

УДК 615.28+579.861

**ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ
ЛИШАЙНИКІВ *CETRARIA ISLANDICA* (L.) АСН. І
EVERNIA PRUNASTRI (L.) АСН. ВІДНОСНО
СТАФІЛОКОКІВ З РІЗНИМ РІВНЕМ
МЕТИЦИЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ.**

Куцик Р.В.

**Івано-Франківський державний медичний
університет**

Важливою проблемою сучасної медицини є формування і глобальне розповсюдження госпітальних штамів мікроорганізмів із високим рівнем резистентності до антибіотиків, хіміотерапевтичних препаратів і антисептиків. У виникненні нозокоміальних ускладнень, передусім у пацієнтів хірургічних клінік та відділень інтенсивної терапії, в останні десятиліття неухильно зростає етіологічне значення метицилінорезистентних стафілококів (МРС). Поряд із стійкістю до метициліну та оксациліну вони характеризуються високим рівнем резистентності до карбапенемів, цефалоспоринів II і III поколінь, аміноглікозидів, макролідів, лінкозамідів, тетрациклінів, фторхінолонів [6]. Препаратами вибору для лікування інфекцій, спричинених МРС, є глікопептидні антибіотики (ванкоміцин і тейкопланін). Їх застосування супроводжується значними побічними ефектами, що робить актуальним пошук нових терапевтичних підходів.

Одним з перспективних джерел для створення засобів, активних відносно МРС, можуть бути біологічно активні речовини лишайників. Їх інтенсивні мікробіологічні дослідження проводилися в основному до 50-х років XX століття [1,3], коли проблема антибіотикорезистентності мікроорганізмів ще не поставала так гостро. У зв'язку з появою високоефективних антибіотиків ці дослідження та розробки на основі лишайників таких препаратів як «Бінан» і «Степін», на наш погляд, були незаслужено забуті. Враховуючи теперішні тенденції популяційної еволюції умовно-патогенних мікроорганізмів, нами проведено тестування протимікробної активності екстрактів лишайників, що проростають в Карпатах – цетрарії ісландської («ісландського моху») *Cetraria islandica* (L.) Ach. та евернії сливової («дубового моху») *Evernia prunastri* (L.) Ach., відносно сучасних полірезистентних клінічних штамів стафілококів.

Матеріал і методи дослідження

Методи одержання екстрактів. Для дослідження використано слань цетрарії, зібрану в субальпійській зоні Карпат, та евернії, зібраної в передкарпатських лісах на території Івано-Франківської області.

Із подрібненої висушеної слані виготовляли екстракти 40% і 90% водним етанолом (співвідношення сировина/екстрагент 1:10) відповідно до фармакопейних вимог.

З метою попередньої очистки та встановлення характеру діючих речовин проведено послідовну

вичерпну екстракцію точної наважки (100 г) слані в апараті Соксклета системою органічних розчинників із зростаючою полярністю: гексаном, хлороформом, етилацетатом, н-бутанолом. Отримані екстракти концентрували шляхом відгонки розчинників на водяній бані і висушували у сушильній шафі при кімнатній температурі. Вихід сухих екстрактів цетрарії: гексановий – 1,007 г, хлороформний – 0,886 г, етилацетатний – 4,441 г і бутанольний – 4,142 г. Під час екстрагування слані евернії вияснилося, що охолодження гексанового і хлороформного екстрактів до кімнатної температури супроводжується випаданням значного осаду. Враховуючи цей факт, нами було виділено по 2 субфракції відповідних екстрактів. Вихід сухих екстрактів евернії: гексановий (субфракція, розчинна у гексані при кімнатній температурі) – 2,058 г, гексановий (субфракція, нерозчинна у гексані при кімнатній температурі) – 0,215 г, хлороформний (розчинна субфракція) – 2,092 г, хлороформний (нерозчинна субфракція) – 1,637 г, етилацетатний – 1,992 г і бутанольний – 4,675 г.

Методи вивчення протимікробної активності екстрактів. Дослідження протимікробної активності екстрактів лишайників виконували методами дифузії в агар і серійних розведень в агарі.

Метод дифузії в агар. В чашки Петрі, розташовані на строго горизонтальній поверхні, заливали по 30 мл МПА. Після застигання в середовищі за допомогою спеціального пробійника виготовляли лунки діаметром 4,0 мм. Поверхню агару рівномірно засівали стандартизованими суспензіями тест-культур (концентрації 1×10^7 КУО/мл). В лунки вносили по 20 мкл водно-етанольних екстрактів або аналогічну кількість розчинів (10 мг/мл) висушених екстрактів у 90% спирті чи у суміші диметилсульфоксид:етанол 1:1. Після інкубації в термостаті протягом доби визначали діаметри зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунок.

