

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені М. І. Пирогова**

МІЗЮК РУСЛАН МИХАЙЛОВИЧ

УДК 615.281+615.322

**ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ
КУЛЬТИВОВАНИХ І ДИКОРІСТУЧИХ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН
ГАЛИЧИНИ ВІДНОСНО ОСНОВНИХ ЗБУДНИКІВ
ГНІЙНО-СЕПТИЧНИХ ІНФЕКЦІЙ**



03.00.07 – мікробіологія

**Автореферат
на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук**

Вінниця – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» МОЗ України

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор **Куцик Роман Володимирович**, ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор **Власенко Ірина Георгіївна**, Вінницький торговельно-економічний інститут Київського національного торговельно-економічного університету МОН України, завідувач кафедри товарознавства, експертизи та торговельного підприємництва.

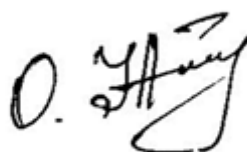
доктор медичних наук, професор **Корнійчук Олена Петрівна**, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології

Захист дисертації відбудеться “10” червня 2016 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К. 05.600.05 Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, 21018, вул. Пирогова 56, м. Вінниця.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова МОЗ України за адресою: 21018, вул. Пирогова 56, м. Вінниця.

Автореферат розісланий “6” травня 2016 р.

**Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат медичних наук**



О. А. Назарчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Профілактика і лікування гнійно-запальних інфекцій залишається надалі однією з складних і актуальних проблем сучасної медицини. У зв'язку з широким застосуванням інвазивних методів діагностики і лікування, надзвичайного поширення набули внутрішньолікарняні інфекції, які спричиняються особливими госпітальними штамми мікроорганізмів з підвищеною агресивністю, здатністю протистояти захисним силам організму і полірезистентністю до протимікробних засобів (О. А. Шевченко та ін., 2012; О. Г. Гейдріх, 2008; Hiroshi Yoneyama, 2006; Р. С. Козлов, 2000; А. А. Фокин, 2006).

На сьогоднішній день найбільш поширеними і потенційно небезпечними нозокоміальними патогенами є метіцилінорезистентні стафілококи (MRS), ванкоміцинорезистентні ентерококи (А. В. Дехнич, 2008; Р. В. Куцик, 2008; Monina Klevens et al. 2007; Ana Lúcia Souza Antunes et al, 2011; Е. В. Сабирова, 2010; А. Н. Косинец, 2008) і продукуючі EsβL грамнегативні умовно-патогенні бактерії, які належать до родини Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp.) та групи неферментуючих грамнегативних бактерій (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp.) (С. А. Зузов, 2009; В. И. Чернявский, 2010; И. А. Шагинян, 2005; Г. К. Решедько, 2008; О. А. Назарчук, 2012; Ю. Ю. Трофіменко, 2014).

Широке застосування антибактеріальних препаратів не лише не виправдало покладених на них надій, але й створило ряд нових проблем, які потребують невідкладного вирішення. Це, насамперед, надзвичайно високі темпи зростання і поширення резистентності збудників госпітальних інфекцій до протимікробних препаратів. Ще одним, не менш частим наслідком вживання антибіотиків є порушення мікрофлори кишечника – дисбіоз. Він супроводжується посиленням розмноженням нерезидентної мікрофлори, а це переважно умовно-патогенні грамнегативні мікроорганізми та гриби роду *Candida* (С. К. Борщ, 2005; И. В. Андреева, 2006).

Тому увагу дослідників привертають не лише антибіотики мікробного походження, але і протимікробні речовини, отримані з інших джерел, одними з яких є рослини (Н. Є. Стадницька, 2011; Б. Е. Айзенман, 1984; І. С. Чекман, 1999). Антимікробні речовини з рослин, хоча часто і поступаються антибіотикам мікробного походження за ступенем активності *in vitro*, але володіють рядом властивостей, які забезпечують їм переваги при лікуванні деяких захворювань, викликаних або ускладнених мікробною флорою. Зокрема, наявність у рослин комплексу діючих речовин з широким спектром фармакологічної активності і те, що вони знаходяться в певному співвідношенні, їх високою біодоступністю, сприяє оптимальному впливу на організм людини і ефективному лікуванню захворювань. Тобто, на відміну від традиційних антибактеріальних препаратів, більшість антибіотиків рослинного походження крім протимікробної дії, спричиняють виражений позитивний вплив на функціонування фізіологічних систем макроорганізму. Крім того, застосування антимікробних препаратів з рослин в хіміотерапії деяких інфекційних процесів, особливо місцевих, обмежує нераціональне використання класичних антибіотиків. Це попереджує розвиток ряду побічних ефектів, в тому числі сповільнює селекцію антибіотикорезистентних

штамів бактерій. Таким чином рослини є перспективним джерелом для отримання протимікробних засобів.

Україна і зокрема Прикарпаття та Карпати завдяки своїм природно-кліматичним умовам є одним з регіонів Європи, багатих на екологічно чисті лікарські рослини. Однак лише незначна частина з них застосовується в офіцианальній медицині. Решту видів використовують лише в практиці народної медицини, оскільки вони недостатньо у фармакологічному відношенні вивчені (М. І. Скибіцька, 2003).

Недостатньо висвітленими, на сьогоднішній день, залишаються аспекти дії біологічно активних речовин рослинного походження на умовно-патогенні мікроорганізми. Літературні дані свідчать про вивчення дії цих речовин стосовно досить широкого спектру видів умовно-патогенних грампозитивних і грамнегативних бактерій. В переважній більшості цих досліджень використовувалися колекційні штами мікроорганізмів, які протягом десятиліть культивуються в лабораторних умовах, без контакту з людським організмом, а тому характеризуються ослабленим патогенним потенціалом (Antara Sen, 2012; Kuete V., 2012; Н. В. Челін, 2012; Biruhalem Taye1, 2011; Kendour Zaouia, 2010; С. К. Ojha, 2011). Як теоретичне, так і практичне значення представляє вивчення впливу біологічно активних речовин рослинного походження на умовно-патогенні мікроорганізми, виділені з клінічного матеріалу, передусім їх госпітальні штами, яким властива підвищена вірулентність, а також полірезистентність до протимікробних засобів. Крім того для клінічної практики важливо провести порівняльний аналіз дії біологічно активних речовин рослинного походження на резистентні й чутливі до антибіотиків штами.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Матеріали дисертації є фрагментами комплексних науково-дослідних робіт кафедри мікробіології Івано-Франківського національного медичного університету "Антиінфекційна резистентність та стан здоров'я дітей м. Івано-Франківська в сучасних соціально-економічних та екологічних умовах" (№ державної реєстрації 0104U002556), «Вивчення біологічної активності природних і синтетичних гетероциклічних сполук, що містять піридиновий, імідазольний цикли та комплекси із біометалами» (№ державної реєстрації 0112U008505).

Мета – порівняльна оцінка протимікробних та імуномодулюючих властивостей екстрагованих комплексів біологічно активних сполук, отриманих з лікарських рослин Карпатського регіону відносно клінічних та лабораторних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів.

Завдання дослідження:

1. Встановити видовий спектр збудників бактеріальних гнійно-запальних процесів та рівень поширення серед них полірезистентних до протимікробних хімотерапевтичних засобів штамів, а також відібрати полірезистентні клінічні ізоляти умовно-патогенних грампозитивних та грамнегативних бактерій для подальших досліджень.

2. Дослідити протимікробну активність екстрактів лікарських рослин флори Прикарпаття відносно музейних та клінічних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів (стафілококи, ентеробактерії, псевдомонади) та встановити їх

ефективні протимікробні концентрації.

3. Дослідити протимікробні властивості комплексів біологічно активних сполук, одержаних з рослинної сировини за допомогою різних методів та режимів екстрагування.

4. Вивчити протизапальні та імуномодулюючі властивості екстрагованих комплексів лікарських рослин.

5. Дослідити здатність екстрактів гірчака зміїного підвищувати чутливість мікроорганізмів до антибіотиків.

6. Вивчити вплив екстракту гірчака зміїного на формування хіміотерапевтичного та постхіміотерапевтичного стафілококового дисбактеріозу кишечника тварин.

7. Виконати мікробіологічне обґрунтування використання нового засобу з протимікробною та антибіотикопотенціуючою активністю на основі екстрактів гірчака зміїного.

Об'єкт дослідження – колекційні та клінічні штами граммпозитивних та грамнегативних мікроорганізмів, виділені від пацієнтів із гнійно-септичними та рановими інфекціями.

Предмет дослідження – чутливість умовно-патогенних мікроорганізмів до екстрактів лікарських рослин та їх комбінацій з антибіотиками, імуномодулююча і протизапальна активність рослинних екстрактів.

Методи дослідження – мікробіологічні (мікроскопія, виділення чистих культур мікроорганізмів, визначення чутливості мікроорганізмів до рослинних екстрактів, антибіотиків, антисептиків, офіціанальних рослинних настоянок; визначення чутливості мікроорганізмів до комбінацій екстракту гірчака зміїного з антибіотиками, аналіз динаміки росту мікробних культур), імунологічні (вивчення ІФН- і ФНП-індукуючої активності екстрактів), біологічні (вивчення протизапальної, антидисбіотичної та ІФН-індукуючої активностей екстрактів *in vivo*), математико-статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вивчено етіологічну структуру збудників гнійно-запальних інфекцій, виділених у стаціонарах Івано-Франківська і області та показники їх резистентності до протимікробних ХТП.

