

Золотарев П.Н.

Медицинский университет «Реавиз», г. Самара

E-mail: zolotareff@list.ru

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГРИБОВ К ФИТОСУБСТАНЦИЯМ

С каждым годом в современной фармакологии всё острее встает вопрос поиска новых соединений, обладающих антимикотической активностью, что в первую очередь обусловлено увеличением роста грибковых заболеваний кожи и слизистых оболочек человека.

При этом, среди научных исследований в современной литературе все чаще встречаются работы, направленные на изучение противогрибковой активности субстанций растительной природы.

В ходе выполнения настоящей работы изучена чувствительность грибов, вызывающих поражение кожи и слизистых оболочек человека, к фитосубстанциям, содержащим фенолпропаноиды и флавоноиды.

Материалом для исследования явились 39 штаммов грибов, вызывающих поражение кожи и слизистых оболочек (*Trichophyton* spp., *Microsporum canis*, *Candida albicans*).

Метод серийных двойных разведений в плотной питательной среде применялся для определения чувствительности микроорганизмов к фитосубстанциям, содержащим в качестве ведущей группы фенолпропаноиды или флавоноиды.

В результате исследования получены средние значения чувствительности исследуемых грибов к фитосубстанциям, выраженные в минимально-подавляющих концентрациях. *Trichophyton* spp., *Microsporum canis* и *Candida albicans* обладают максимальной чувствительностью ко второй фракции углекислотного экстракта гвоздики (МПК = $55,68 \pm 13,99$ мкг/мл; $83,52 \pm 14,01$ мкг/мл и $26,68 \pm 7,87$ мкг/мл, соответственно).

Грибы обладают разнонаправленной чувствительностью к фитообразцам, при этом чувствительность микроорганизмов зависит как от видового состава патогена, так и от химической природы фитообразца.

В рамках экспериментальных исследований, была изучена чувствительность микроорганизмов к ряду фитосубстанций, содержащих фенолпропаноиды и флавоноиды, а также доказано, что грибы, вызывающие поражение кожи и слизистых оболочек человека, обладают чувствительностью к фитосубстанциям, причем эта чувствительность обусловлена видовой особенностью возбудителя.

Ключевые слова: грибы, чувствительность, фитосубстанции.

В настоящее время для подавления возбудителей грибковых культур, вызывающих поражение кожи и слизистых оболочек, используется широкий спектр антимикотических препаратов. При этом, в современной фармакологии всё наибольшую актуальность набирают исследования по поиску новых и более эффективных препаратов с противогрибковыми свойствами [1]–[3].

Помимо данных о чувствительности бактериальных и грибковых культур к антибактериальным и антимикотическим препаратам, в современной литературе всё чаще встречаются работы по изучению чувствительности данных микроорганизмов к субстанциям растительной природы [4]–[6].

Так, из подсолнечника линейнолистного (*Helianthus orgyalis*, сем. *Asteraceae*) выделена активная фракция фенольных веществ. Изолированный из этой фракции антибиотик назван геллоргином. Данное вещество подавляет рост грибов-дерматофитов – 10–50 мкг/мл

и неактивно в отношении грамотрицательных бактерий [7].

Установлено, что наиболее выраженной антимикробной активностью обладает эфирное масло тархуна, которое проявило активность в отношении всех штаммов, причем на грамположительные бактерии в концентрации 312 мкг/мл. Следует также отметить, что эфирное масло превосходит по своей активности препараты сравнения (гвоздичное масло и сангвиритрин). Достаточно высокую активность проявили водно-спиртовые экстракты травы тархуна в концентрации 2500–5000 мкг/мл или в 1:50–1:100, несколько меньшую – настой (10000 мкг/мл). Также установлено, что водно-спиртовой экстракт проявляет антигрибковую активность в отношении грибов рода *Candida* [8], [9].

Говоря об индивидуальных веществах, можно отметить, что кофейная кислота, содержащаяся в таких растениях как: эхинацея пурпурная, мелисса лекарственная, ива корзиночная обладает антибактериальными

и выраженными противогрибковыми свойствами [10].

