

*О.В.Маркина¹, Е.В.Максименко², Н.В.Маркин², Н.А.Селянская¹,
А.И.Шелохович¹, А.Б.Мазрухо¹, Н.И.Борисенко²*

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫМ ЭФФЕКТОМ В ОТНОШЕНИИ *VIBRIO CHOLERAЕ EL TOR*, С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

¹Ростовский-на-Дону противочумный институт, ²Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону

Цель. Изучение состава экстрактов растений с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и оценка их антимикробного эффекта в отношении штаммов *Vibrio cholerae* El Tor. *Материалы и методы.* Качественный и количественный состав растительных экстрактов был изучен с помощью ВЭЖХ. Определение чувствительности микроорганизмов к растительным экстрактам проводили методом диффузии в агаре и методом серийных разведений. *Результаты.* Исследован антибактериальный эффект водных, водно-спиртовых и ацетоновых экстрактов корней кермека, барбариса, солодки. Определены наиболее эффективные способы экстрагирования биологически активных веществ, обладающих антимикробным действием против различных штаммов *V.cholerae* El Tor. *Заключение.* Применение ВЭЖХ позволило установить наличие в экстрактах, обладающих антимикробным эффектом в отношении штаммов *V.cholerae* El Tor, катехинов, алкалоидов протоберберинов и глицирризиновой кислоты.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 63—66

Ключевые слова: растительные экстракты, ВЭЖХ, *Vibrio cholerae* El Tor

*O.V.Markina¹, E.V.Maksimenko², N.V.Markin², N.A.Selyanskaya¹,
A.I.Shelokhovich¹, A.B.Mazrukho¹, N.I.Borisenko²*

STUDY OF COMPOSITION OF PLANT EXTRACTS, POSSESSING ANTIMICROBIAL EFFECT AGAINST *VIBRIO CHOLERAЕ EL TOR*, USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

¹Rostov-on-Don Institute for Plague Control, ²Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Aim. Study the composition of plant extracts using high-performance liquid chromatography (HPLC) and evaluation of their antimicrobial effect against *Vibrio cholerae* El Tor. *Materials and methods.* Qualitative and quantitative composition of plant extracts was studied using HPLC. Determination of sensitivity of microorganisms to plant extracts was carried out by diffusion into agar method and serial dilutions method. *Results.* Antibacterial effect of water, water-alcohol and acetone extracts of roots of *Limonium gmelinii* L., *Berberis vulgaris* L. and *Glycyrrhiza glabra* L. was studied. The most effective methods of extraction of biologically active substances, possessing antimicrobial effect against various strains of *V.cholerae* El Tor, were determined. *Conclusion.* The use of HPLC allowed to establish the presence of catechines, alkaloids protoberberines and glycyrrhizic acid in extracts, possessing antimicrobial effect against *V.cholerae* El Tor strains.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 63—66

Key words: plant extracts, HPLC, *Vibrio cholerae* El Tor

Одним из источников противомикробных средств природного происхождения могут явиться традиционные растения, которые содержат целый комплекс фармакологически активных соединений, обладающих выраженным антимикробным действием. Действие этих веществ основано на денатурации белков мембраны, дестабилизации систем переноса протонов и электронов, нарушении активного

транспорта, ингибирование синтеза ДНК, РНК, белков и полисахаридов. В настоящее время эти соединения представляют особый интерес в связи с появлением антибиотикорезистентных микроорганизмов, в том числе и холерных вибрионов. Описаны экстракты видов растений, обладающих антибактериальным эффектом в отношении *Vibrio cholerae* [3, 6 — 9]. Их качественный и количественный состав изучается с помощью различных современных методов, одним из которых является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), позволяющая разделять сложные смеси веществ до отдельных составляющих. Отечественных работ, касающихся изучения антибактериальных свойств растительных экстрактов в отношении холерных вибрионов, практически нет. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение состава экстрактов растений с помощью ВЭЖХ и оценка их антимикробного эффекта в отношении штаммов *Vibrio cholerae* El Tor.