Метод серійних розведень в агарі. Виготовляли ряди двократних серійних розведень водно-етанольних екстрактів в агарі, починаючи із співвідношення 1:8. Для дослідження активності висушених екстрактів готували їх робочі розчини концентрації 20 мг/мл, а далі – ряд двократних серійних розведень. По 1 мл розчинів відповідного розведення змішували з 9 мл розплавленого поживного агару і заливали в чашки Петрі, отримуючи таким чином культуральні середовища із концентраціями екстракту від 2 мг/мл.

За допомогою спеціального штампа-реплікатора на кожную чашку висівали по 25 штамів досліджуваних мікроорганізмів [2]. Для посіву використовували стандартизовані за оптичною густиною (1×10^7 КУО/мл) суспензії добових тест-культур. Ріст мікроорганізмів оцінювали двічі – після інкубації чашок в термостаті при 37°C протягом 1 (для визначення мінімальної бактеріостатичної концентрації – МБсК) і 2 діб (для визначення мінімальної бактерицидної концентрації – МБцК). Враховували макроскопічні ознаки росту культур, а також наявність мікроколоній при дослідженні

під лупою. При аналізі результатів вираховували величини МБцК₉₀ і МБцК₅₀ – мінімальні концентрації, які викликають повне пригнічення росту 90 і 50% тест-штамів відповідно.

Характеристика використаних мікробних культур. Тестування протимікробної активності екстрактів лишайників проведено з використанням колекційного штаму *S. aureus* 209-Р (ATCC 6538-Р) із колекції ДІСК ім. Л.О.Тарасевича, (Москва), а також 50 клінічних ізолятів стафілококів з різним рівнем антибіотикорезистентності від пацієнтів з фурункульозом та гнійно-септичними інфекціями іншої локалізації. Виділені штами ідентифікували за комплексом культуральних і біохімічних властивостей. Для оцінки ферментативної активності культур використовували набори «Staphy-Test» (Lachema, Чехія). Для виявлення метицилінорезистентних штамів визначали чутливість культур до оксациліну методом двократних серійних розведень в агарі Мюллера – Хінтона з 5% NaCl згідно з рекомендаціями Національного комітету клініко-лабораторних стандартів (NCCLS, США) [5], а також продукцію штамами пеніцилін-зв'язуючого білка PBP2'

(продукту гена *mecA*) методом латекс-аглотинації (Slidex® MRSA Detection, bioMerieux, Франція). Метицилінорезистентними вважалися МесА⁺-штами, для яких мінімальна пригнічуюча концентрація (МПК) оксациліну становила ≥ 32 мкг/мл. При МПК оксациліну 8-16 мкг/мл культури стафілококів розцінювали як штами з пограничною чутливістю. Серед тест-культур ідентифіковано 26 штамів *S. aureus*: з них 14 – метициліночутливих (MSSA) і 12 – метицилінорезистентних (MRSA). Серед 24 штамів коагулазо-негативних стафілококів ідентифіковано *S. epidermidis* – 10 шт., *S. haemolyticus* – 6 шт., *S. warneri* – 4 шт., *S. hominis* – 2 шт. (всього 4 метициліночутливі штами – MS-CNS, 16 метицилінорезистентних штамів – MR-CNS і 4 штами з пограничним рівнем резистентності – MIR-CNS).

Результати дослідження та їх обговорення

Методом дифузії в агар встановлено, що 40% водно-етанольні екстракти як цетрарії, так і евернії, протистафілококовою активністю не володіють. Результати тестування 90% водно-етанольних екстрактів наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Протистафілококова активність 90% водно-етанольних екстрактів слані цетрарії і евернії