Имеются сведения о выраженной антимикробной активности эфирного масла Melissa лекарственной при сочетанном применении с антибиотиками в отношении многочисленных тест-культур. Так, при концентрации масла 1:10000 происходила остановка роста мицелия плесневых грибов [11].

Отмечая изменение персистентных свойств грибов, можно отметить, что антилизоцимная активность грибов рода *Candida* снижалась более чем у 75% штаммов на 60% и более от исходного уровня под действием настоев шиповника и полыни, на 40–60% – под действием ромашки и пижмы. В меньшей степени ингибирующее действие проявлял одуванчик – у 66±16,6% штаммов на 20–40% от первоначальных значений АЛА. Береза снижала данный признак лишь у 33±13,6% штаммов *Candida* на 40–60%, при этом у 41,7±12,4% штаммов грибов АЛА не изменялась, а у 25±12,5% штаммов отмечалось повышение персистентного признака на 20–40% [12].

Также в работе О.В. Бухарина с соавт. (2015 г.) экспериментально-клинически обоснован выбор противогрибковой терапии фитосубстанциями под контролем антилизоцимной и липолитической активности *Candida albicans*. Изучение данной активности *Candida albicans* в качестве биомаркера позволило отобрать фитосредства с максимальным ингибирующим эффектом в отношении биологических свойств грибов: настои *Artemisia absinthium L.* и *Rosa cinnamomea L.*, среди растительных ароматических веществ: *Juniperus communis L.*, *Citrus limon burm.*, *Dianthus*, *Melissa officinalis Chaix.* и *Aloe arborescens mill.* Представленные исследования подтвердили эффективность отобранных лекарственных фитосубстанций, которая проявлялась в снижении частоты встречаемости кандидозного дисбиоза кишечника [3].

Таким образом, вопрос изучения чувствительности грибковых культур, остается открытым и актуальным в настоящее время, а полученные данные, в ходе экспериментальных исследований, должны быть использованы для создания высокоэффективных и комбинированных антимикотических препаратов на основе растительных субстанций.

Цель исследования

Изучить чувствительность грибов, вызывающих поражение кожи и слизистых оболочек к фитосубстанциям, содержащим фенилпропаноиды и флавоноиды.

Материалы и методы

Материалом для исследования явились 39 штаммов грибов, вызывающих поражение кожи и слизистых оболочек. Видовой состав был представлен следующими микроорганизмами: *Trichophyton spp.* – 14 штаммов (*Trichophyton rubrum* – 6 штаммов; *Trichophyton mentagrophytes var. Interdigitale* – 3 штамма; *Trichophyton mentagrophytes var. gypseum* – 5 штаммов); *Microsporum canis* – 7 штаммов; *Candida albicans* – 18 штаммов.

Метод серийных двойных разведений в плотной питательной среде применялся для определения чувствительности микроорганизмов к фитосубстанциям. При работе с грибами в качестве плотной среды использовалась среда Сабууро. Среда бралась в объеме 20 мл на стерильную чашку Петри.

При работе с плотной средой готовились рабочие разведения препаратов нужной концентрации, которые вносились в расплавленный раствор агар в отношении 1/9 (2 мл препарата на 18 мл агара). Среда тщательно перемешивалась и разливалась по чашкам Петри. Толщина слоя питательной среды не превышала 3–4 мм.

Грибковый инокулят для посева готовился путем внесения агаровой культуры в изотонический раствор хлорида натрия с последующим доведением до определенной концентрации в камере Горяева.

Посев осуществлялся бактериальной петлей с предварительным определением количества петель в 1 мл. Посевная доза для плотной питательной среды составляла 2×10^7 микробных клеток.

Чашки Петри с разведенными препаратами и засеянные микроорганизмами помещались для инкубирования в термостат для грибов на 7 дней при температуре 29°C.

Учет результатов производился визуально. За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) препарата принимали ту концентрацию, которая вызывала полную ингибицию видимого роста.

Контролем при титровании служили чашки Петри со средой Сабуро, не засеянные микроорганизмами, а также разведения спирта, используемые для приготовления настоек и экстрактов, и разведения диметилсульфоксида (DMSO), используемого в качестве растворителя высококонцентрированных и трудно-растворимых препаратов [13]–[15].