Водные и водно-спиртовые экстракты корней кермека (*Limonium gmelinii* L.), барбариса (*Berberis vulgaris* L.) и солодки (*Glycyrrhiza glabra* L.) приготовлены следующим образом: к высушенному и измельченному растительному материалу (10 г) добавляли 50 мл дистиллированной воды или 50% водного раствора этанола и оставляли при +4°C или + 25°C соответственно на 18 часов. Затем экстракты центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 20 минут и фильтровали через фильтровальную бумагу. Водные экстракты были обеззаражены с использованием нитроцеллюлозных мембран (диаметры пор 0,45 мкм и 0,22 мкм; Millipore). Для получения ацетонового препарата солодки навеску измельченного корня настаивали в ацетоне в течение 1 часа при интенсивном перемешивании, экстракт фильтровали, а сырье заливали ацетоном и кипятили на водяной бане в течение 5 минут с обратным холодильником. Стадию экстракции горячим ацетоном повторяли еще 2 раза. Растворитель выпаривали, а сухой осадок растворяли в 50% этаноле. В качестве контроля использовали воду и 50% раствор этанола. Качественный и количественный состав экстрактов изучали с помощью обращенно-фазового варианта ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «Agilent 1200» (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany) с диодно-матричным детектированием (ДАД). Использовали следующие условия хроматографирования: колонка «Zorbax SB-C18» (2,1x150 мм, 3,5µм), подвижная фаза: ацетонитрил (CH₃CN): 0,01н H₂SO₄ — 20:80 об. %, температура колонки 28°C, скорость потока подвижной фазы 0,14 мл/мин, длина волны на УФ-детекторе — 205, 280 нм, время хроматографирования — 40 мин, объем вводимой пробы — 1,0 мкл. При детальном изучении экстрактов, содержащих катехины, использовали следующие условия хроматографирования: подвижная фаза — CH₃CN: 0,01н серная кислота — 8:92 (градиент), температура колонки 35°C, скорость элюента 0,14 мл/мин, УФ-детектор 320, 290, 264, 254 и 205 нм. Количественное определение суммы катехинов в экстрактах кермека проводили по методу абсолютной калибровки. В качестве стандартов использовали следующие препараты: катехин и эпикатехин (ICN Biomedicals Inc.), гидрохлорид берберина (Fluka), глицирризиновая кислота (Fluka). Антимикробный эффект экстрактов изучали с помощью токсигенных штаммов *V.cholerae* El Tor P-18895, P-18826, P-4696, P-12214, *V.cholerae* classica P-1391 и атоксигенных штаммов *V.cholerae* El Tor P-18943, P-18960, P-17905, *V.cholerae* nonO1/nonO139 P-9741, полученных из музея Ростовского-на-Дону противочумного института. Среди них штамм *V.cholerae* El Tor P-18826 являлся высокорезистентным к налидиксовой кислоте, стрептомицину, ампициллину, триметоприму/сульфаметоксазолу, умеренно резистентным к цефтриаксону и цефотаксиму, имел перекрестную устойчивость к фторхинолонам (ципрофлоксацину, офлоксацину, пефлоксацину, норфлоксацину). Для оценки антибактериального действия экстрактов колонии суточных культур вибрионов суспендировали в ФСБ (рН 7,4) с таким расчетом, чтобы плотность клеток достигала 10⁹ КОЕ/мл. На чашки с агаром LB (рН 7,2) высевали по 0,1 мл бактериальной суспензии. Металлическим пробойником асептически делали лунки d=5мм, в которые вносили испытуемые препараты растений в различных концентрациях в объеме 50 мкл. Результаты

учитывали на следующие сутки, измеряя диаметры зон подавления роста вибрионов. Определение чувствительности микроорганизмов к растительным препаратам методом серийных разведений проводили на агаре LB, в который добавляли растительные препараты в разных концентрациях. Для этого стерильно вносили во флакон с 18 мл агара по 2 мл различных препаратов. Тщательно перемешивали и выливали в чашку Петри. После этого на поверхность агара наносили бактериальную суспензию (10^9 КОЕ/мл). Через сутки учитывали интенсивность роста бактерий. Для статистической обработки результатов использовали пакет программ Office XP (Excel).

При изучении хроматограммы водного экстракта кермека были зарегистрированы несколько пиков в области УФ спектра 205 нм. Согласно данным литературы, таким поглощением характеризуются хромофоры класса R-OH [2]. К ним относятся гидролизуемые и негидролизуемые танины, в частности, катехин, эпикатехин и их производные. Испытание полученного экстракта, содержащего катехин и его производные в концентрации 4,6 мг/мл, показало, что диаметры зон подавления роста (ЗПР) холерных вибрионов в концентрации 10^9 КОЕ/мл, составили от 10 до 16 мм. Если концентрацию микроорганизмов снижали до 10^8 КОЕ/мл, то диаметр ЗПР увеличивался в некоторых случаях до 36 мм. В методе серийных разведений нами было установлено, что при добавлении в питательный агар LB экстракта кермека, содержащего катехины в концентрациях от 1,0 до 2,3 мг/мл, полностью подавлялся рост холерных вибрионов. На хроматограммах водных экстрактов корней барбариса и стандарта берберина зарегистрированы пики с $t_R=18,2; 19,99; 35,97$ и $38,58$ минут, свидетельствующие об одинаковой химической природе данных соединений, а именно — алкалоиды протоберберины; наличие пиков с t_R в пределах 2 — 7 минут свидетельствовало о содержании в экстракте также соединений из группы катехинов. Данный экстракт барбариса, содержащий 5,3 мг/мл бербериновых алкалоидов, обладал более слабой активностью в отношении вибрионов, чем экстракт кермека и, в частности, не ингибировал рост штаммов *V.cholerae* El Tor P-18895, P-4696, P-18826. Диаметры ЗПР остальных штаммов не превышали 10,0 мм. На хроматограмме водного экстракта корней солодки регистрировали небольшие пики, соответствующие пикам глицирризиновой кислоты и ее производных — главных биологически активных веществ этого растения. Однако данный экстракт оказался неактивным в отношении всех изученных штаммов холерных вибрионов.

