

## ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО (*HELICHRYSUM ARENARIUM*) IN VITRO

В. В. Скворцова<sup>1</sup>, Н. А. Наволокин<sup>1</sup>, Н. В. Полуконова<sup>1</sup>, Е. В. Манаенкова<sup>2</sup>,  
Л. Э. Панкратова<sup>1</sup>, М. А. Курчатова<sup>1</sup>, Г. Н. Маслякова<sup>1</sup>, Н. А. Дурнова<sup>1</sup>

В работе использовали водный раствор сухого экстракта цветков *Helichrysum arenarium* (L.), полученного авторским способом, с высоким содержанием флавоноидов. Установили, что экстракт бессмертника песчаного обладает бактерицидным действием в концентрации 50 мг/мл в отношении штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), характеризующихся следующими аминокислотными заменами: Ser → Leu, определяющей изменения в структуре β-субъединицы РНК-полимеразы МБТ, и Ser → Thr, инактивирующей фермент каталазу-пероксидазу микобактерий. Механизм действия экстракта отличается от противотуберкулезных препаратов первого ряда, так как штаммы, устойчивые к ним, чувствительны к экстракту бессмертника. Данный экстракт может быть рекомендован для проведения доклинических и клинических исследований при поиске препаратов для лечения туберкулеза, изучении новых механизмов воздействия на *M. tuberculosis*, а также может стать перспективным препаратом для лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью.

**Ключевые слова:** флавоноиды; лекарственная устойчивость; микобактерии туберкулеза; *Helichrysum arenarium*.

### ВВЕДЕНИЕ

Борьба с туберкулезом относится к одному из наиболее приоритетных направлений современной медицины [12]. Значимость этой проблемы возросла в последние десятилетия, когда после периода длительного благополучия, связанного с открытием и широким использованием противотуберкулезных препаратов, вновь стал отмечаться рост заболеваемости туберкулезом во всех странах мира [16]. Одной из основных причин нарастания эпидемии туберкулеза во всем мире служит распространение лекарственно-устойчивых форм заболевания, плохо поддающихся лечению ограниченными набором известных противотуберкулезных препаратов.

Лечение пациентов с лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза и особенно с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) к 2 основным препаратам — изониазиду и рифампицину — требует значительно более дорогостоящего и длительного лечения препаратами, вызывающими серьезные побочные реакции и имеющими широкий спектр противопоказаний [15]. Все это обуславливает необходимость поиска новых антимикробных средств с противотуберкулезным действием, нетоксичных и не обладающих выраженным мутагенным эффектом [4]. Одним из источников таких средств стали экстракты из лекарственного растительного сырья (ЛРС).

Известен ряд лекарственных композиций на основе экстрактов ЛРС — экстракт из цветков багульника, ли-

стьев подорожника, тимьяна, крапивы и др., используемые для лечения больных инфильтративным туберкулезом легких [1]. Преимущества имеют растительные экстракты, полученные многоступенчатым способом очистки от балластных соединений, направленным на увеличение выхода определенных соединений с уже известным действием. Перспективной группой противомикробного действия являются биофлавоноиды, представляющие собой растительные фенольные соединения [10].

Для проведения данного исследования нами выбрано растительное сырье — цветки бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench). Официальные лекарственные препараты из цветков бессмертника обладают желчегонным и гепатопротекторным действием [4]. Антимикробная активность известна не только для экстракта из цветков *H. arenarium*, но и для других видов этого рода — *H. odoratissimum*, *H. nitens*, *H. rugosolum*, *H. ambiguum*, *H. bilobum*, *H. davenportii*, *H. leucopsidium*, *H. lindleyi*, *H. armenium* [6].

Ранее был установлен химический состав сырья *H. arenarium*. В соцветиях содержится сумма таких флавоноидов (до 9,2%), как флаванон нарингенин, флавонол апигенин; флавонол кемпферол, халкон изосалипурпозид, а также рутин, гелихризин, лютеолин, кверцетин; халконизосалипурпозид [3, 5].

