УДК 616-002.73: 577.15.158

ПРОТИВОМИКОБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СБОРНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ЭКСТРАКТА И ВЛИЯНИЕ ЕГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК M. LUFU

Генатуллина Г.Н., Лужнова С.А.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России, Астрахань, e-mail: genatullina@mail.ru

В эксперименте in vitro показана выраженная противомикобактериальная активность сборного экстракта, полученного посредством использования оригинального ступенчатого экстрагирования растений Астраханской области. Установлено, что при минимально подавляющей концентрации исследуемого экстракта, его вещества способны значительно изменять структуру микобактерий M.lufu. Экстракт показал способность усиления противомикобактериального действия рифампицина при сочетанном применении. Представлена актуальность дальнейшего изучения наиболее активных противомикробных компонентов растений, исследование их химического состава и свойств с целью разработки и создания препаратов, которые после соответствующих испытаний могут найти применение в медицине.

Ключевые слова: растительный экстракт, минимальная ингибирующая концентрация, противомикобактериальная активность, рифампицин, M. lufu

ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY GATHER PLANT EXTRACTS AND ITS INFLUENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ON STRUCTURAL CHANGES IN THE CELLS M. LUFU

Genatullina G.N., Luzhnova S.A.

Leprosy Research Institute Ministry of Health, Astrakhan, e-mail: genatullina@mail.ru

In the experiment in vitro shows a pronounced anti-mycobacterial activity of gather plant extracts obtained by using the original step extraction plants of the Astrakhan region. It was found that the minimum inhibitory concentration of the test extract, its substances can significantly change the structure of Mycobacterium M.lufu. The extract has shown the ability to enhance the action of rifampicin antimycobacterial the combined use. Provides relevant further study the most active antimicrobial component plants to study their chemical composition and properties for the development and creation of products, which, after appropriate tests can be used in medicine.

Keywords: plant extract, the minimum inhibitory concentration, antimycobacterial activity, rifampicin, M. lufu

В последние годы в научной литературе широко обсуждается актуальность поиска новых источников фармакологических средств, которые заключают в себе, в частности, составные элементы или продуценты растений, оказывающих воздействие на возбудителей инфекционных заболеваний [2, 9].

При скрининге экстрактов более чем из 20 видов растений Астраханской области установлено, что в них содержатся как ранее описанные [10], так и оригинальные композиции химических веществ: паренгенин из соцветий Achillea micrantha, нарингенин из корня Glycyrrhiza glabra, в экстракте из соцветий Helichrysum arenarium L. и корня Glycyrrhiza glabra – 4,7-диоксифлавонон [8].

При изучении состава водноспиртовых настоек и буферных экстрактов ряда растений установлено, что вещества субстанций, выделенных посредством ступенчатого экстрагирования, обладают противомикробной активностью [3, 8].

Обнаружены и обоснованы механизмы воздействия ряда растительных веществ на бактериальную клетку: разрушение и лизис надклеточных компонентов, инактивация фитолектинами бактерий путем связывания с антигенными детерминантами бактериальных клеток [7].

Целью нашего исследования явилось получение посредством ступенчатого экстрагирования растений Астраханской области оригинального сборного растительного экстракта, обладающего противомикобактериальной активностью и способностью повышать действие рифампицина в эксперименте in vitro.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования был растительный экстракт, приготовленный по, методу, описанному в патенте № 2467742 (2011) [5]. В качестве препарата сравнения использовался рифампицин (РФП). Для испытаний использовали культуру M.lufu, полученную от профессора Seydel (Германия), при содействии отдела лепры ВОЗ.

Способность растительных компонентов оригинального экстракта подавлять рост культуры M. lufu исследовалась методом серийных разведений [6] на среде Школьниковой, используемой для культивиро-

вания M. tuberculosis. С каждым исследуемым соединением, ставили не менее 5 параллельных опытов.