Поскольку считается, что вода достаточно слабо экстрагирует такие соединения как алкалоиды, полифенолы, флавонолы и терпеноиды, то на следующем этапе работы для их экстракции из корней кермека, барбариса и солодки использовали 50% этанол. В результате, были получены водно-спиртовые экстракты кермека, которые обладали активностью, не превышающей активность водных экстрактов. Водно-спиртовые экстракты корней барбариса содержали бербериновые алкалоиды в концентрации 7,2 мг/мл и обладали активностью в отношении всех штаммов холерных вибрионов; диаметры ЗПР составляли от 10 до 18 мм. В методе серийных разведений экстракты с содержанием алкалоидов в концентрации 3 — 4 мг/мл ингибировали рост всех штаммов *V.cholerae*. В водно-спиртовом экстракте корней солодки концентрация глицирризиновой кислоты составляла 16,2 мг/мл. При его испытании установлено, что диаметры ЗПР штаммов *V.cholerae* были на уровне 11,0 — 15,0 мм. Одновременно нами были получены ацетоновые экстракты корней солодки с концентрацией глицирризиновой кислоты 20,2 мг/мл. Антимикробная активность ацетоновых экстрактов в сравнении с водно-спиртовыми увеличивалась в 1,5 — 2 раза.

Таким образом, в настоящем исследовании нами был изучен антимикробный эффект в отношении штаммов холерных вибрионов экстрактов корней кермека, барбариса и солодки, полученных различными способами и охарактеризованных с помощью ВЭЖХ. Установлено, что экстракты обладают различной антимикробной активностью в отношении штаммов *V.cholerae* El Tor. Так, высоким антибак-

териальным эффектом обладал водный экстракт кермека, что, по-видимому, связано с наличием в нем соединений, принадлежащих группе катехинов (эпикатехины, эпигаллокатехины и др.), обладающих способностью связываться с различными структурными белками клеточной стенки, токсинами, ферментами, адгезинами вибрионов, которые представлены в корнях кермека. Считается, что из индивидуальных веществ, именно эпигаллокатехин-3-О-галлат имеет высокий показатель противомикробной активности при минимальной концентрации. Антибактериальная активность экстрактов барбариса в отношении некоторых грамотрицательных микроорганизмов, как известно, связана с алкалоидами протоберберинами [4]. Эти соединения непосредственно воздействуют на ДНК клетки путем интеркаляции (образование вставок между парами оснований), запускают механизм свободно-радикального окисления с повреждением мембран клеток и внутриклеточных структур, ДНК, что ведет к нарушению процессов репликации и транскрипции [5]. Эти вещества и были нами обнаружены в водном и водно-спиртовом экстрактах барбариса. Однако не исключено, что определенный вклад в их антимикробный эффект вносят и соединения группы катехинов, обнаруженные в экстракте корней барбариса. Антибактериальную активность экстрактов корней солодки, как правило, связывают с тритерпеноидами, в частности, глицирризиновой кислотой и ее солями, изофлавоноидами, например, глабридином и др. [1]. В нашем эксперименте высокой активностью обладали только водно-спиртовой и ацетоновый экстракты, тогда как водные были неактивны, хотя в них также регистрировали присутствие глицирризиновой кислоты. Не исключено, что наиболее высокое биологическое действие ацетоновых экстрактов связано не только с глицирризиновой кислотой, но и с присутствием в них каких-то других антибактериальных соединений. Можно заключить, что благодаря ВЭЖХ нам удалось провести качественную и количественную характеристику экстрактов растений и определить наиболее эффективные способы экстрагирования биологически активных веществ, обладающих антимикробным действием в отношении различных штаммов *V.cholerae* El Tor, в том числе и антибиотикорезистентных.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 13-03-12271 офу_м).