В отношении *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) ранее исследовалась активность смеси отдельно полученных извлечений из сырья *H. arenarium* — водного извлечения и спиртового экстракта (патент № 2362577, 2007 г.). При этом в патенте не было дополнительных указаний на удаление спирта из готового средства, в результате чего на микобактерии мог оказывать подавляющий эффект спирт. Известно, что ис-

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского Минздрава России, ГСП, 410012, Россия, Саратов, ул. Большая Казачья, 112.

<sup>2</sup> ГБУЗ «Тамбовский областной клинический противотуберкулезный диспансер», 392315, Россия, Тамбов, п. Георгиевский.

следуемый водный раствор спиртового экстракта бессмертника песчаного обладает противоопухолевой активностью и задерживает рост перевиваемой саркомы-45 и вызывает в ней обширные зоны некроза и фиброза [7, 13], но противотуберкулезные свойства данного экстракта не изучены.

Цель исследования — изучение динамики роста музейного штамма *M. tuberculosis* под действием водного раствора сухого спиртового экстракта бессмертника песчаного и исследование активности разных его концентраций в отношении музейного и резистентных клинических штаммов МБТ, отличающихся нуклеотидными заменами в геноме.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на базе бактериологической лаборатории ГБУЗ “Тамбовский областной клинический противотуберкулезный диспансер”.

В исследовании использован водный раствор сухого спиртового экстракта цветков бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.), приготовленный определенным способом [8 – 10]. Для экстракции использованы цветки бессмертника, собранные нами на территории Саратовской области; содержание флавоноидов в которых рассчитано по методике В. П. Георгиевского [2] и в среднем в пересчете на нарингенин составляло  $5,05 \pm 0,51$  % [5]. Полученный нами экстракт имеет среднее значение кверцетина в смеси, установленное методом ВЭЖХ, 0,3 мкг/мл, а количество кверцетина в сухом остатке (на 350 мг экстрактивных веществ) составило 150 мкг. Методом молекулярной абсорбционной спектроскопии найдено 29,4 мкг/мл флавоноидов в пересчете на рутин. Массовое процентное содержание флавоноидов в экстракте — 21,0 %. Экстракт содержит также 2,3-дигидробензофуран, 2-метокси-4-винилфенол, гексадекановую кислоту (пальмитиновую кислоту), бис(2-этилгексил)эфир адипиновую кислоту.

Штаммы МБТ с различной степенью лекарственной устойчивости были получены при посеве респираторного материала (мокрота) от больных, проходящих лечение в ГБУЗ “Тамбовский областной клинический

противотуберкулезный диспансер”, с использованием стандартной методики оценки лекарственной устойчивости микобактерий на плотной яичной питательной среде Левенштейна-Йенсена, не содержащей крахмал (HiMedia, Индия), методом абсолютных концентраций [12].

Анализ проводили на 6 штаммах: музейном — H37Rv, не имеющем антибактериальной резистентности (для определения динамики роста и целесообразности дальнейших исследований), а также штаммах, имеющих резистентность, для которых нами бактериологическим исследованием (методом абсолютных концентраций) была предварительно установлена степень устойчивости к противотуберкулезным препаратам первого ряда. Культуру МБТ расценивали как устойчивую к экстракту только при наличии роста 20 колоний и более, и как чувствительную при росте менее 20 колоний.

Молекулярно-генетическое исследование анализируемых штаммов с МЛУ проводили с помощью метода гибридизации на биочипах “ТБ-БИОЧИП” (ООО “Биочип-ИМБ”, Россия) по методике, рекомендованной производителем. Метод включал в себя выделение ДНК *M. tuberculosis* из респираторных образцов, проведение 2 последовательных мультиплексных ПЦР, гибридизации продуктов амплификации второй стадии ПЦР на биочипе. Результаты гибридизации регистрировали на портативном анализаторе биочипов (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия) с соответствующим программным обеспечением.

При исследовании активной бактериостатической/бактерицидной концентрации было заложено 8 линий культур: первая линия представляла собой положительный контроль (ряд из 4 пробирок с каждым штаммом без воздействия), вторая линия — ряд из 4 пробирок без засева штаммами для исключения случайного роста МБТ (отрицательный контроль). 6 линий (культуры с 1 музейным и 5 клиническими штаммами) были экспериментальными и содержали по 6 пробирок с разными разведениями экстракта.