Проведено розширений скринінг серед екстрактів лікарських рослин Карпатського регіону на предмет наявності протимікробної активності у відношенні резистентних до протимікробних ХТП клінічних штамів мікроорганізмів різної таксономічної належності. На основі аналізу його результатів встановлено лікарські рослини, екстракти з яких проявляють виражену протимікробну активність відносно УПМ збудників інфекцій (екстракти на 90 % водному етанолі з: кореневищ гірчака зміїного, коренів кермеку Мейера, кермеку південнобузького, родовика лікарського, листя мучниці звичайної, слані евернії сливової, бруньок берези бородавчастої, тополі чорної, надземної частини брусниці, парагеуму гірського, гірчака перцевого, сумаха дубильного, омели білої, хвої і плодів ялівцю звичайного, надземної частини і коренів чистотілу більшого). Визначено спектр їх активності щодо референтних та клінічних штамів УПМ – збудників гнійно-септичних захворювань та дисбактеріозу кишечника.

Встановлено протизапальну (екстракти кореневищ гірчака зміїного, суцвіть гринделії розчепіреної, слані цетрарії ісландської), та ІФН- і ФНП-індукуючу (в

найбільшій мірі екстракти омели білої та живокосту лікарського) екстрактів лікарських рослин.

Виконано мікробіологічне обґрунтування перспективності і доцільності застосування екстракту гірчака зміїного для створення на його основі нових протимікробних засобів. Розроблено спосіб одержання екстракту кореневищ гірчака зміїного, що володіє протимікробною активністю відносно полірезистентних до ХТП штамів умовно-патогенних мікроорганізмів, захищений патентом України на корисну модель (UA № 83509).

Підтверджено здатність екстракту кореневищ гірчака зміїного на 90 % водному етанолі нейтралізувати детермінанти резистентності до протимікробних ХТП стафілококів та підвищувати їх чутливість до оксациліну, ципрофлоксацину і тетрацикліну.

Практичне значення одержаних результатів. Встановлено показники резистентності до протимікробних ХТП сучасних клінічних ізолятів умовно-патогенних мікроорганізмів – збудників гнійно-запальних інфекцій, що доцільно використовувати при виборі антимікробних препаратів з лікувальною метою.

Розроблено методику первинного скринінгового тестування протимікробної активності екстрактів лікарських рослин та синтетичних речовин (раціоналізаторська пропозиція № 30/2614), яка відрізняється достатньою чутливістю та може використовуватись в ході наукових досліджень.

Встановлено, що екстракція рослинної сировини з використанням 90 % водно-етанольної суміші або ацетону дозволяє одержати комплекси БАР з високою протимікробною активністю. Ці дані можуть бути використані для розробки технології створення нових лікувальних засобів.

Результати виконаних мікробіологічних та імунологічних досліджень розширюють відомості про протимікробні, антибіотикопотенціюючі, протизапальні, інтерфероніндукуючі властивості ряду лікарських рослин, що дозволяє розширити покази до їх практичного застосування у клініці як ефективних імуномодулюючих і протимікробних засобів, здатних протидіяти резистентності мікроорганізмів до протимікробних ХТП.

Виконано мікробіологічне обґрунтування доцільності створення, використання нових протимікробних засобів із кореня гірчака зміїного.

Особистий внесок здобувача. Проведено патентно-інформаційний пошук, аналіз літературних джерел, виготовлення рослинних екстрактів, експериментальні дослідження, статистична обробка, систематизація отриманих результатів та підготовка до друку наукових праць.

Разом з науковим керівником сформульовані мета та завдання дослідження, розроблені методичні підходи до вибору адекватних моделей при виконанні експериментальної частини роботи, виконано підбір лікарських рослин для дослідження, проведено аналіз отриманих результатів та сформульовано висновки і практичні рекомендації.

Використані у роботі рослинні екстракти одержані при консультативній допомозі доцента кафедри фармакогнозії і ботаніки фармацевтичного факультету Івано-Франківського національного медичного університету **Б. М. Зузука**. Дослідження імуномодулюючої активності рослинних екстрактів виконано на базі

відділу інтерферону та імуномодуляторів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України (зав. – чл.-кор. АМН України, проф. М. Я. Співак) за консультативної допомоги к. мед. н. Н. М. Жолобак.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати дослідження були представлені та обговорювалися на V міжнародному медичному конгресі студентів і молодих учених (Тернопіль, 2001), науковій конференції «Розвиток санітарної мікробіології в Україні» (Чернівці, 2002), міжнародних науково-практичних конференціях «Новые технологии получения и применения биологически активных веществ» (Алушта, 2002), "Пробіотики-XXI століття. Біологія. Медицина. Практика". (Тернопіль, 2004), IX Конгресі Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (Луганськ, 2002), VII і VIII ювілейному з'їздах Всеукраїнського лікарського товариства (Тернопіль, 2003; Івано-Франківськ, 2005), X з'їзді Товариства мікробіологів України (Одеса, 2004), науково-практичних конференціях з міжнародною участю «Сепсис. Проблеми діагностики, терапії та профілактики» (Харків, 2006), «Сучасні підходи до діагностики та лікування у клінічній інфектології» (Харків, 2007), «Антибактеріальна та антивірусна терапія на догоспітальному та госпітальному етапах» (Харків, 2008).

Публікації. За матеріалами роботи опубліковано 22 наукові роботи, з них – 11 статей у наукових фахових виданнях визначених ДАК України, в тому числі одна стаття в зарубіжному журналі, та 11 тез у збірниках з'їздів, конгресів та науково-практичних конференцій; один патент України на корисну модель; одна раціоналізаторська пропозиція.

Структура дисертації. Робота викладена українською мовою на 175 сторінках машинописного тексту. Дисертація ілюстрована 27 таблицями і 18 рисунками, складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку літературних джерел, який містить 224 джерела (101 кирилицею і 123 латиною).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми дисертаційного дослідження, викладено мету та завдання, які розв'язували при його виконанні. Визначено зв'язок роботи з державними науковими програмами, розкрито наукову новизну і практичне значення здобутих результатів, наведено дані щодо апробації дослідження, вказано обсяг і структуру дисертації.

В огляді літератури, який містить 3 підрозділи, висвітлено проблему глобального поширення полірезистентних штамів стафілококів та грамнегативних бактерій з родини Enterobacteriaceae і групи неферментуючих грамнегативних бактерій (НФГБ). Охарактеризовано їх роль у виникненні опортуністичних інфекцій в сучасних умовах, а також розглянуто основні механізми резистентності до протимікробних хіміотерапевтичних препаратів, антисептиків, дезінфектантів. Висвітлено перспективи пошуку нових протимікробних засобів серед біологічно-активних речовин рослинного походження. Розглянуто основні БАР рослин, які володіють протимікробною активністю, а також методи її вивчення.

Матеріали і методи. Для вивчення видової структури збудників гнійно-

септичних інфекцій та визначення регіональних показників їх резистентності до антибіотиків за допомогою спеціалізованої програми WHONET 5 (С. А. Свистунов та співавт., 2012, І. А. Андреева та співавт., 2014) створено комп'ютерну базу даних. До неї включено інформацію про клінічні ізоляти мікроорганізмів, які були виділені в лабораторіях лікувальних закладів міста Івано-Франківська та області.

В якості об'єкту дослідження служили штами мікроорганізмів, виділених з клінічного матеріалу в бактеріологічних лабораторіях кафедри мікробіології Івано-Франківського національного медичного університету, Обласної клінічної лікарні, Обласного перинатального центру та Центральної міської бактеріологічної лабораторії від пацієнтів з гнійно-запальними інфекціями і дисбактеріозом кишечника. Вони були поділені на 2 тестувальні панелі. Перша панель включала колекційний штам *S. aureus* 209-P (ATCC 6538-P) і 34 клінічних штами стафілококів (*S. aureus* – 16 штамів, CNS – 18 штамів), друга - колекційний штам *P. aeruginosa* „Тераков” (ДИСК ім. Л. О. Тарасевича, м. Москва) і 35 клінічних штамів грамнегативних бактерій, які належать до родин *Enterobacteriaceae* (25 штамів) і *Pseudomonadaceae* (10 штамів). Культури ідентифікували з використанням ідентифікаційних систем «STAPHYtest 16» «Enterotest 1», «Enterotest 2» та «Neferment test» («Lachema», Чехія). Чутливість до антибіотиків визначали за допомогою паперових дисків згідно з вимогами наказу МОЗ України № 167 від 05.04.2007 р. “Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів”.

Вивчення протимікробних властивостей БАР рослинного походження проводили з використанням 103 водно-етанольних (40; 70; 90 %) та 13 ацетонових екстрактів з різних частин (надземної частини, суцвіть, листків, коренів і кореневищ) 70 дикоростучих і культивованих лікарських рослин флори України, які належать до 36 родин. Рослинну сировину заготовляли на територіях Івано-Франківської, Львівської та Одеської областей. В якості препаратів порівняння використані відомі антисептики хлоргексидину біглюконат та мірамістин, антибіотики гентаміцин, цефтріаксон, ципрофлоксацин; 11 офіційних настоянок лікарських рослин та фітопрепаратів. Екстракти виготовляли відповідно до вимог Державної Фармакопеї України.