Данные, полученные в ходе исследований, были обработаны методами дескриптивной статистики и представлены в виде доверительного интервала ($M \pm m$). О достоверности различий судили с помощью критерия (t) Стьюдента.

Проверка статистических гипотез проводилась при критическом уровне значимости $p \leq 0,05$.

Статистическая обработка результатов выполнялась с помощью пакета прикладных программ StatSoft Statistica v.6.0 и Excel 2000 (MS Office 2000, USA) [16].

Результаты и обсуждение

Среднестатистические результаты, отражающие чувствительность грибов к фитосубстанциям, взятым в различных разведениях, представлены на рисунках 1, 2, 3, 4.

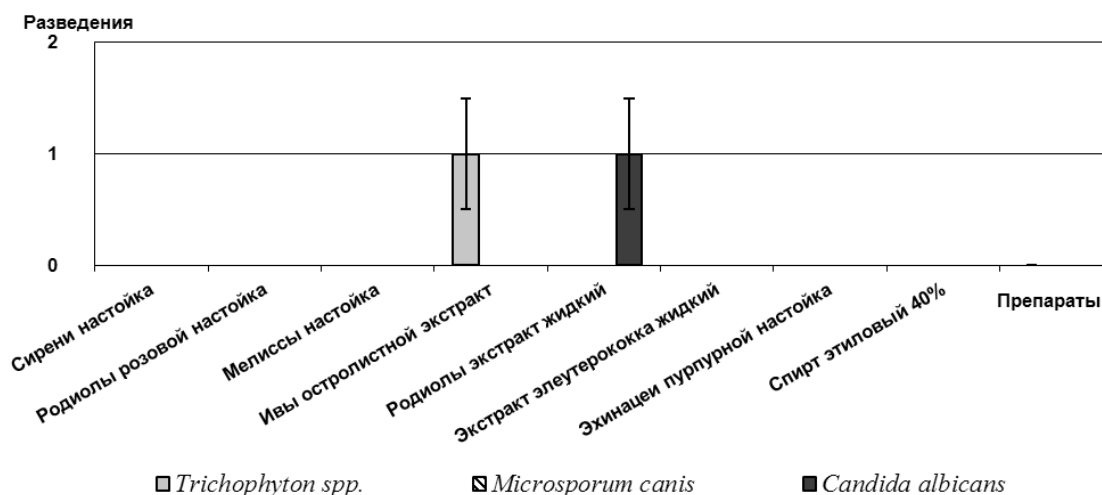


Рисунок 1. Чувствительность грибов к фитосубстанциям, изготовленным на основе 40% спирта этилового, взятым в различных разведениях (среднестатистические значения)

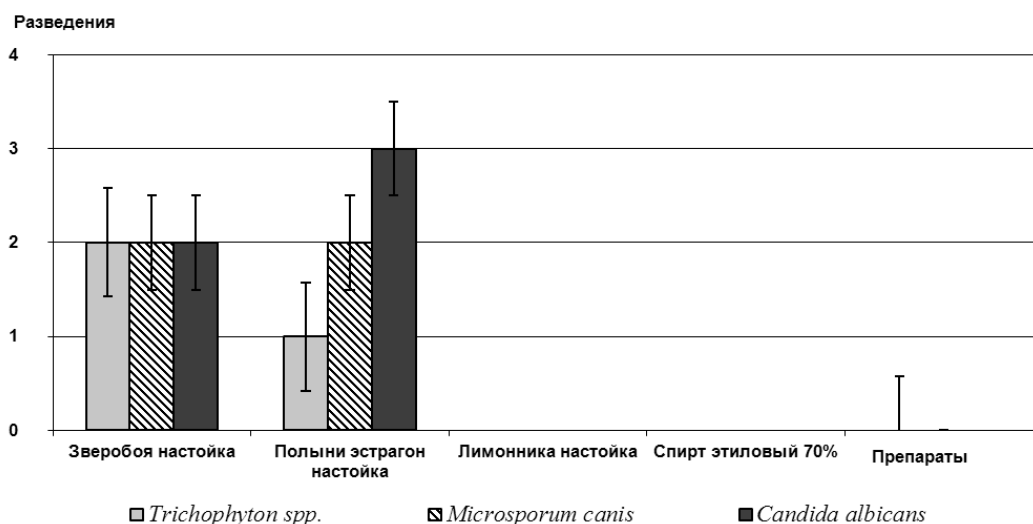


Рисунок 2. Чувствительность грибов к фитосубстанциям, изготовленным на основе 70% спирта этилового, взятым в различных разведениях (среднестатистические значения)