Установление минимальной подавляющей концентрации (МПК) для экстракта бессмертника проводили по методу серийных разведений на плотной яичной среде Левенштейна-Йенсена, не содержащей крахмал

Таблица 1. Динамика роста музейного штамма *M. tuberculosis* под действием экстракта бессмертника

Повторность	Группа	Титр микробных тел, КОЕ							
		7 день		10 день		17 день		с 23 по 28 день	
		$50 \cdot 10^7$	$500 \cdot 10^7$	$50 \cdot 10^7$	$500 \cdot 10^7$	$50 \cdot 10^7$	$500 \cdot 10^7$	$50 \cdot 10^7$	$500 \cdot 10^7$
1	Контроль	-	-	+	++	++	+++	+++	+++
	Экстракт	-	-	-	-	-	-	+	+
2	Контроль	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	Экстракт	-	-	-	-	++	++	++	++

КОЕ — колонию образующая единица

(1+) — 1 – 20 КОЕ — скудный рост МБТ

(2+) — 21 – 100 КОЕ — умеренный рост МБТ

(3+) — более 100 КОЕ — обильный рост МБТ.

(производство HiMedia, Индия) [12]. Водный раствор сухого спиртового экстракта добавляли к среде во время ее приготовления при температуре 20 – 25 °С, равномерно распределяя его. МБТ засеивали стандартного титра (содержание клеток, соответствующее  $10^7$  микробных тел/мл). Контроль роста колоний возбудителя туберкулеза проводили в течение 28 сут [12].

Исследовали динамику роста музейного штамма под действием экстракта бессмертника в концентрации 7 мг/мл. Наблюдения также проводили в течение 28 сут, но засеивали на питательную среду 2 титра МБТ с содержанием клеток, соответствующим  $50 \cdot 10^7$  и  $500 \cdot 10^7$  микробных тел в 1 мл.

Собственная модификация стандартного метода заключалась в замене абсолютных концентраций серийным разведением с целью определения порога концентраций экстракта, при преодолении которого рост МБТ не определялся.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Изучение динамики роста музейного штамма *M. tuberculosis* под действием экстракта бессмертника.** В обеих повторностях наблюдалось более позднее появление колоний МБТ на среде с добавлением экстракта бессмертника на 17 день от посева, в то время как в контрольных группах рост колоний отмечался с 7 и 10 дня (табл. 1). В первой серии бактерицидный эффект экстракта продолжался до 20 дня наблюдения, и то рост был отмечен лишь при титре МБТ  $500 \cdot 10^7$ . При титре МБТ  $50 \cdot 10^7$  колонии появлялись только на 23 сут наблюдения, при этом рост колоний на среде с экстрактом был выражен меньше, чем в контроле (1+ и 3+ соответственно). Подобная закономерность отмечена и во второй повторности: наблюдался более поздний рост колоний МБТ, и интенсивность роста была выражена в меньшей степени на среде с добавлением экстракта бессмертника. Более позднее появление роста МБТ на среде с добавлением экстракта бессмертника и менее выраженный рост колоний с 18 по 30 день наблюдения, по сравнению с контролем, позволяют судить о наличии слабого бактериостатического действия экстракта на музейный штамм МБТ.

**Исследование активности разных концентраций экстракта бессмертника в отношении музейного и резистентных клинических штаммов *M. tuberculosis*, отличающихся нуклеотидными заменами.** Так

как музейный штамм, согласно стандартам, чувствителен ко всем противотуберкулезным химио-препаратам, он был рассмотрен нами в качестве группы сравнения. Второй, третий и шестой клинические штаммы оказались резистентными к противотуберкулезным препаратам первого ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу), поэтому обозначены как МЛЮ; четвертый и пятый клинические штаммы оказались чувствительными к основным химиопрепаратам.