Для отримання водно-етанольних екстрактів висушену подрібнену рослинну сировину екстрагували 40; 70; 90 % етанолом відповідно до вимог Державної Фармакопеї України при кімнатній температурі протягом 2 тижнів (співвідношення сировина/екстрагент 1:10). Для остаточного одержання екстрактів відфільтровували нерозчинний залишок і чистим розчинником доводили об'єм до початкового рівня. Готові екстракти зберігали у герметично закритих посудинах з темного скла.

Ацетонові екстракти отримували методом вичерпної екстракції подрібненої сухої сировини чистим ацетоном в апараті Соксклета впродовж 2 годин, концентрували шляхом випарювання розчинника на водяному нагрівнику до 1/10 об'єму і висушували при кімнатній температурі під витяжкою. Перед проведенням досліджень сухі ацетонові екстракти розчиняли у суміші етанол-DMSO-вода (1 : 1 : 2). Протимікробну активність екстрактів досліджували відповідно до вимог Державного науково-експертного центру лікарських засобів МОЗ України (1993).

Для скринінгового дослідження протимікробної активності екстрактів

використано модифікований метод дифузії в агар (раціоналізаторська пропозиція № 30/2614). Найбільш активні екстракти досліджено методом серійних розведень в агарі з використанням сформованих тест-панелей мікроорганізмів для визначення ефективних діючих концентрацій. За допомогою спеціального штампа-реплікатора виконували посів одночасно 25 культур на чашку. З метою оцінки і порівняльного аналізу протимікробної активності екстрактів з допомогою програми WHONET 5 були визначені також їх ефективні діючі концентрації для груп штамів, поділених за ознаками видової належності та резистентності до протимікробних ХТП: МБцК₉₀ і МБцК₅₀ та МБсК₉₀ і МБсК₅₀, а також середні арифметичні та середні геометричні значення діючих концентрацій.

Протизапальну активність екстрактів оцінювали за їх здатністю гальмувати розвиток проліферативної фази запалення на моделі ватяної гранульоми (Р.Ф. D'Arcy etc., 1960). Для виявлення інтерферогенних і ФНП-індукуючих властивостей *in vitro* протестовано 90 % водно-етанольні екстракти лікарських рослин у двох розведеннях - 1:10 і 1:20. Титрування ІФН здійснювали на культурі клітин ПТП проти вірусу венесуельського енцефаліту коней (ВВЕК, штам 230). Для індукції ФНП препарати у відповідних розведеннях вносили у суспензію перитонеальних макрофагів мишей. Активність ФНП у культуральному середовищі оцінювали за цитопатичною дією на первинній культурі фібробластів мишей L-929. (Ф.И. Ершов і співавт., 1988; А. Meager etc., 1989). В досліджах *in vivo* на мишах вивчали вплив рослинних екстрактів на інтерфероновий статус організму (рівень сироваткового ІФН, здатність спленоцитів в умовах *in vitro* синтезувати ІФН- α у відповідь на введення вірусу хвороби Ньюкастл та ІФН- γ у відповідь на введення ФГА). Для індукції синтезу ФНП- α в суспензії перитонеальних макрофагів використовували ліпополісахарид *E. coli*.

Вивчення впливу різних концентрацій екстракту гірчака зміїного на динаміку росту мікробних культур здійснено в процесі їх культивування на рідких поживних середовищах (Є. Доис, 1983). Вивчено динаміку росту мікробних культур в присутності поєданого впливу антибіотиків і екстракту кореневищ зміїовика. Про синергізм судили за коефіцієнтом відносного пригнічення росту. В результаті аналізу даних експерименту для кожного екстракту одержано 2 дозозалежні параметри: GI50 [growth inhibition of 50 %] – концентрацію екстракту, яка забезпечує 50 % пригнічення росту тест-культури відносно її росту в контролі впродовж визначеного часу інкубації і TGI [total growth inhibition] – концентрацію екстракту, яка забезпечує повне пригнічення росту (R. Lesyk, 2006).

Вивчення впливу екстракту гірчака зміїного на формування дисбактеріозу кишечника проводили на 20-ти безпородних кролях. Впродовж 10-ти днів всі тварини отримували перорально канаміцин в дозі 10 мг/кг маси для формування хіміотерапевтичного дисбіозу. З 11-го дня експерименту тварини поділені на 4 групи. Тварини 1-шої групи отримували ацетоновий екстракт гірчака зміїного в дозі 250 мг/кг, 2-ї групи – 2 мл суспензії метицилінорезистентного клінічного штаму *S. aureus* „Кунда” перорально і екстракт гірчака зміїного в дозі 250 мг/кг, 3-ї групи – суспензію стафілокока. Четверту групу тварин використовували для порівняння. На 1-й, 10-й, 20-й дні експерименту виконували забір фекалій тварин і мікробіологічне дослідження. Для характеристики ступеню дисбактеріозу використано метод

обчислення коефіцієнта дисбактеріозу (Б. М. Дикий, 2007).

Для статистичної обробки результатів застосовано методи варіаційної статистики, одно- і двовибірковий F-тест для дисперсії, кореляційний, лінійний регресійний, одно- і двофакторний дисперсійний (ANOVA) аналіз за допомогою програм STATISTICA for Windows 6.0, MS Office Excel 2003-2013. *Результати власних досліджень* викладені у наступних чотирьох розділах дисертації.

Аналіз регіональних показників структури та антибіотикорезистентності сучасних клінічних штамів мікроорганізмів. В результаті дослідження клінічних ізолятів грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів, виділених в лабораторіях лікувальних закладів м. Івано-Франківська та області встановлено, що стафілококи є одними з найважливіших збудників гнійно-запальних інфекцій і займають їх структурі частку 42,9 %. Штами *S. aureus* склали 18,6 %, а CNS – 23,4 % від загальної кількості штамів. Грамнегативні умовнопатогенні бактерії виявляли в 37,7 % випадків. Чільне місце посідали *E. coli* – 22,2 %, *Pseudomonas spp.* – 6,9 % та *Proteus spp.* – 4,8 %. Інші умовнопатогенні представники родини *Enterobacteriaceae* виділяли лише у 3,8 % випадків. Вищезазначені мікроорганізми переважно (79,7 %) виділяли від пацієнтів, які перебували на стаціонарному лікуванні. Серед них були пацієнти хірургічних (55,95 %), терапевтичних (33,34 %), неонатальних (2,03 %) реанімаційних (8,68 %) відділень.

Результати визначення чутливості виділених збудників до антибіотиків вказують на високу резистентність грамнегативних мікроорганізмів до тестованих препаратів. Зокрема, досліджувані штами ентеробактерій були резистентними до 62,9%, а неферментуючі грамнегативні бактерії – до 74,3 % антибіотиків. Порівняно нижчі показники резистентності у мікробів обох груп відмічали до імipенему, цефтазидиму, амікацину, ципрофлоксацину, які застосовують в клінічній практиці. Отримані результати свідчать про значне поширення метицилінорезистентних штамів стафілококів. При цьому такі штами зустрічались частіше серед CNS (54,9 %) в порівнянні з *S. aureus* (40,3 %).

Проведений аналіз резистентності свідчить про переважаюче поширення полірезистентних штамів серед грамнегативних бактерій з родин *Enterobacteriaceae* та *Pseudomonadaceae* (табл. 1).

Таблиця 1

Поширення поліантибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів за даними аналізу профілів резистентності

Мікроорганізм	Перитонеальний ексудат	Гній	Раневий вміст	Сеча	Кров	Харкотиння
<i>Staphylococcus spp.</i>	10*/44**	181/1313	167/431	206/600	87/684	121/293
	22,73 %***	13,79 %	38,75 %	34,33 %	12,72 %	41,30 %
<i>Pseudomonas spp.</i>	9/13	142/188	194/222	211/247	5/9	9/12
	69,23 %	75,53 %	87,39 %	85,43 %	55,56	75,00 %
Ентеробактерії	36/77	452/792	292/406	1052/1443	35/64	102/186
	46,75 %	57,07 %	71,92 %	72,90 %	54,69 %	54,84 %

Примітка: * - число полірезистентних штамів, ** - загальне число штамів, *** - відсоток полірезистентних штамів.

Кількість полірезистентних штамів відрізнялась в залежності від типу клінічного матеріалу. Зокрема, полірезистентні госпітальні штами стафілококів найчастіше виділяли з харкотиння (41,3 %), ранового ексудату (38,75 %); ентерококів – з сечі (85,19 %); ентеробактерій і псевдомонад – з сечі (72,9 % і 85,43 % відповідно) та ранового ексудату (71,92 % і 87,39 %). Результати проведеного дослідження свідчать про значне поширення поліантибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів в стаціонарах міста та області і вказують на необхідність запровадження системи епідмоніторингу та розробки сучасних підходів для подолання даного явища.

Дослідження протимікробної активності рослин відносно полірезистентних клінічних штамів мікроорганізмів. Дослідження протимікробних властивостей рослинних екстрактів на 40 % і 70 % водному етанолі показало доволі низький рівень їх активності як у відношенні стафілококів так і грамнегативних бактерій. Зокрема, найбільш активним серед досліджуваних 40 % екстрактів слід відзначити екстракт з коренів та кореневищ сіверсії гірської, який пригнічував ріст усіх штамів стафілококів за виключенням *S. aureus 209-P* та 6 штамів грамнегативних бактерій. Діаметри зон затримки росту становили від 5 – 9,9 мм). Єдиним серед екстрактів на 70 % водному етанолі, який проявив активність у відношенні більшості штамів стафілококів і грамнегативних бактерій, виявився екстракт з кореневищ гірчака зміїного. Діаметри зон затримки росту стафілококів були в межах 5,3-6,7 мм, а грамнегативних бактерій – 5,0-5,6 мм.

