRUITS AND GERANIUM MEADOW *GERANIUM PRATENSE* L. RHIZOMES EXTRACTS ACTIVE COMPONENTS EXHIBITING SYNERGISM OF ANTIMICROBIAL ACTION WITH MACROLIDES

Yurchyshyn O.I.

Annotation. The increase in the number of isolated antibiotic-resistant strains of microorganisms stimulates the search for alternative sources of biologically active substances that have antibiotic-potentiating action and are able to block the mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. The aim of the study was to carry out bioautographic identification of the active components of gray alder fruits, geranium meadow rhizomes extracts and preparation "Altan" (extractant 90% aqueous-ethanolic), which showed synergism of antimicrobial action with erythromycin against skin isolates of staphylococci with different MLS phenotypes. Paper chromatography, thin-layer chromatography and bioautography were performed. Statistical processing of results: UTHSCSA ImageTool 2.0, Microsoft Office Excel 2011. On bioautograms of gray alder fruits extract and Altan with subinhibitory concentrations of erythromycin inoculated with *S. epidermidis* culture (inductive MLS-resistance phenotype), near the start line, areas with clear edges of growth inhibition were detected indicating the presence of hydrolysable tannins. Bioautograms of geranium meadow rhizomes extract showed the presence of compounds with antibiotic-potentiating activity with pronounced hydrophobic properties, indicating the presence of essential oils. In the extracts of gray alder fruits and geranium meadow rhizomes, the active components with antibiotic-potentiating properties, namely hydrolysable tannins and essential oils, have been identified. The fruits of gray alder and geranium meadow rhizomes are recommended for their preclinical and in-depth pharmacological study.

Keywords: plant extracts, biologically active substances, erythromycin, antibiotic resistance, antibiotic potentiating activity.