Метода серийных разведений основывается на создании последовательных разведений веществ в питательной среде в порядке геометрической прогрессии. В нашем исследовании концентрация изучаемого экстракта в ряду серийных разведений убывала в геометрической прогрессии с коэффициентом 2 (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128). На среде Школьниковой цельный экстракт с концентрацией растительного сырья 100 мкг/мл служил первоначальным раствором, из которого готовили разведения, содержащие сухого растительного сырья в концентрациях 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 мкг/мл. Контролем служили: пробирка, содержащая среду Школьниковой без ингибитора, пробирка с экстрагентом (для экстракта экстрагентом служил 40% этиловый спирт и буферный раствор), а также ряды серийных разведений препарата сравнения – рифампицина и комбинация рифампицина с исследуемым экстрактом.

Для приготовления взвеси микобактерий использовали двухнедельную культуру M.lufu, синхронизированную холодом (+ 4°C) в течение 72 часов. Количество микобактерий в суспензии определяли по стандарту мутности 5 по McFarland. В каждую пробирку ряда исследовательских разведений изучаемых веществ, включая контроль, вносили по 0,2 мл рабочей взвеси M. lufu. Посевы инкубировались в течение 10-12 дней при температуре + 31 °C.

По истечении этого срока из каждой пробирки на среду Левенштейна-Йенсена высевали 0,05 мл суспензии с целью определения жизнеспособности M. lufu. После этого оставшееся содержимое пробирок центрифугировали (1500 оборотов в мин в течение 10 минут). Из осадка готовили мазки для окрашивания по методу Циля-Нильсена на кислотоустойчивость и для изучения морфологических особенностей клеток M.lufu при влиянии биологически активных веществ растений.

Для оценки жизнеспособности M. lufu, посевы на среде Левенштейна-Йенсена инкубировали в течение 10 дней при температуре 31 °C. Производили подсчет колоний, выросших на косяке плотной среды. Первую наименьшую концентрацию экстракта, при которой не определялся бактериальный рост считали минимальной бактерицидной концентрацией (МБК).

В мазках, окрашенных по методу Циля-Нильсена, просматривали 20 полей зрения, количество микобактерий оценивали в процентах по отношению к контролю. Минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) экстракта и препарата сравнения считалось то его содержание в среде, при котором отмечалось задержка роста популяции M. lufu на 50% по сравнению с контролем.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследования противомикобактериальной активности сборного растительного экстракта, в эксперименте in vitro с использованием M. lufu (рекомендованного для испытания противолепрозных средств) показали, полное отсутствие роста M. lufu на среде Левенштейна – Йенсена после предварительной инкубации на среде Школьниковой с экстрактом в диапазоне концентраций растительного сырья 25 – 3,13 мкг/мл (таблица). При применении концентраций 1,56 мкг/мл наблюдали в среднем 2,8 ± 0,05 жизнеспособных колоний M. lufu, с уменьшением концентрации субстанции интенсивность роста увеличивалась (таблица). МБК сборного растительного экстракта оказалась равной 3,13 мкг/кг. При этом противомикобактериальное действие растительных компонентов экстракта сравнимо таковым действием рифампицина. В ряду посевов с РФП в диапазоне концентраций 1,56 – 0,78 мкг/мл отмечали рост единичных атипичных колоний. Результаты, полученные при сочетанном применении экстракта и РФП, показали более выраженный антимикобактериальный эффект. Только в четырех случаях из пяти в пробирках с концентрацией 1,56 мкг/мл комплекса экстракт и РФП были обнаружены по одной жизнеспособной колонии M. lufu. При более высоких концентрациях исследуемых субстанций пробирки были пусты (таблица).

Анализ мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену, показал, отсутствие кислотоустойчивых форм микобактерий при разведении экстракта в интервале концентраций 100 – 1,56 мкг/мл, что было идентично при анализе соответствующих проб с РФП. С понижением концентраций действующих веществ комплекса изучаемых субстанций содержание КУМ в пробах даже при самом большом разведении не превышало 50%. Доля КУМ в ряду разведений экстракта повышалась до 78% при концентрациях 0,78 мкг/мл. П.Дж. Бреннан и Ф. Дрепер [1] считают, что появление неокрашенных клеток является результатом нарушения нормальной функции синтеза кислотоустойчивых липидов, которые обычно обеспечивают проницаемость клеточной оболочки.