Заслуговують на увагу досліджувані водно-спиртові екстракти, які були високоактивними у відношенні і стафілококів, і грамнегативних бактерій: з листя мучниці звичайної з діаметрами зон затримки росту 5,4 – 13,4 мм для стафілококів та грамнегативних бактерій (5,4 – 8,2 мм), слані евернії сливової (5,0 – 8,7 мм та 5,5 – 6,5 мм відповідно), кореневищ гірчака зміїного (5,8 – 6,9 мм та 5,3 – 5,9 мм відповідно), бруньок тополі чорної (6,99 – 8,25 мм та 5,00 – 7,63 мм відповідно), кори дуба звичайного (5,2 – 10,2 мм та 5,3 – 6,4 мм відповідно). Також варті уваги, зокрема екстракти: з листя чаю китайського, бруньок берези бородавчастої, коренів родовика лікарського, сіверсії гірської та кермеку південнобузького, які були високоактивними щодо стафілококів, проявили середній рівень активності у відношенні грамнегативних мікроорганізмів. Зони затримки росту даних екстрактів для стафілококів становили в межах: 6,4–14,8 мм, 8,6–14,1 мм, 6,3–10,1 мм, 5,4–13,2 мм та 5,2–8,7 мм відповідно. Екстракти з слані цетрарії ісландської (ісландського моху), листя гінкго дволопатевого, суміші хвої і плодів біоти східної, квітів гринделії розчепіреної, надземної частини рододендрону східнокарпатського, хвої і плодів ялівцю звичайного проявили протистафілококову активність.

Оптимальним способом, який дозволяє одержати препарати БАР лікарських рослин з максимально вираженими антибіотичними властивостями можна вважати їх екстрагування 90 % водним етанолом. За результатами визначення МБсК, МБцК досліджуваних рослинних екстрактів, чутливими до них залишаються штами стафілококів (табл. 2).

Середні арифметичні значення МБсК окремих екстрактів лікарських рослин на 90 % водному етанолі щодо клінічних штамів мікроорганізмів (мкг/мл)

Екстракти рослин	Ентеробактерії		Псевдомонади		<i>S. aureus</i> 209-P	Клінічні штами	
	(n=10)**	(n=15)*	(n=7)**	(n=4)*		<i>S. aureus</i>	CNS
Цетрарія ісландська (слань)	454,5± 30,5	339,3± 33,2	468,8± 31,3	333,3± 83,3	31,25	205,1± 17,1	203,1± 15,9
Брусниця (н/ч)	1272,7± 137,8	1093,8± 119,2	710,9± 80,1	583,3± 145,8	437,25	792,4± 60,8	1154,6± 90,8
Гірчак зміїний (к/щ)	964,8± 61,8	938,4± 55,8	711,0± 66,5	977,1± 135,4	78,13	345,0± 28,7	583,1± 45,8
Евернія сливова (слань)	755,7± 61,6	593,8± 58,1	875,0± 0,1	729,2± 145,8	875	560,4± 46,7	710,7± 55,9
Мучниця звичайна (лис.)	1372,2± 65,3	1026,8± 98,7	1168,0± 131,5	718,8± 0,1	90	267,2± 22,3	359,7± 28,3
Яловець звичайний (пл.)	1380,7± 175,7	1084,8± 181,4	1125,0± 0,1	1125,0± 0,1	281,25	372,1± 31,1	456,9± 35,9
Кермек Мейера (кор.)	1045,5± 157,5	964,3± 97,6	1125,0± 205,9	666,7± 166,7	39,1	148,7± 12,4	253,8± 19,9
Кермек південно-бузький (кор.)	568,2± 82,3	513,4± 41,5	468,8± 59,1	312,5± 0,1	31,2	262,7± 21,9	153,9± 12,1

Примітка. *- антибіотикочутливий штам; ** - антибіотикорезистентний штам.

Грамнегативні мікроорганізми характеризуються нижчою чутливістю, ніж грампозитивні, до комплексів БАР, екстрагованих з рослинної сировини 90 % етанолом. Тому, додатково було вивчено їх чутливість до ацетонових екстрактів. Найвищу активність відносно грамнегативних бактерій проявили ацетонові екстракти з кореневищ гірчака зміїного, кемеку Мейера, кермеку південнобузького, листя гінґо дволопатевого, чаю китайського, надземної частини мучниці звичайної, кори дуба. Ефективні діючі концентрації ацетонових екстрактів у відношенні антибіотикорезистентних штамів псевдомонад були в межах – 256-512 мкг/мл, а ентеробактерій – 512-1024 мкг/мл.

Окремо було проаналізовано чутливість до рослинних екстрактів на 90 % водному етанолі та ацетоні 6 штамів умовнопатогенних грамнегативних бактерій, виділених з випорожнень хворих дисбіозом кишечника. Найвищу активність, як серед водно-етанольних екстрактів, так і ацетонових, проявив екстракт кореневищ гірчака зміїного, причому МБсК ацетонового екстракту є в 2 рази меншою ніж водно-етанольного. Для екстракту гірчака зміїного чітко спостерігали активність у відношенні штамів ентеробактерій, що дозволило вивчити його використання для корекції дисбіотичних порушень.

Оцінюючи протимікробну активність препаратів відносно клінічних штамів умовнопатогенних мікроорганізмів, умовно розташували, а саме: стосовно грампозитивних бактерій: хлоргексидину біглюконат (3,4-3,9 мкг/мл) > мірамістин

(13,2-29,2 мкг/мл) >> хлорофіліпт (89,0-112,0 мкг/мл) > настоянка м'яти перцевої (156,2-174,6 мкг/мл); стосовно грамнегативних мікроорганізмів: хлоргексидину біглюконат (19,0-39,4 мкг/мл) > мірамістин (17,1-47,3 мкг/мл) >> настоянка м'яти перцевої (464,4-992,1 мкг/мл) > хлорофіліпт (701,5-992,1 мкг/мл). Виходячи з умовного розташування за активністю препаратів, можна стверджувати, що клінічні штами стафілококу та грамнегативних умовнопатогенних бактерій зберігали чутливість до окремих антимікробних засобів.

Вивчення імуномодулюючої, протизапальної активності рослинних екстрактів. На моделі ватяної гранульоми встановлено, що найвищою здатністю гальмувати проліферативну фазу запалення володіє екстракт з кореневищ гірчака зміїного, який зменшував масу гранульоми на 40,0 %, ніж в групі порівняння. Йому поступались по ефективності екстракти з суцвіть гринделії розчепіреної (33,8 %), слані цетрарії ісландської (26,1 %).

За результатами вивчення ІФН- та ФНП-індукуючої дії екстрактів лікарських рослин на 90 % водному етанолі, активними виявилися екстракти з надземної частини омели білої та з коренів живокосту лікарського. Які зумовлювали продукцію достатньої кількості ІФН- γ і ФНП- α *in vitro* та *in vivo*. Встановлено, що комплекси лікарських засобів з рослинної сировини володіють протимікробною активністю та імуномодулюючими, протизапальними властивостями.

Вивчення біологічної активності екстрактів гірчака зміїного. Екстракти гірчака зміїного здавна використовували в народній медицині як в'язучий засіб при лікуванні ран, кровотеч, при захворюванні сечового міхура, при проносах, дизентерії, жовчнокам'яній і сечокам'яній хворобах. У зв'язку з цим проведено поглиблене вивчення екстрактів гірчака зміїного, отриманих із різних частин рослини, а також із застосуванням різних екстрагентів. Аналізуючи результати вивчення гірчака зміїного на клінічних штаммах мікроорганізмів встановлено, що МБсК для екстракту з кореневищ гірчака на 70 % водному етанолі складали 2502,8-2551,5 мкг/мл для грамнегативних бактерій та 566,3-1040,2 мкг/мл – для стафілококів. Для екстрактів на 90 % водному етанолі ці показники були в межах 638,4- 711,0 мкг/мл для грамнегативних бактерій та 345,0-583,1 мкг/мл – для стафілококів. Ацетонові екстракти діяли на грамнегативні бактерії – в межах 371,5-659,7 мкг/мл.

Динаміка росту мікроорганізмів в присутності екстрактів коренів гірчака зміїного наведена на рисунку 1.