Штаммы, оцененные как устойчивые к основным противотуберкулезным препаратам — МЛЮ, тестировали с помощью молекулярно-генетического метода, в результате чего определяли особенности их нуклеотидного состава ДНК (табл. 2).

Установлено, что экстракт бессмертника в отношении музейного штамма обладает бактериостатической активностью в концентрации раствора в среде 25 мг/мл; а бактерицидным — 50 мг/мл и выше (табл. 3).

В отношении штаммов *M. tuberculosis* с МЛЮ — 2, 3 и 6 — экстракт обладает бактериостатической активностью в концентрации раствора в среде 50 мг/мл, а бактерицидной — при 100 мг/мл и выше (табл. 3).

В отношении штамма 4, чувствительного к основным препаратам, концентрация экстракта с бактериостатическим действием нами не выявлена, хотя можно предположить, что эта концентрация будет находиться в диапазоне от 25 до 50 мг/мл (табл. 3); в отношении штамма 5 концентрация экстракта с бактериостатическим действием равна 25 мг/мл. Концентрация экстракта бактерицидного действия для обоих штаммов — 50 мг/мл и выше (табл. 3).

В результате экстракт бессмертника оказался эффективен против штаммов, характеризующихся следующими аминокислотными заменами: Ser → Leu, определяющей изменения в структуре β-субъединицы РНК-полимеразы МБТ, и Ser → Thr, инактивирующей фермент каталазу-пероксидазу микобактерий.

Таким образом, нами доказана противотуберкулезная бактериостатическая и бактерицидная активность экстракта бессмертника песчаного, исследуемая *in vitro*. При этом механизм действия явно отличается от препаратов первого ряда, так как штаммы, устойчивые к ним, чувствительны к экстракту бессмертника. Данный экстракт может быть рекомендован и рассмотрен

Таблица 2. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *M. tuberculosis* с МЛЮ

№ тестируемой культуры	Устойчивость к рифампицину			Устойчивость к изониазиду		
	Ген	Кодон	Аминокислотная замена	Ген	Кодон	Аминокислотная замена
2	rpoB	531	Ser → Leu	katG	315	Ser → Thr(1)
3	rpoB	531	Ser → Leu	inhA	15	
6	rpoB	531	Ser → Leu	katG	315	Ser → Thr(1)
				katG	315	Ser → Thr(1)

Таблица 3. Результаты анализа противотуберкулезной активности экстракта бессмертника на штаммах *M. tuberculosis* № 1 – 6

Концентрация экстракта в среде, мг/мл	Учет результата	№ тестируемой культуры					
		1 (H37Rv)	2 (МЛУ)	3 (МЛУ)	4	5	6 (МЛУ)
	число КОЕ* в контроле	95 %	95 %	95 %	90 %	95 %	90 %
100,0	число КОЕ	–	–	–	–	–	–
	результат	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
50,0	число КОЕ	–	<b>8*</b>	<b>2</b>	–	–	<b>15*</b>
	результат	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
25,0	число КОЕ	<b>6*</b>	32*	95 %	25*	<b>10*</b>	50*
	результат	<b>S</b>	R	R	R	<b>S</b>	R
12,5	число КОЕ	30*	90 %	90 %	90 %	45*	85 %
	результат	R	R	R	R	R	R
6,3	число КОЕ	85 %	95 %	90 %	90 %	80 %	90 %
	результат	R	R	R	R	R	R

**Примечание:** \* Число КОЕ указано, если его можно подсчитать. При большом числе КОЕ, не поддающемся подсчету, указана приблизительная доля (%) поверхности питательной среды с ростом МБТ; S — штамм чувствителен, R — штамм устойчив. Жирным шрифтом выделены результаты, свидетельствующие о чувствительности штамма к определенной концентрации раствора экстракта.

для проведения доклинических и клинических исследований, поиску новых механизмов воздействия на *M. tuberculosis*, а также может стать перспективным препаратом для лечения туберкулеза с МЛУ, как самостоятельное лекарственное средство или в составе комплексной терапии с другими противотуберкулезными препаратами.