Штами стафілококів	Рівень метициліно-резистентності	Зони затримки росту (мм)	
		<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.
<i>S. aureus</i> ATCC 3538-Р	S	9,8±0,48	8,7±0,93
<i>S. aureus</i> «Ск.»	S	8,5±0,24	6,4±0,15
<i>S. aureus</i> «ІСА-5»	R	8,0±0,33	6,3±0,58
Коагулазо-негативні стафілококи (CNS)			
<i>S. epidermidis</i> «Кн.»	S	6,3±0,44	6,1±0,15
<i>S. epidermidis</i> «Тю.»	IR	5,9±0,24	6,6±0,16
<i>S. epidermidis</i> «Гев.»	R	7,5±0,29	5,6±0,14
<i>S. haemolyticus</i> «5-03 МЦБ»	R	5,5±0,58	5,4±0,29
<i>S. hominis</i> «Зап.»	S	7,7±0,44	6,8±0,17
<i>S. warneri</i> «Кун.»	R	6,8±0,31	6,5±0,28
<i>S. cohnii</i> «Завр.»	R	6,4±0,18	5,5±0,22

Примітка. Контрольні дослідження, виконані з 90% етанолом (розчинником) продемонстрували, що зона пригнічення росту *S. aureus* – 4,3±0,27 мм, CNS – 4,4±0,09 мм.

Вони свідчать про порівняно високу чутливість до біологічно активних речовин лишайників антибіотикочутливого колекційного штаму золотистого стафілокока *S. aureus* ATCC 6538-Р, виділеного з клінічного матеріалу ще в 1947 р. Зони пригнічення росту коагулазо-негативних стафілококів під впливом досліджуваних екстрактів виявилися дещо меншими, порівняно із штамами *S. aureus*. Відносно більшості штамів активнішим був екстракт цетрарії ісландської. Істотної залежності між чутливістю до біологічно активних речовин екстрактів слані лишайників та рівнем метицилінорезистентності клінічних штамів стафілококів методом дифузії в агар не виявлено.

Антибактеріальну активність спиртових екстрактів слані цетрарії та евернії підтверджено методом серійних розведень в агарі – у розведенні 1:8 вони

пригнічували ріст відповідно 92,0 і 90,0% тест-штамів стафілококів. Серія виконаних контрольних дослідів показала, що при аналогічному розведенні поживним агаром етанолу протимікробна дія останнього не проявляється взагалі.

Для визначення діючих концентрацій враховували масу сухого залишку, одержаного після випаровування 1,000 мл екстрактів при кімнатній температурі. Встановлено, що МБцК водно-етанольного екстракту цетрарії (в перерахунку на суху масу екстрагованих речовин) відносно 96,2% клінічних штамів *S. aureus* (МБцК₉₀) становила 500 мкг/мл, а МБсК для 65,4% штамів – 250 мкг/мл (для *S. aureus* ATCC 3538-Р – 250 і 125 мкг/мл відповідно). Відносно 50% протестованих штамів *S. epidermidis* МБцК₅₀ спиртового екстракту цетрарії складала 250 мкг/мл, МБсК₅₀ – 31,25

мкг/мл. Клінічні ізоляти інших коагулазо-негативних стафілококів (зокрема *S. haemolyticus* і *S. hominis*) за рівнем чутливості до 90% водно-етанольного екстракту цетрарії не відрізнялися від штамів *S. aureus*. Крім того, ступінь чутливості до екстракту цетрарії метициліночутливих і метицилінорезистентних стафілококів виявився практично однаковим. Порівняння рівня протистафілокової активності неочищеного водно-етанольного екстракту цетрарії з відомими антисептичними препаратами показало, що він значно переважає мірамистин та бетадин (повідон-йодид) і дещо поступається тимолу та риванолу (етакридину лактату).

Для екстракту евернії МБцК₉₀ відносно *S. aureus* і коагулазо-негативних стафілококів становила 875 мкг/мл.

З метою початкової очистки та орієнтовної оцінки хімічної природи протимікробних сполук цетрарії та евернії проведено тестування протистафілокової активності екстрактів, одержаних шляхом послідовної екстракції сировини органічними розчинниками із зростаючою полярністю: гексаном, хлороформом, етилацетатом, н-бутанолом. Серією досліджень методом дифузії в агар продемонстровано, що протистафілокова активність екстрактів цетрарії різко знижується в міру зростання полярності екстрагентів (табл. 2).