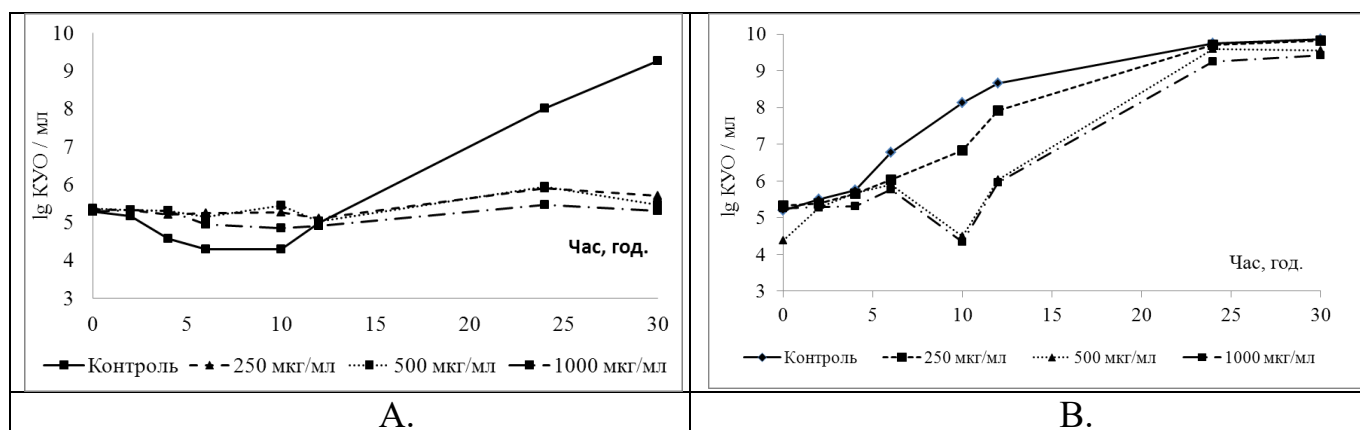


Рис. 1. Динаміка росту *P. aeruginosa* «Вольман» (А), *E. coli* 14-03 (В) в присутності різних концентрацій екстракту кореневищ гірчака зміїного.

Як видно з даних рисунку 1 протимікробна дія досліджуваного екстракту доведена в межах 250-1000 мкг/мл. Чутливим виявився *P. aeruginosa* "Вольман" порівняно з *E. coli* "14-03".

Динаміку росту стафілокока в присутності різних розведень гірчака зміїного ілюструє рисунку 2.

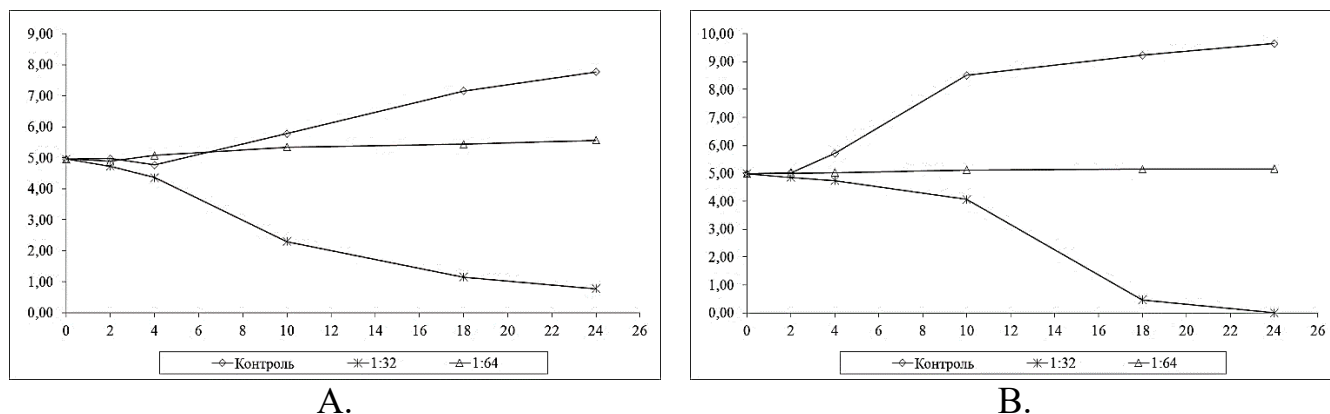


Рис. 2. Динаміка росту штамів стафілокока в присутності різних розведень гірчака зміїного.

Аналіз кривих росту обох штамів стафілококів вказує на помітне пригнічення бактерій екстрактом кореневищ *P. bistorta* L. в часовому інтервалі до 5-ї годин інкубації. Встановлено протистафілококову дія гірчака зміїного в розведеннях екстракту 1:32 (437,5 мкг/мл).

Вивчення поєднаного використання декількох антимікробних засобів показало наступне. Екстракт кореневищ гірчака зміїного в дозі 200 мкг проявляв здатність нейтралізувати метіцилінрезистентність *S. aureus*. В іншій серії експериментів вивчено динаміку росту метіцилінрезистентного стафілококу в присутності суббактеріостатичних концентрацій антибіотиків і екстракту кореневища гірчака зміїного (рис. 3).

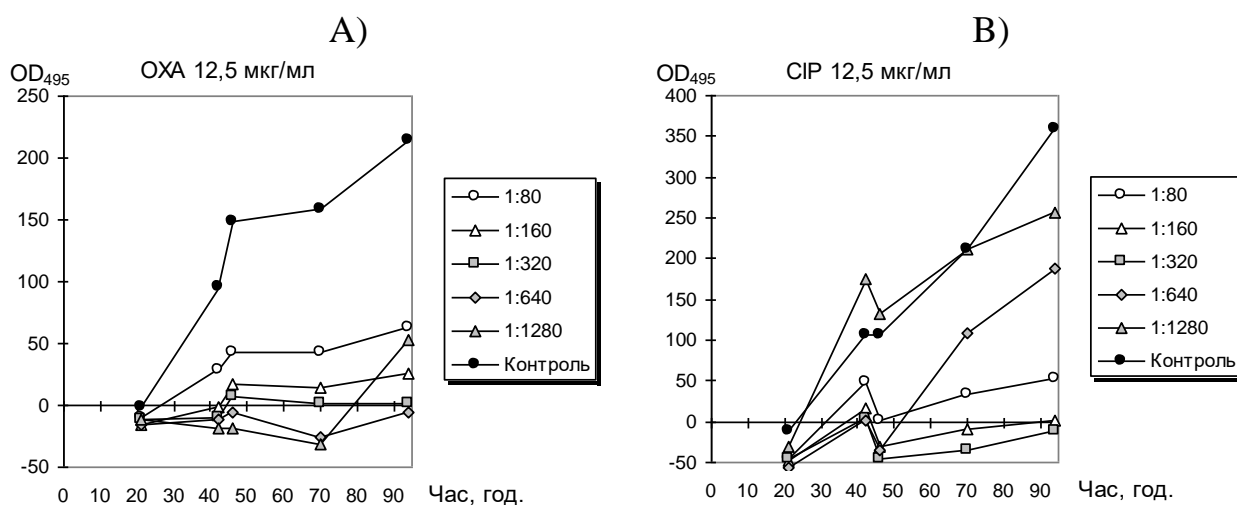
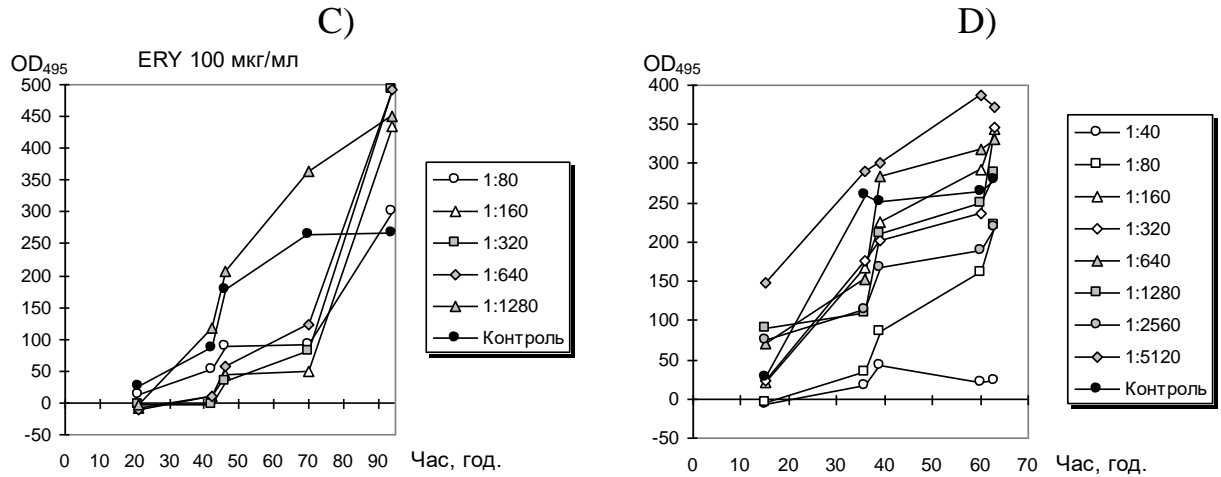


Рис. 3. Криві росту стафілокока на середовищах в присутності комбінацій суббактеріостатичних концентрацій 90 % етанольного екстракту кореневищ гірчака зміїного та $1/16$ МБсК оксациліну (А), $1/4$ МБсК ципрофлоксацину (В) і $1/16$ МБсК еритроміцину (С). Контроль (D).



Продовження рис. 3.

Аналіз кривих росту стафілокока вказують на статистично достовірні зміни параметрів росту лише при поєднанні екстракту кореневища гірчака зміїного з оксациліном та ципрофлоксацином.

Для кращої оцінки протимікробного ефекту в різні часові інтервали визначали коефіцієнти відносного пригнічення росту бактерій (рис. 4).