ЛИТЕРАТУРА

1. Астафьева О.В. Использование *Glycyrriza glabra*, *Achillea micrantha* Willd. и *Helichrysum aeneum* L. для разработки биопрепаратов с антибактериальными свойствами. Автореф. дис. канд. биол. наук. Ставрополь, 2013.
2. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М., 1976.
3. Akinsinde K.A., Olukoya D.K. Vibriocidal activities of some local herbs. *J. Diarrhoeal. Dis. Res.* 1995, 13 (2): 127-129.
4. Cernáková M., Kostálová D. Antimicrobial activity of berberine — a constituent of *Mahonia aquifolium*. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2002, 47 (4): 375-378.
5. Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical. Microbial. Rev.* 1999, 12 (4): 564-582.
6. Kumar P., Selvi S.S., Govindaraju M. et al. In vitro anti-biofilm and anti-bacterial activity of *Juncella juncea* for its biomedical application. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 2012, 2 (12): 930-935.
7. Mutalib A. A., Ashwell R. N., Kannan R. R. et al. Antimicrobial and selected in vitro enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *croton menyharthii*. *Molecules*. 2013, 18: 12633-12644.
8. Sánchez E., García S., Heredia N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76 (20): 6888-6894.
9. Yamasaki S., Asakura M., Basu N. S. et al. Inhibition of virulence potential of *Vibrio cholerae* by natural compounds. *Indian. J. Med. Res.* 2011, 133 (2): 232-239.

Поступила 10.06.15

Контактная информация: Маркина О.В.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40, р.т. (863)234-23-11

Н.Г.Саркисян^{1,3,5}, Л.В.Ганковская², И.А.Тузанкина^{1,3}, О.А.Свитич⁴,
Г.И.Ронь⁵, В.Н.Шершнева⁶, О.Н.Колядина², М.А.Долгих⁵

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ В ГЕНАХ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

¹Уральский федеральный университет, Екатеринбург; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва; ³Институт иммунологии и физиологии, Екатеринбург; ⁴НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ⁵Уральский медицинский университет, ⁶Институт промышленной экологии, Екатеринбург

Цель. Поиск ассоциации полиморфизмов в генах DEFB1, IL-10, TNF- α и TLR2 с развитием хронического генерализованного пародонтита у представителей уральского региона (европеоидной расы). *Материалы и методы.* В исследовании участвовали 142 пациента, которые были поделены на три группы: группа пациентов с пародонтитом, группа с частыми воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей и группа сравнения — здоровые доноры. В работе было проведено исследование полиморфных маркеров: DEFB1 (-44G/C), DEFB1 (-20A/G), IL-10 (-1082 A/G), TNF- α (-308 G/A), Arg753Gln и Arg677Trp с помощью ПЦР в режиме реального времени. *Результаты.* Определена ассоциация инфекционной патологии верхних дыхательных путей и возникновения заболеваний пародонта с полиморфными маркерами в генах DEFB1 (-44G/C) и Arg753Gln и Arg677Trp. Не выявлено достоверных различий в распределении генотипов и аллелей генов IL-10 и TNF- α в группе пациентов с пародонтитом и группе сравнения. *Заключение.* Полиморфизм DEFB1 (-44G/C) может рассматриваться в качестве маркера риска развития пародонтита.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 67—71

Ключевые слова: пародонтит, полиморфизм, врожденный иммунитет, TLR, цитокины, дефенсины, инфекция

N.G.Sarkisyan^{1,3,5}, L.V.Gankovskaya², I.A.Tuzankina^{1,3}, O.A.Svitich⁴,
G.I.Ron⁵, V.N.Shershnev⁶, O.N.Kolyadina², M.A.Dolgikh⁵

ASSOCIATION OF POLYMORPHIC MARKERS IN GENES OF INNATE IMMUNITY IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS AND INFLAMMATORY DISEASES OF UPPER RESPIRATORY TRACT

¹Ural Federal University, Ekaterinburg; ²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow; ³Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg; ⁴Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ⁵Ural Medical University, ⁶Institute of Industrial Ecology, Ekaterinburg, Russia

Aim. Search of association of polymorphisms in DEFB1, IL-10, TNF- α and TLR2 genes with development of chronic generalized periodontitis in representatives of Ural region (Caucasian race). *Materials and methods.* 142 patients, that were split into 3 groups, took part in the study: a group of patients with periodontitis, a group with frequent inflammatory disease of upper respiratory tract and a comparison group — healthy donors. A study of polymorphic markers was carried out: DEFB1 (-44G/C), DEFB1 (-20A/G), IL-10 (-1082 A/G), TNF- α (-308 G/A), Arg753Gln and Arg677Trp using PCR in real time mode. *Results.* Association of infectious pathology of upper respiratory tract and development of periodontitis diseases with markers in DEFB1 (-44G/C) and Arg753Gln and Arg677Trp genes was determined. Significant differences in distribution of genotypes and alleles of genes IL-10 and TNF- α in the group of patients with periodontitis and comparison group were not detected. *Conclusion.* DEFB1 (-44G/C) polymorphism can be examined as a marker of periodontitis development risk.