По данным, представленным на рисунке 1, видно, что *Trichophyton spp.* способен задерживать рост только под действием ивы остролистной экстракта, тогда как другие препараты не препятствуют его размножению. Штаммы *Microsporium canis* оказались не чувствительны ко всем вышеперечисленным препаратам, тогда как *Candida albicans* чувствительна только к родиолы экстракту жидкому.

Из данных, представленных на рисунке 2, можно отметить, что *Trichophyton spp.* чувствителен к полыни эстрагон настойке и зверобую настойке, причем к последнему препарату *Trichophyton spp.* проявляет максимальную чувствительность (2-е разведение). *Microsporium canis* чувствителен так же, как и предыдущий род грибов только к полыни эстрагон настойке и зверобую настойке. *Candida albicans* проявляет максимальную чувствительность из всех изучаемых штаммов грибов, и эта чувствительность проявляется к полыни эстрагон настойке (3-е разведение). К лимоннику настойке не один из грибов не чувствителен, что выражается в росте культур на чашках с добавлением препарата.

При анализе результатов исследования, представленных на рисунке 3, выявлено, что *Trichophyton spp.* проявляет чувствительность

только к фитосубстанциям, ведущей группой в которых являются флавоноиды (настойка берёзы и настойка почек тополя). *Microsporium canis* чувствителен к настойке берёзы, настойке почек тополя и расторопши экстракту жидкому. *Candida albicans* чувствителен ко всем вышеуказанным препаратам, за исключением лимонника плодов настойки.

Нерастворимые в воде и спирте фитосубстанции были разведены диметилсульфоксидом в пропорции 1/20. После разведения определялась чувствительность штаммов грибов к фитобразцам.

По результатам, представленным на рисунке 4, видно, что данные штаммы проявляют чувствительность к фитосубстанциям, разведенным диметилсульфоксидом, в разной степени. Также установлено, что максимальной чувствительностью ко всем образцам обладает *Candida albicans*. Максимальная чувствительность *Candida albicans* проявляется ко II фракции углекислотного экстракта гвоздики в 11-ом разведении.

Таким образом, из рисунков 1, 2, 3, 4 следует, что все штаммы грибов чувствительны к фитосубстанциям в разных значениях разведений, однако для количественной оценки чувствительности и для определения антигриб-