По сравнению с интактными клетками микобактерии под влиянием биологически активных веществ экстракта изменяли свою характерную структуру. Среди них встречались клетки с гранулярным протопластом, а также микобактерии с одной тонкой оболочкой. Похожие изменения наблюдались Н.М. Овчинниковым и В.В. Делекторским [4] в культурах гонококков при воздействии пенициллина. Цитоплазматическое вещество у таких форм отсутствует или обнаруживается в весьма незначительном количестве. Образование гранул, по мнению Р.Ж. Дюбо [2], является результатом приспособления или модификации, указывающих на пластичность микробной клетки. Гранулы являются не только скоплением резервных питательных веществ, они содержат энзимы. Депрессия или латентность этих энзимов приводит к модификациям клеток [1].

Определение жизнеспособности M. lufu при различных концентрациях экстракта и РФП

субстанции	Число колоний							
	Концентрация субстанций, мкг/мл							Контроль
	100	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	
экстракт	0**	0**	0**	0**	0**	2,8 ± 0,05*	3,5 ± 0,05*	100,0 ± 0,7
РФП	0**	0**	0**	0**	0**	1,0 ± 0,01*	2,5 ± 0,25*	70,0 ± 0,9
экстракт + РФП	0**	0**	0**	0**	0**	0,8 ± 0,03*	2,0 ± 0,01*	80,0 ± 0,2
экстрагент	40,8 ± 0,5*	55,5 ± 0,4*	60,4 ± 0,7*	70 ± 0,2	85 ± 0,4	90 ± 0,9	100 ± 0,7	100 ± 0,5

Примечания. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Кроме того, наблюдались только фрагменты клеток с неровными краями, что указывает на изменение проницаемости клеточных мембран. Н.М. Овчинников и В.В. Делекторский [4] утверждали, что подобные изменения возникают в связи с утратой гликокаликса клеточной стенки, что нарушает клеточное деление и синтез клеточной стенки.

Таким образом, полученные результаты показывают перспективность дальнейших исследований сборного растительного экстракта в эксперименте. А также актуальность исследования их химического состава и свойств с целью разработки и создания препаратов, которые после соответствующих испытаний могут найти применение в медицине.

Список литературы

1. Бреннан П.Дж., Дрепер Ф. Ультраструктура микобактерий туберкулеза // Туберкулез, патогенез, защита, контроль [под ред. Б.Р. Блума; пер. А.С. Анта и др. / под. ред. М.А. Карагунского]. М.: Медицина, 2002. – С. 294–306.

2. Дюбо Р. Бактериальная клетка. – М.: Медгиз, 1948. – 525 с.

3. Назарова Г.Н., Сухенко Л.Т., Маслов А.К. Влияние экстрактов некоторых растений Астраханской области на клетки микобактерий туберкулеза // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. XIV, № 4. – С. 44–45.

4. Овчинников Н.М., Делекторский В.В. Электронная микроскопия некоторых представителей рода трепонем, рода нейссерия и трихомонад. – М.: Медицина – 1974. – 129 с.

5. Патент РФ № 2467742, 27.11.2011.

6. Сбойчаков В.Б. Микробиология с основами эпидемиологии и методами микробиологических исследований: учебник для мед.учеб. заведений. – СПб.: СпецЛит, 2007. – 592 с.

7. Сухенко Л.Т., Назарова Г.Н., Бовин Н.В. Изучение механизмов противомикробной активности растений Астраханской флоры // Естественные науки.– 2005. – № 4. – С. 13–24.

8. Тырков А.Г., Сухенко Л.Т., Шевцова И.А. Антимикробная активность замещенных 5-динитрометил-3-фенил(метил)-1,2,4-оксадиазолов // Фундаментальные и прикладные проблемы современной химии и материаловедения: Материалы Всероссийской научной конференции. – Махачкала, 2008. – С. 40–42.

9. Шкурупий В.А., Одинцова О.А., Казаринова Н.В., Ткаченко К.Г. Результаты использования эфирного масла мяты перечной в комплексном лечении лиц с инфильтративным туберкулезом легких // Проблема туберкулеза и болезней лёгких. – 2006. – № 9. – С. 43–45.

10. Яковлев Г.П. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия: учебное пособие. – СПб.: СпецЛит, 2006. – 845 с.