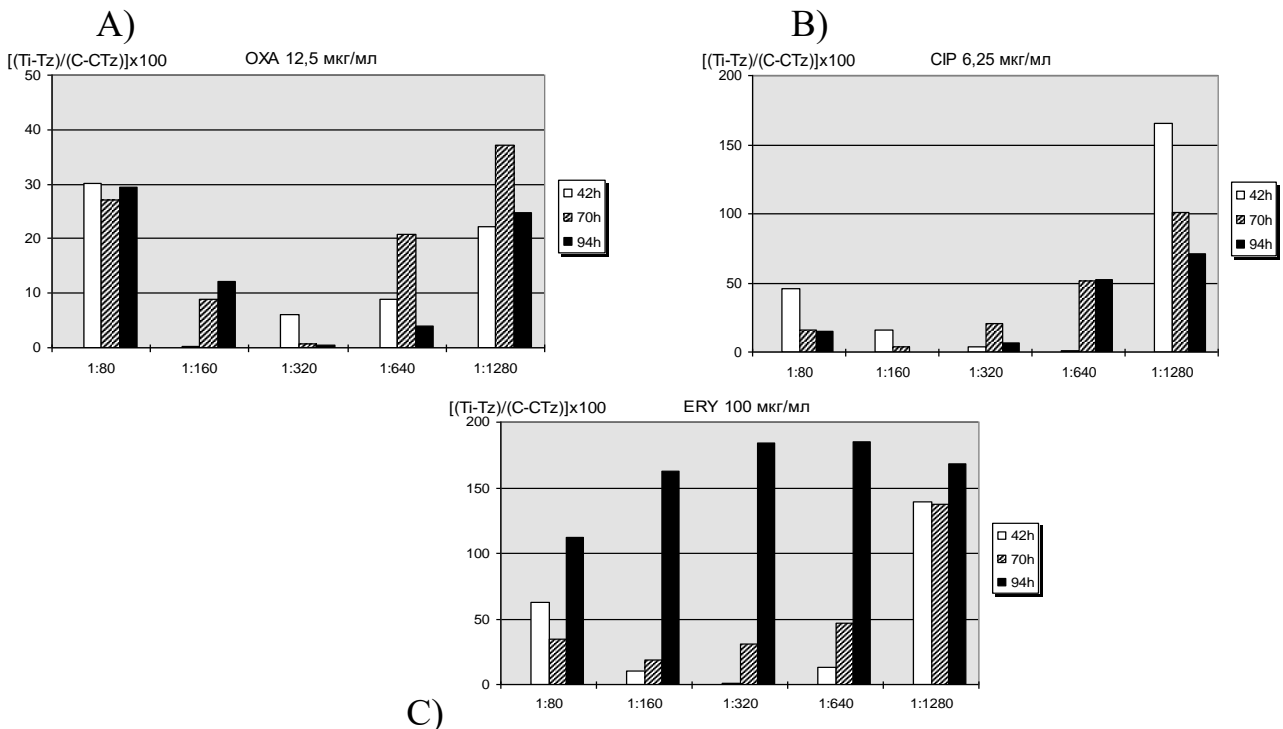


Рис. 4. Коефіцієнт відносного пригнічення росту стафілокока в різні часові інтервали під дією екстракту гірчака зміїного, оксациліну (А), ципрофлоксацину (В) і еритроміцину (С).

Встановлено потенціювання антимікробної активності оксациліну у всіх розведеннях та у всі часові періоди. Можна відмітити відсутність потенціювання антимікробної активності ципрофлоксацину лише у розведенні 1:1280. Потенціюючої дії еритроміцину екстрактом гірчака в розведеннях 1:1280 у всі

часові періоди не встановлено.

Враховуючи високу активність екстракту коренів гірчака зміїного відносно мікробних штамів було вивчено його вплив на формування і розвиток стафілококового дисбактеріозу у піддослідних тварин. Встановлено практично повне відновлення стану еубіозу в групах тварин, які отримували екстракт гірчака зміїного (250 мкг/мл), а також відсутність змін в 3-й і 4-й групах, які не отримували екстракт гірчака зміїного. Підсумовуючи результати експериментальних досліджень БАР кореневища гірчака зміїного потрібно підкреслити, що рослинний лікарський засіб володіє протимікробною, антибіотикопотенціуючою, імуномодулюючою, протизапальною дією.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення й нове вирішення актуального наукового завдання. На основі даних досліджень обґрунтовано можливість застосування лікарських рослин Карпатського регіону і, зокрема, гірчака зміїного в якості сировини для створення нових ефективних офіційних протимікробних препаратів.

1. В етіологічній структурі збудників гнійно-запальних інфекцій в лікувальних установах Прикарпаття переважають стафілококи (42,0 %), частка грамнегативних бактерій становить 37,7 %. Штами *S. aureus* складають у загальній структурі 18,6 %, коагулазонегативних стафілококів (CNS) – 23,4 %, *E. coli* – 22,2 %, бактерії роду *Pseudomonas spp.* – 6,9 %, протеї – 4,8 %. Псевдомонади володіють вираженою резистентністю до протимікробних хіміотерапевтичних засобів порівняно з ентеробактеріями та стафілококами. Основними препаратами, до яких зберігають чутливість більшість ізолятів з усіх груп, є імпіпенем, амікацин та ципрофлоксацин. Полірезистентні госпітальні штами ентеробактерій і псевдомонад найчастіше виділяють з сечі (відповідно 58,3 % та 71,2 % резистентних штамів) та негнійного раневого ексудату (51,85 % і 73,33 % резистентних штамів). Полірезистентність найчастіше спостерігають у бактерій родів *Pseudomonas spp.* і *Acinetobacter spp.* Полірезистентні госпітальні штами стафілококів найчастіше виділяють з харкотиння (41,3 %) та раневого ексудату (38,75 %).

2. За результатами скринінгу високу активність відносно полірезистентних умовно-патогенних мікроорганізмів проявляють екстракти на 90 % водному етанолі з: листків мучниці звичайної *Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng.*, кореневищ гірчака зміїного *Polygonum bistorta L.*, кермеку Мейєра *Limonium meyeri (Boiss.) O. Kuntze* та кермеку південнобузького *Limonium hypanicum Klok.*, слані евернії сливової *Evernia prunastri (L.) Ach.* та цетрарії ісландської *Cetraria islandica (L.) Ach.*, бруньок берези бородавчастої *Betula verrucosa Ehrh.* та тополі чорної *Populus nigra L.*, надземної частини брусниці *Vaccinium vitis-idaea L.*, сіверсії гірської *Sieversia montana (L.) R. Br.*, листків сумаха дубильного *Rhus coriaria*, плодів ялівцю звичайного *Juniperus communis L.*, коренів родовика лікарського *Sanguisorba officinalis L.* Діючі концентрації екстрактів на 90 % водному етанолі відносно антибіотикорезистентних штамів стафілококів перебувають в межах 73,20-1000 мкг/мл, ентеробактерій – 189,5-1305,8 мкг/мл, псевдомонад – 152,4-1500 мкг/мл. Діючі концентрації ацетонових екстрактів у відношенні антибіотикорезистентних штамів стафілококів

та псевдомонад перебувають в межах – 256-512 мкг/мл, а ентеробактерій – 512-1024 мкг/мл.

3. Оптимальними режимами для одержання сумарних препаратів біологічно активних речовин лікарських рослин з вираженими антимікробними властивостями є їх екстрагування 90 % етанолом методом мацерації або ацетоном методом циркулярної екстракції в апараті Соксклета.

4. Біологічно активні речовини дикоростучих лікарських рослин флори України є ефективними індукторами ІФН-γ і ФНП-α (особливо екстракти омели білої та живокосту лікарського) та володіють протизапальною активністю (екстракти гірчака зміїного, гринделії розчепіреної, цетрарії ісландської, гінкго дволопатевого).

5. Водно-етанольний екстракт кореневищ гірчака зміїного володіє здатністю підвищувати чутливість метицилінрезистентних стафілококів до оксациліну та ципрофлоксацину.

6. Екстракт з коренів гірчака зміїного сприяє нормалізації кількісного та якісного складу мікрофлори кишечника тварин після хіміотерапевтичного дисбактеріозу, а також протидіє колонізації кишечника метицилінрезистентним *S. aureus*.

7. Результати виконаних експериментальних досліджень обґрунтовують можливість використання біологічно-активних речовин гірчака зміїного для створення нових препаратів з широким спектром властивостей: протимікробною, протизапальною, антидисбіотичною, антибіотикопотенціуючою.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Методику первинного скринінгового тестування протимікробної активності екстрактів лікарських рослин (раціоналізаторська пропозиція № 30/2614) рекомендовано для використання у наукових дослідженнях.

2. Кореневища гірчака зміїного рекомендовано в якості сировини для створення нових ефективних засобів для боротьби з антибіотикорезистентністю мікроорганізмів та корекції дисбіотичних станів кишечника.

3. Розроблений спосіб одержання екстракту кореневищ гірчака зміїного, що володіє протимікробною активністю відносно поліантибіотикорезистентних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів можна рекомендувати для розробки технології виготовлення нового лікувального засобу.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Нозокоміальні пневмонії у хірургічних хворих / Р. Б. Костирко, Р. В. Куцик, І. І. Тітов, Р. М. Мізюк, Т. І. Ключінська, О. О. Янків // Галицький лікарський вісник. – 2002. – Т. 9, № 3. – С.162-164. (Здобувач виконав мікробіологічні дослідження та провів статистичну обробку результатів).

2. Антиінфекційна резистентність школярів м. Івано-Франківська в сучасних екологічних умовах / А. П. Юрцева, Р. В. Куцик, Б. М. Павликівська, О. В. Фофанова, З. О. Ціхонь, Р. М. Мізюк // Архів клінічної медицини. – 2004. – № 1 (5). – С. 69-71. (Здобувач виконав мікробіологічні дослідження та провів статистичну обробку результатів).