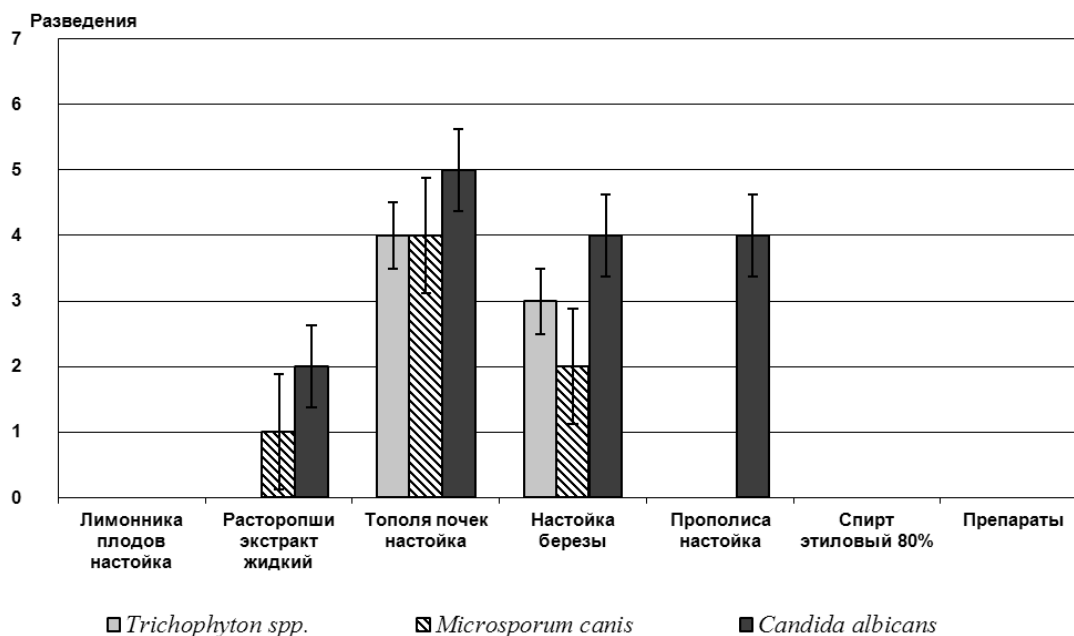


Рисунок 3. Чувствительность грибов к фитосубстанциям, изготовленным на основе 80% спирта этилового, взятым в различных разведениях (среднестатистические значения)

ковой активности фитопрепаратов необходимо определить их минимально-подавляющих концентраций. Качественные показатели чувствительности грибов к фитосубстанциям представлены в таблице 1. Минимально-подавляющие концентрации таких препаратов как эхинацеи пурпурной настойка, сирени настойка, родиолы розовой настойка, мяты настойка, лимонника настойка, лимонника плодов настойка, родиолы экстракт жидкий и экстракт элеутерококка жидкий определить не считается актуальным, так как эти препараты не оказывают видимой задержки роста исследуемых грибов.

По результатам, представленным на рисунках 1, 2, 3, 4 и таблице 1, установлено, что штаммы *Trichophyton spp.*, *Microsporum canis* и *Candida albicans* оказались не чувствительны к настойкам, содержащим в качестве ведущей группы фенолпропаноиды. Чувствительность штаммов проявлялась к эфирным маслам, экстрактам и настойкам с флавоноидами.

Также в результате эксперимента получены средние значения чувствительности исследуемых грибов к фитосубстанциям, выраженные в минимально-подавляющих концентрациях.

Анализируя результаты чувствительности микроорганизмов к фитосубстанциям фенольной природы, было установлено, что *Trichophyton spp.*, *Microsporum canis* и *Candida albicans* обладают максимальной чувствительностью ко второй фракции УЭГ (МПК = $55,68 \pm 13,99$ мкг/мл; $83,52 \pm 14,01$ мкг/мл и $26,68 \pm 7,87$ мкг/мл, соответственно).

Установлено, что грибы обладают разнонаправленной чувствительностью к фитобразцам, при этом чувствительность микроорганизмов зависит как от видового состава патогена, так и от химической природы фитобразца.

Таким образом, в ходе экспериментальных исследований, была изучена чувствительность микроорганизмов к ряду фитосубстанций, содержащих фенолпропаноиды и флавоноиды,