Таблиця 2. Протистафілокова активність екстрактів слані лишайників, одержаних шляхом послідовної екстракції сировини органічними розчинниками із зростаючою полярністю

Екстрагенти	Зони затримки росту (мм)				
	<i>S. aureus</i> ATCC 3538-P	Клінічні штами			
		MSSA (n=3)	MRSA (n=3)	MS-CNS (n=3)	MR-CNS (n=6)
Контроль	–	–	4,1±0,07	–	4,05±0,06
<i>Cetraria islandica (L.) Ach.</i>					
Гексан	10,2±0,32	7,8±0,14	7,57±0,38	7,1±0,29	6,8±0,23
Хлороформ	7,0±0,26	4,9±0,28	5,13±0,20	4,7±0,43	5,0±0,12
Етилацетат	4,1±0,07	–	[4,4±0,17]	–	–
н-Бутанол	–	–	–	4,3±0,11	–
<i>Evernia prunastri (L.) Ach.</i>					
Гексан	10,8±0,79	8,2±0,67	[8,2±0,96]	9,2±1,51	6,8±0,33
Гексан (осад)	[5,25±0,30]	4,4±0,11	4,9±0,23	5,6±0,98	4,3±0,10
Хлороформ	9,2±1,18	5,5±0,18	5,9±0,26	7,9±1,03	5,8±0,15
Хлороформ (осад)	[11,3±2,58]	7,0±0,30	9,8±1,60	7,4±0,27	8,0±0,42
Етилацетат	14,6±1,69	7,6±0,98	8,8±1,22	6,1±0,48	7,0±0,36
н-Бутанол	5,8±0,14	5,1±0,36	4,4±0,10	–	[4,5±0,16]

Примітки: 1. Контрольні дослідження виконано із застосуванням чистого розчинника – диметилсульфоксид:етанолу 1:1.

2. У квадратних дужках вказано діаметри зон часткового пригнічення росту стафілококів.

Абсолютно іншу закономірність виявлено при аналізі результатів тестування екстрактів слані евернії. Високим рівнем протистафілокової активності володіють гексановий (субфракція, розчинна у гексані при кімнатній температурі), хлороформний (особливо його субфракція, нерозчинна у хлороформі при кімнатній температурі) та етилацетатний екстракти. На наш погляд, це може

вказувати на присутність у слані евернії як мінімум двох сполук з антибіотичною активністю.

Тестування одержаних органічних екстрактів слані цетрарії та евернії методом розведень в агарі дозволило встановити їх бактерицидні і бактеріостатичні концентрації відносно колекційного і клінічних штамів стафілококів (табл. 3).

Таблиця 3. Ефективні діючі концентрації екстрактів слані цетрарії ісландської і евернії сливової при тестуванні відносно клінічних штамів стафілококів

Екстрагенти	МБцК ₉₀ , мкг/мл				МБсК ₉₀ , мкг/мл			
	MSSA	MRSA	MS-CNS	MR-CNS	MSSA	MRSA	MS-CNS	MR-CNS
<i>Cetraria islandica (L.) Ach.</i>								
Гексан	250	250	250	250	31,25	62,5	31,25	15,6
Хлороформ	500	1000	1000	1000	250	250	250	250
Етилацетат	1000	1000	2000	2000	500	500	500	500
н-Бутанол	>>2000	>>2000	>>2000	>>2000	>2000	>2000	1000	2000
<i>Evernia prunastri (L.) Ach.</i>								
Гексан	250	250	250	250	62,5	62,5	15,6	15,6

Хлороформ	500	500	500	500	250	250	125	125
Хлороформ (осад)	250	500	500	500	125	125	250	125
Етилацетат	500	500	500	500	125	125	125	125
н-Бутанол	2000	>2000	>>2000	>>2000	500	1000	500	2000

Як і слід було очікувати на основі попередніх даних, одержаних методом дифузії в агар, найактивнішими виявилися гексанові екстракти обох лишайників. Їх бактерицидна дія відносно переважної більшості клінічних ізолятів стафілококів (незалежно від рівня метициліночутливості штамів) виразно проявлялася в концентрації 250 мкг/мл. Щодо колекційного штаму *S. aureus* ATCC 6538-P, то МБцК гексанового екстракту евернії становила 250 мкг/мл, цетрарії – 125 мкг/мл. Вказані екстракти проявляли також значну бактериостатичну активність, особливо відносно коагулазо-негативних стафілококів.

Нами проведено порівняльний аналіз протистафілококової активності гексанових екстрактів цетрарії та евернії і ряду відомих антисептиків. Одержані нами препарати значно ефективніші від повідону йодиду (МБцК₉₀ 6,25 мкг/мл), мірамістину (МБцК₉₀ 1,25 мкг/мл) і проявляють активність, співставиму з активністю тимолу (МБцК₉₀ 250 мкг/мл), етакридину лактату (МБцК₉₀ 200 мкг/мл) і перекису водню (МБцК₉₀ 187,5 мкг/мл). Разом з тим вони поступаються за бактерицидними властивостями цитралю (МБцК₉₀ 125 мкг/мл), етонію (МБцК₉₀ 62,5 мкг/мл) та хлоргексидину (МБцК₉₀ 7,8 мкг/мл).