3. Вивчення протимікробної активності рослин родини Вересові (Ericaceae Juss) / Н. І. Фрич, Л. М. Вівчарук, Р. М. Мізюк, Р. В. Куцик, Л. М. Куровець // Фармацевтичний журнал. – 2005. – № 2. – С. 97-104. (Здобувач виготовив рослинні екстракти, виконав мікробіологічні дослідження та провів статистичну обробку результатів, оформив статтю).

4. Мізюк Р. М. Особливості мікробіологічного спектру та резистентності до антибіотиків мікроорганізмів, виділених в стаціонарах Івано-Франківська та області / Р. М. Мізюк, Р. В. Куцик, С. К. Борщ // Галицький лікарський вісник. – 2005. – Т.12, № 2. – С. 36-41. (Здобувач створив базу даних на основі результатів мікробіологічних досліджень та провів статистичну обробку результатів, оформив статтю).

5. Корекція мікробіоценозу при застосуванні різних терапевтичних схем у пацієнтів з дисбактеріозом кишечника / С. К. Борщ, Н. М. Середюк, Р. В. Куцик, Л. С. Малофій, І. М. Іванишин, Р. М. Мізюк // Галицький лікарський вісник. – 2005. – Т.12, № 3. – С. 15-19. (Здобувач виконав мікробіологічні дослідження та провів статистичну обробку результатів).

6. Скринінгове дослідження протимікробної активності спиртових екстрактів лікарських рослин / Р. М. Мізюк, Р. В. Куцик, Б. М. Зузук, С. К. Борщ, Н. І. Фрич // Галицький лікарський вісник. – 2005. – Т.12, № 4. – С. 66-71. (Здобувач виготовив рослинні екстракти, виконав мікробіологічні дослідження та провів статистичну обробку результатів, оформив статтю).

7. Порівняльний аналіз чутливості до антибіотиків грам-негативних бактерій, виділених від пацієнтів з проявами патології ШКТ / С. К. Борщ, Н. М. Середюк, Р. В. Куцик, О. В. Борщ, Р. М. Мізюк // Архів клінічної медицини. – 2005. – № 1 (7). – С. 27-30. (Здобувач виконав мікробіологічні дослідження, провів статистичну обробку результатів).

8. Клінічні та мікробіологічні прояви дисбактеріозу кишечника у пацієнтів із гастроінтестинальною патологією / С. К. Борщ, Н. М. Середюк, Р. В. Куцик, Л. С. Малофій, В. М. Вовчук, В. М. Благодатний, Н. С. Духович, Р. М. Мізюк // Архів клінічної медицини. – 2005. – № 2 (8). – С. 44-48. (Здобувач виконав мікробіологічні дослідження, провів статистичну обробку результатів).

9. Мікробіологічне обґрунтування показів до використання препарату „ентерол-250” для елімінації збудників кишкових інфекцій і дисбактеріозу кишечника / С. К. Борщ, В. Г. Войцеховський, В. Г. Міщук, Р. В. Куцик, Н. С. Лень, Р. М. Мізюк // Архів клінічної медицини. – 2006. – № 2 (10). – С. 20-24. (Здобувач виконав мікробіологічні дослідження та проводив статистичну обробку результатів).

10. Куцик Р. В. Протимікробні властивості рослин роду Кермек (*Limonium spp.*) / Р. В. Куцик, Р. М. Мізюк, Л. М. Куровець // Фармацевтичний журнал. – 2007. – № 2. – С. 88-98. (Здобувач виготовив рослинні екстракти, виконав мікробіологічні дослідження, провів статистичну обробку результатів, оформив статтю).

11. Исследование влияния экстракта корней горца змеиноного на течение дисбиоза кишечника в эксперименте / Р. М. Мизюк // Клиническая инфектология и паразитология. – 2014. – № 1(08). – С. 45-50.

12. Методика первинного скринінгового тестування протимікробної активності екстрактів лікарських рослин та синтетичних сполук / Р. М. Мізюк, Н. І. Фрич // Раціоналізаторська пропозиція № 30/2614 від 28.05.2009 року.

(Здобувач виготовив рослинні екстракти, виконав мікробіологічні дослідження, підготував матеріали для подачі заявки на раціоналізаторську пропозицію).

13. Пат. Україна. Спосіб одержання екстракту кореневищ гірчака зміїного, що має протимікробну активність відносно поліантибіотикорезистентних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів / Р. В. Куцик, Р. М. Мізюк. – UA № 83509, опубл. 10.09.13., Бюл. № 17. (Здобувач виготовив рослинні екстракти, виконав мікробіологічні дослідження, підготував матеріали для подачі заявки на корисну модель).

14. Мізюк Р. М. Ентеробактерії як збудники хірургічних інфекцій у лікувальних закладах м. Івано-Франківська та області / Р. М. Мізюк // V міжнародний медичний конгрес студентів і молодих учених, до 10-ї річниці незалежності України, 10-12 травня 2001 р. : тези доповідей. – Тернопіль, 2001. – С. 245.

15. Мізюк Р. М. Роль *Pseudomonas aeruginosa* як збудника госпітальних інфекцій на Івано-Франківщині / Р. М. Мізюк, Т. І. Ключінська, Р. В. Куцик // Розвиток санітарної мікробіології в Україні: тези допов. наукової конференції, присвяченої 100-річчю з дня народження професора Калини Георгія Платоновича, 17 травня 2002 р. – Чернівці, 2002. – С. 80-82. (Здобувач створив базу даних на основі результатів мікробіологічних досліджень, провів аналіз, статистичну обробку одержаних результатів, підготував тези для публікації).

16. Исследование противомикробных и иммуностимулирующих свойств лекарственных растений Карпат и Причерноморья / Р. М. Куцык, Б. М. Зузук, Л. М. Куровец, Р. М. Мизюк, Н. П. Цвеюк, Н. М. Жолобак, Н. Я. Спивак // Новые технологии получения и применения биологически активных веществ: междунар. науч.-практ. конф., 20-25 мая 2002 г. – Симферополь, 2002. – С. 161-162. (Здобувач виготовив рослинні екстракти, виконав мікробіологічні дослідження, провів аналіз та статистичну обробку одержаних результатів, підготував тези для публікації).

17. Мізюк Р. М. Дослідження протимікробної активності лікарських рослин карпатського регіону / Р. М. Мізюк, Р. В. Куцик // IX конгрес світової федерації українських лікарських товариств : наук. конф., 2002 р. : тези доп. — Луганськ, 2002. – С. 34. (Здобувач виготовив рослинні екстракти, виконав мікробіологічні дослідження, провів аналіз та статистичну обробку одержаних результатів, підготував тези для публікації).

18. Мізюк Р. М. Дослідження протимікробної активності спиртових екстрактів лікарських рослин / Р. М. Мізюк, Р. В. Куцик // VII з'їзд Всеукраїнського лікарського товариства, 16-17 травня 2003 р.: тези доп. — Тернопіль, 2003. – Т. 5, № 1 (63). – С. 220-221. (Здобувач виготовив рослинні екстракти, виконав мікробіологічні дослідження, провів аналіз та статистичну обробку одержаних результатів, підготував тези для публікації).

19. Мізюк Р. М. Протимікробна активність біологічно-активних речовин, отриманих з лікарських рослин / Р. М. Мізюк, Р. В. Куцик // X з'їзд Товариства мікробіологів України, 15-17 вересня 2004 р. : тези доп. – Одеса, 2004. – С. 65. (Здобувач виготовив рослинні екстракти, виконував мікробіологічні дослідження, проводив аналіз та статистичну обробку одержаних результатів, підготував тези для публікації).

20. Вивчення антагоністичної активності апатогенних представників роду *Bacillus*, введених в пробіотичний препарат біоспорин, щодо етіологічно значущих збудників дисбактеріозу кишечника та гнійно-запальних процесів / С. К. Борщ,

Н. М. Середюк, Р. В. Куцик, Р. М. Мізюк // Пробиотики-XXI століття. Біологія. Медицина. Практика : міжна. наук.-практ. конф. : матер. конф. – 2004. – С. 12-16. *(Здобувач виконував мікробіологічні дослідження, проводив аналіз та статистичну обробку одержаних результатів, підготував тези для публікації).*

21. Мізюк Р. М. Вивчення протизапальних властивостей екстрактів лікарських рослин / Р. М. Мізюк, Р. В. Куцик // Ювілейний VIII з'їзд Всеукр. лікарського товариства, присвячений 15-річчю організації (1990-2005), 21-22 квітня 2005 р. : тези доп. – Івано-Франківськ, 2005. – Т. 6, № 1-2 (64-65). – С. 360. *(Здобувач виготовляв рослинні екстракти, виконував мікробіологічні дослідження, проводив аналіз та статистичну обробку одержаних результатів, підготував тези для публікації).*

22. Мізюк Р. М. Чутливість основних збудників нозокоміальних інфекцій до екстрактів з рослин роду Кермек / Р. М. Мізюк, Р. В. Куцик // Сепсис. Проблеми діагностики, терапії та профілактики: наук.-практ. конф. з міжнар. участю 29-30 березня 2006 р., під заг. ред. проф. В. П. Малого, проф. І. С. Кратенка. – Харків, 2006. – С. 157-158. *(Здобувач виготовляв рослинні екстракти, виконував мікробіологічні дослідження, проводив аналіз та статистичну обробку одержаних результатів, підготував тези для публікації).*