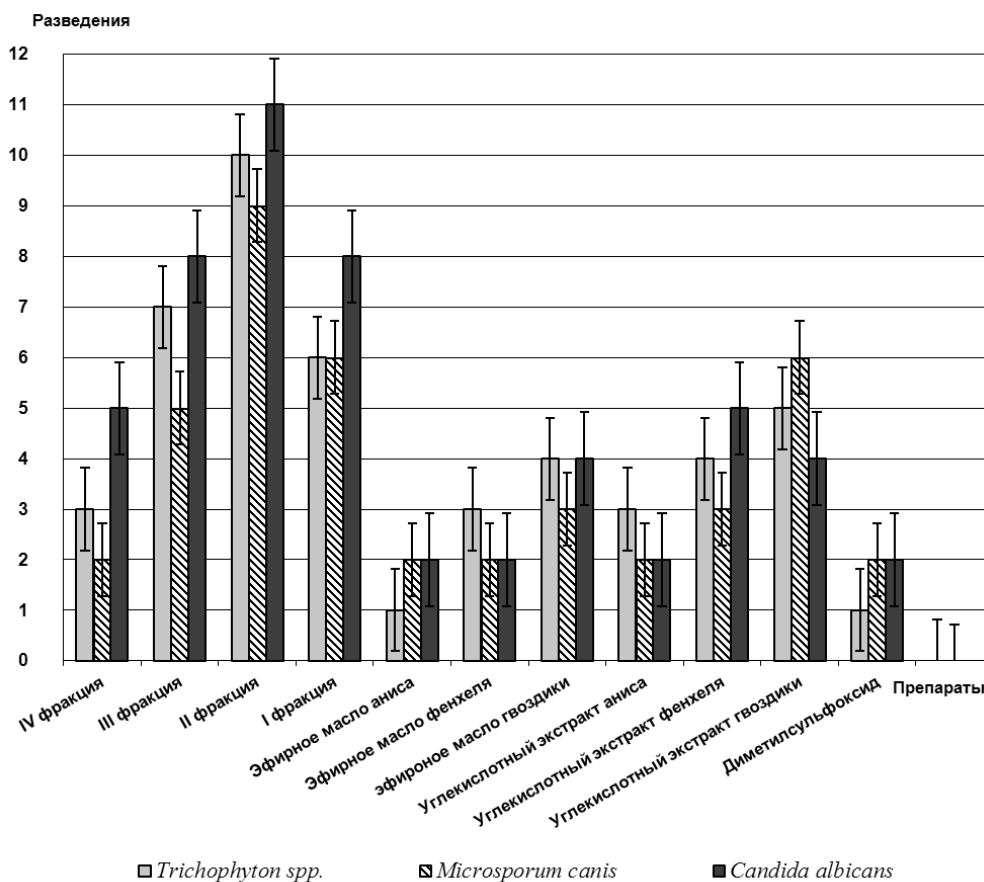


Рисунок 4. Чувствительность грибов к фитосубстанциям, разведенным диметилсульфоксидом и взятым в различных разведениях (среднестатистические значения)

Таблица 1. Средние значения чувствительности исследуемых грибов к фитосубстанциям, выраженных в МПК

№	Препарат	Средние значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) в мкг/мл при титровании в агар Сабуро (M±m)		
		Trichophyton spp. (n = 11)	Microsporum canis (n = 7)	Candida albicans (n = 15)
1.	Полыни эстрагон настойка	11412,65±1284,51	6428,57±1020,20	3214,28±510,10
2.	Зверобоя настойка	1428,57±178,57	1607,14±230,53	1339,28±212,54
3.	Настойка берёзы	1285,71±138,32	2571,43±276,64	847,14±107,14
4.	Прополиса настойка	-	-	1857,14±142,86
5.	Тополя почек настойка	642,85±92,21	535,31±85,02	321,43±46,11
6.	Расторопши экстракт жидкий	-	1700,00±0,00	1020,00±256,36
7.	Ивы остролистной экстракт	525,00±131,95	-	-
8.	Родиолы экстракт жидкий	-	-	660,00±221,63
9.	Эфирное масло гвоздики	570,96± 95,67	1395,68±287,00	666,12±167,42
10.	Эфирное масло фенхеля	1213,7±0,00	-	-
11.	Углекислотный экстракт аниса	1252,7±365,74	-	-
12.	Углекислотный экстракт гвоздики	194,00±57,24	101,26±25,42	320,80±38,23
13.	Углекислотный экстракт фенхеля	687,00±0,00	1443,75± 362,86	378,03±77,65
14.	I фракция УЭГ	883,03±110,38	993,41±142,50	220,76±27,56
15.	II фракция УЭГ	55,68±13,99	83,52±14,01	26,68±7,87
16.	III фракция УЭГ	371,132±0,00	1696,61±212,76	212,07±26,51
17.	IV фракция УЭГ	5819,24±447,63	1432,83±179,08	1790,57±223,82

а также доказано, что грибы, вызывающие поражение кожи и слизистых человека, обладают чувствительностью к фитосубстанциям, причем эта чувствительность носит разнонаправленный характер.