## ВЫВОД

Доказана противотуберкулезная бактериостатическая и бактерицидная активность экстракта бессмертника песчаного, исследуемая *in vitro*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Н. Буркова, Н. К. Бычкова, *Патент России 2210379* (2003).
2. В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, С. Е. Дмитрук, *Биологически активные вещества лекарственных растений*, Наука, Новосибирск (1990).
3. В. А. Куркин, *Фармакогнозия: учебник для фармацевтических вузов (факультетов)*, Самара (2007).
4. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства: пособие по фармакотерапии для врачей*, ч. 1, Москва (2005).
5. Н. В. Машурчак, А. С. Кашин, В. В. Игнатов, *Поволжский экологический журнал*, **1**, 53 – 61 (2009).
6. И. С. Мелкумян, *Известия Академии наук Армянской ССР*, **XI**(1), 27 – 35 (1958).
7. Н. А. Наволокин, Н. В. Полуконова, Г. Н. Маслякова и др., *Рос. биотер. журн.*, **12**(2), 59 (2013).
8. Н. В. Полуконова, Н. А. Дурнова, М. Н. Курчатова и др., *Химия растительного сырья*, № 4, 165 – 173 (2013).
9. Н. В. Полуконова, Н. А. Наволокин, Н. А. Дурнова и др., *Патент России 2482863* (2013).
10. Н. В. Полуконова, Н. А. Наволокин, С. В. Райкова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **78**(1), 34 – 38 (2015).
11. А. А. Приймак, *Пульмонология*, **5**, 35 – 38 (2005).
12. Приказ МЗ РФ от 21 марта 2003 г. № 109 “О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации”, [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_100873/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_100873/).
13. В. В. Скворцова, Н. А. Наволокин, *Бюл. мед. интернет-конференций*, **3**(2), 258 (2013).
14. Туберкулез в РФ 2011 г. *Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире*, Москва (2013).
15. *Туберкулез — национальное руководство*, М. И. Перельман (ред.), ГЭОТАР, Москва (2007).
16. G. S. Vuyiswa, *Phytochemical studies of Helichrysum patulum*, Department of Chemistry; University of the Western Cape, Bellville (2006), [http://etd.uwc.ac.za/xmlui/bitstream/handle/11394/2050/Swartz\\_MSC\\_2006.pdf?sequence=1](http://etd.uwc.ac.za/xmlui/bitstream/handle/11394/2050/Swartz_MSC_2006.pdf?sequence=1).

Поступила 24.11.14

## ANTITUBERCULOUS IN VITRO ACTIVITY OF HELICHRYSUM ARENARIUM EXTRACT

V. V. Skvortsova<sup>1</sup>, N. A. Navolokin<sup>1</sup>, N. V. Polukonova<sup>1</sup>, E. V. Manaenkova<sup>2</sup>, L. E. Pankratova<sup>1</sup>, M. N. Kurchatova<sup>1</sup>, G. N. Maslyakova<sup>1</sup>, and N. A. Durnova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V. I. Razumovsky Saratov State Medical University, ul. Bol'shaya Kazach'ya 112, Saratov, 410012 Russia;

<sup>2</sup> Tambov Regional Clinical Tuberculosis Dispensary, p. Georgievskii, Tambov oblast, 392315 Russia

Bacteriostatic and bactericidal activity of aqueous solution (50 mg/mL) of alcoholic extract of *Helichrysum arenarium* (L.) dried flowers, prepared by a special technique so as to increase the yield of flavonoids, was studied *in vitro* with respect to *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) strains possessing varying degrees of drug resistance, as characterized by replacements Ser R Leu (modification of b-subunit RNA-polymerase of MBT) and Ser R Thr (inactivation of MBT catalase-peroxidase enzyme). The mechanism of this drug action is clearly distinguished from that of the first-line drugs, since strains resistant to these reference drugs have proved susceptible to extract *H. arenarium* extract. This extract can be recommended for preclinical and clinical studies in the search for new antituberculous drugs and for studying new mechanisms of drug action on MBT. It may also be an effective drug for the treatment of multidrug-resistant MBT strains.

**Keywords:** flavonoids; drug resistance; *M. tuberculosis*; *Helichrysum arenarium*.