Хлороформні і етилацетатні екстракти евернії володіють достовірно вищим рівнем протистафілококової активності, порівняно з аналогічними екстрактами цетрарії. Різде зниження протимікробної активності екстрактів цетрарії ісландської в міру зростання полярності екстрагентів вказує на ліпофільний характер діючих речовин. Приймаючи до уваги одержані K.Ingolfsdottir [4] результати дослідження антигелікобактерних властивостей цетрарії, можна припустити, що основною антибіотичною сполукою цього лишайника є протоліхестеринова кислота. Вияснення природи протистафілококових сполук евернії потребує додаткових досліджень.

Висновки:

1. Екстракти слані цетрарії ісландської *Cetraria islandica* (L.) Ach. та евернії сливової *Evernia prunastri* (L.) Ach. володіють значною бактерицидною активністю відносно стафілококів, включаючи поліантибіотикорезистентні клінічні ізоляти.
2. Найбільш виражену протистафілококову активність проявляють гексанові екстракти цетрарії і евернії. Встановлено також присутність протимікробних сполук у хлороформному і етилацетатному екстрактах евернії.
3. Подальші дослідження протимікробних властивостей цетрарії та евернії, ідентифікація та очистка їх діючих речовин відкривають перспективи для створення нових антисептичних препаратів для лікування і профілактики стафілококових інфекцій.

ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ ЛИШАЙНИКІВ *CETRARIA ISLANDICA* (L.) Ach. I *EVERNIA PRUNASTRI* (L.) Ach. ВІДНОСНО СТАФІЛОКОКІВ З РІЗНИМ РІВНЕМ МЕТИЦИЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ

Куцик Р.В.

Методами дифузії в агар і серійних розведень в агарі встановлено значну бактерицидну активність гексанових екстрактів слані цетрарії ісландської *Cetraria islandica* (L.) Ach. та евернії сливової *Evernia prunastri* (L.) Ach. відносно сучасних клінічних штамів стафілококів, включаючи метицилінорезистентні ізоляти.

ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЛИШАЙНИКОВ *CETRARIA ISLANDICA* (L.) Ach. I *EVERNIA PRUNASTRI* (L.) Ach. ОТНОСИТЕЛЬНО СТАФИЛОКОККОВ РАЗНЫМ УРОВНЕМ МЕТИЦИЛЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ.

Куцык Р.В.

Методами диффузии в агар и серийных разведений в агаре установлена значительная бактерицидная активность гексановых экстрактов слоевища цетрарии исландской *Cetraria islandica* (L.) Ach. и эвернии сливовой *Evernia prunastri* (L.) Ach. относительно современных клинических штаммов стафилококков, включая метициллинорезистентные изоляты.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LICHENS *CETRARIA ISLANDICA* (L.) Ach. AND *EVERNIA PRUNASTRI* (L.) Ach. EXTRACTS AGAINST STAPHYLOCOCCI OF VARIOUS METHICILLIN RESISTANCE LEVEL.

Kutsyk R.V.

The significant bactericidal activity of lichens iceland moss *Cetraria islandica* (L.) Ach. and oak moss *Evernia prunastri* (L.) Ach. thallus hexane extracts against clinical strains of staphylococci including methicillin-resistant isolates by agar diffusion and agar dilution technique was established.

Література:

1. Бондаренко А.С. Антибиотичні речовини з лишайників.-К.: Вид-во АН УРСР, 1958.-79с.
2. Красильников А.П. Справочник по антисептике.- Минск: Выш. шк., 1995.-367 с.
3. Моисеева Е.Н. Биохимические свойства лишайников и их практическое значение.-М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1961.-81с.
4. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to protolichesterinic acid from the lichen *Cetraria islandica* / Ingolfsdottir K., Hjalmarsdottir M.A., Sigurdsson A., Gudjonsdottir G.A., Brynjolfsson A., Steingrimsson O. // Antimicrob. Agents Chemother.-1997.-Vol.41, №1.- P.215-217.

5. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Ninth Informational Supplement // NCCLS M 100-S8; M 100-S9. - January, 1999.
6. Skurray R.A., Firth N. Molecular evolution of multiply-antibiotic-resistant staphylococci // Ciba Found. Symp.-1997.-Vol.207.-P.167-183.