Также считаем целесообразным дальнейшее изучение изменения патогенных,

персистентных свойств и антибиотикочувствительности микроорганизмов под действием фитосубстанций, что позволит углубить данные по воздействию фитообразцов на микроорганизмы и разработать адекватную лекарственную форму для лечения гнойно-воспалительных заболеваний.

2.12.2015

Список литературы:

1. Дерматовенерология. Национальное руководство \ под ред. Ю.К. Скрипкина, Ю.С. Бутова, О.Л. Иванова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 1024 с.
2. Патент РФ №2214239 Антигрибковый препарат / Шакуров И.Г., Шакурова А.И., Куркин В.А., Куркина А.В., Жданов И.П., Жданова А.И. – А 61 К 35/78, Бюл. №29 от 03.09.2001 г. – 6 с.
3. Бухарин О.В., Челпаченко О.Е., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Андрющенко С.В. Экспериментально-клиническое обоснование выбора антимикотических фитопрепаратов // Вестник Оренбургского государственного университета. 2015. – № 3 (178). – с. 183-191.
4. Золотарев П.Н. Выявление и определение антибактериальных свойств фитопрепаратов, содержащих фенилпропаноиды, и чистых веществ // Медицинский вестник Башкортостана. Специальный выпуск. – 2006. – №1. – С. 131-135.
5. Золотарев П.Н. Динамика антибиотикочувствительности микроорганизмов под действием фитосубстанций // Аспирантские чтения – 2007. Труды межвузовской конференции молодых учёных. Приложение к межвузовскому журналу «Аспирантский вестник Поволжья». – Самара, 2007. – С. 21-25.
6. Золотарев П.Н. Оценка антибактериальной активности лекарственных пленок, содержащих II фракцию углекислотного экстракта цветков гвоздики (*Saurophyllus aromaticus* L.) // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. – Самара: Издательство «Самарский университет», 2006. – №9 (49). – С. 145-154.
7. Бондаренко А.С., Омельчук Т.Я., Скоробогатько Т.И. Антимикробная активность некоторых семейств лилейных, лютиковых, губоцветных и крестоцветных // Фитонциды. – Киев, 1967. – С. 85-88.
8. Исследование ранозаживляющих свойств геля эфирного масла полыни гладкой на модели гнойной раны / Р.Н. Пак, Д.Б. Омарханова, М.М. Тусупбекова и др. // XIII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: Тезисы докладов. – М., 2006. – С. 570.
9. Swiader, K. Flavonoids of rare *Artemisia* species and their antifungal properties / K. Swiader, E. Lamer-Zarawka // Fitoterapia. – 1996. – Vol. 67, No. 1. – P. 77-78.
10. Сакович Г.С., Колхир В.К., Енютина Е.Ю. Эстифан – первый отечественный препарат иммуностимулирующего действия из эхинацеи // Человек и лекарство: Тезисы докладов II Российского национального конгресса. – М.: РЦ «Фармединфо», 1995. – 143 с.

11. Koch-Heitzmann I. 2000 Jahre Melissa officinalis / I. Koch – Heitzmann, W. Schultze // Z. Phytotherapie. – 1991. – Vol. 11, No. 2. – P. 50-58.
12. Челпаченко О.Е. Патогенетическое значение микробиоциноза кишечника у детей с синдромом дисплазии соединительной ткани и возможные пути коррекции: Дис.... докт. мед. наук / Челпаченко, О.Е. – Оренбург, 2003. – 348 с.
13. Дмитриева В.С. Микробиологический контроль активности антибактериальных препаратов / В.С. Дмитриева, С.М. Семенов. – М.: Медицина, 1965. – 99 с.
14. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 2004. – 576 с.
15. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Фисенко В.П., Арзамасцев Е.В., Бабаян Э.А. и др. – М.: ИИА «Ремедиум», 2000. – 398 с.
16. Грошовый Т.А. Маркова Е.В, Головкин В.А. Математическое планирование эксперимента. – Киев: Вища школа, 1992. – 185 с.

Сведения об авторе:

Золотарев Павел Николаевич, доцент кафедры морфологии и патологии
Медицинского университета «Реавиз», кандидат медицинских наук
443030, г. Самара, пр. Карла Маркса, 6-48, e-mail: zolotareff@list.ru