23. Мізюк Р. М. Вивчення впливу екстракту гірчака зміїного на перебіг хіміотерапевтичного дисбіозу кишечника тварин / Р. М. Мізюк, Р. В. Куцик, Г. П. Гаморак, О. Є. Кондрин // Сучасні підходи до діагностики та лікування у клінічній інфектології : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 14 листопада 2007 р. : матер. конф. – Харків, 2007. – С. 229-230. *(Здобувач виготовляв рослинні екстракти, виконував мікробіологічні дослідження, проводив аналіз та статистичну обробку одержаних результатів, підготував тези для публікації).*

24. Мізюк Р. М. Структура та стан антибіотикорезистентності умовнопатогенних грам-негативних мікроорганізмів, виділених у стаціонарах Івано-Франківська та області / Р. М. Мізюк, Р. В. Куцик // Антибактеріальна та антивірусна терапія на догоспітальному та госпітальному етапах : наук. конф., 27-28 березня 2008 р. : матер. конф. – Харків, 2008. – С. 229-230. *(Здобувач створив базу даних на основі результатів мікробіологічних досліджень, проводив аналіз та статистичну обробку одержаних результатів, підготував тези для публікації).*

АНОТАЦІЯ

Мізюк Р. М. Дослідження протимікробної активності культивованих і дикоростучих лікарських рослин Галичини відносно основних збудників гнійно-септичних інфекцій. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2016.

Дисертація присвячена порівняльній оцінці протимікробних та імуномодулюючих властивостей екстрагованих комплексів біологічно активних сполук, отриманих з лікарських рослин Карпатського регіону відносно клінічних та лабораторних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів.

В ході проведеного дослідження встановлено, що максимально вираженими антимікробними властивостями володіють екстракти на 90 % водному етанолі та

ацетонів. Ідентифіковано лікарські рослини Карпатського регіону із вираженою протимікробною активністю відносно полірезистентних клінічних штамів. Це екстракти кореневищ *Polygonum bistorta* L., *Limonium meyeri* (Boiss.) O. Kuntze і *Limonium hypanicum* Klok., листя *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., слані *Cetraria islandica* (L.) Ach. та *Evernia prunastri* (L.) Ach., бруньок *Betula verrucosa* Ehrh. та *Populus nigra* L., надземної частини *Vaccinium vitis-idaea* L., *Sieversia montana* (L.) R. Br., *Rhus coriaria*, плодів *Juniperus communis* L., коренів *Sanguisorba officinalis* L.).

Встановлено, що окремі екстракти лікарських рослин володіють також протизапальною (кореневищ гірчака зміїного, суцвіть grindелії розчепіреної, слані цетрарії ісландської) та ІФН- γ - і ФНП- α -індукуючою (в найбільшій мірі екстракти омели білої та живокосту лікарського) активностями.

Встановлено виражену протимікробну, протизапальну та антидисбіотичну активність екстрактів кореневищ гірчака зміїного на 90 % водному етанолі та ацетоні, а також підтверджено їх здатність нейтралізувати детермінанти антибіотикорезистентності стафілококів та підвищувати їх чутливість до оксациліну та ципрофлоксацину, що обґрунтовує можливість використання біологічно-активних речовин гірчака зміїного для створення нових препаратів з широким спектром фармакологічних властивостей.

Ключові слова: стафілококи, грамнегативні бактерії, антимікробна активність, резистентність до хіміотерапевтичних засобів, лікарські рослини, *Polygonum bistorta* L., антибіотикопотенціююча активність.

АНОТАЦІЯ

Мизюк Р. М. Исследование противомикробной активности культивируемых и дикорастущих лекарственных растений Галичины отношении основных возбудителей гнойно-септических инфекций. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07 - микробиология. – Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова МЗ Украины, Винница, 2016.

Диссертация посвящена поиску новых эффективных средств с противомикробными свойствами среди биологически активных веществ растительного происхождения в отношении коллекционных и клинических штаммов микроорганизмов, выделенных от пациентов с гнойно-воспалительными инфекциями.

Полученные результаты свидетельствуют, что стафилококки являются частыми возбудителями гнойно-воспалительных инфекций в условиях лечебных учреждений Прикарпатья и составляют 42,0 % в структуре изученных микроорганизмов. Среди них штаммы *S. aureus* составляют 18,6 %, а CNS - 23,4 % от общего количества штаммов. Второй по важности группой возбудителей является грамотрицательные условно-патогенные бактерии, они составляют 32,9 % изученных микробных штаммов. Ведущее место занимают *E. coli* - 22,2 %, бактерии из рода *Pseudomonas spp.* - 6,9 % и протеи - 4,8 %.

Анализ профилей резистентности показывает, что количество полирезистентных штаммов зависит от вида клинического материала. В частности, полирезистентные госпитальные штаммы стафилококков чаще выделяли из мокроты (41,3 %) и раневого

экссудата (38,75 %), энтерококков (85,19 %), энтеробактерий и псевдомонад - мочи (72,9 % и 85,43 % соответственно) и раневого экссудата (71,92 % и 87,39 %).

Разработана методика первичного скринингового тестирования противомикробной активности экстрактов лекарственных растений и установлено, что максимально выраженными антибиотическими свойствами обладают экстракты на 90 % водном этаноле и ацетоновые экстракты.

Идентифицировано лекарственные растения Карпатского региона с выраженной противомикробной активностью в отношении полирезистентных клинических штаммов - экстракты корневищ *Polygonum bistorta* L., *Limonium meyeri* (Boiss.) O. Kuntze и *Limonium hypanicum* Klok., листьев *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., слани *Cetraria islandica* (L.) Ach. и *Evernia prunastri* (L.) Ach., почек *Betula verrucosa* Ehrh. и *Populus nigra* L., надземной части *Vaccinium vitis-idaea* L., *Sieversia montana* (L.) R. Br., *Rhus coriaria*, плодов *Juniperus communis* L., корней *Sanguisorba officinalis* L.). Эффективные действующие концентрации экстрактов на 90 % водном этаноле в отношении полирезистентных штаммов стафилококков были в пределах 73,20-1000 мкг/мл, энтеробактерий - 189,5-1305,8 мкг/мл, псевдомонад - 152,4-1500 мкг/мл.

С целью поиска веществ с высоким уровнем противомикробной активности в отношении грамотрицательных микроорганизмов были изучены ацетоновые экстракты из отдельных видов растительного сырья. Высокую активность относительно грамотрицательных бактерий проявили ацетоновые экстракты корневищ горца змеиноного, кермека Мейера, кермека южнобугский, листья гинкго двулопастного, чая китайского, надземной части толокнянки обыкновенной, коры дуба. Действующие концентрации ацетоновых экстрактов в отношении антибиотикорезистентных штаммов псевдомонад были в пределах - 256-512 мкг/мл, а энтеробактерий - 512-1024 мкг/мл.

Отдельно изучена чувствительность к 90 % водно-этанольным и ацетоновым экстрактам 6 штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных из испражнений больных дисбиозом кишечника. Высокую активность среди обеих типов экстрактов проявлял экстракт корневищ горца змеиноного, причем МПК ацетонового экстракта было в 2 раза меньше, чем водно-этанольного, что позволило предположить возможность его использования для коррекции дисбиотических нарушений.

Установлена противовоспалительная (экстракты корневищ горца змеиноного, соцветий гринделии растопыренной, слани цетрарии исландской) и ИФН и ФНО-продуцирующая (в наибольшей степени экстракты омелы и окопника лекарственного) активность отдельных экстрактов лекарственных растений.

Установлена противомикробная, противовоспалительная и антидисбиотическая активность 90 % водно-этанольного и ацетонового экстрактов корневищ горца змеиноного, а также подтверждено их способность нейтрализовать детерминанты антибиотикорезистентности стафилококков и восстанавливать их чувствительность к оксациллину, ципрофлоксацину и тетрациклину, что обосновывает возможность использования биологически активных веществ горца змеиноного для создания новых препаратов с широким спектром фармакологических свойств.

Ключевые слова: стафилококки, грамотрицательные бактерии, резистентность к химиотерапевтическим средствам, антимикробная активность, лекарственные растения, *Polygonum bistorta* L., антибиотикопотенцирующая активность.

SUMMARY

Miziuk R. M. Investigation of antimicrobial activity of cultured and wild medicinal plants of Galicia region against major pathogens of purulent and septic infections. – Manuscript.

Dissertation for the scientific degree of the candidate of medical sciences, speciality 03.00.07 – microbiology. – Vinnytsya National Pirogov Memorial Medical University Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2016.

The dissertation is devoted to search for new effective drugs with antimicrobial properties among biologically active plant substances against collection and clinical microbic strains, isolated from patients with opportunistic purulent and inflammatory processes.

Antimicrobial activity has detected for extracts prepared on 90 % aqueous ethanol. The medicinal plants of Carpathian region with a strong antimicrobial activity against multiresistant clinical strains have been identified rhizomes of *Polygonum bistorta* L., *Limonium meyeri* (Boiss.) O. Kuntze and *Limonium hypanicum* Klok., leaves of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., thallus of *Cetraria islandica* (L.) Ach. and *Evernia prunastri* (L.) Ach., buds of *Betula verrucosa* Ehrh. and *Populus nigra* L., aerial part of *Vaccinium vitis-idaea* L., *Sieversia montana* (L.) R. Br., *Rhus coriaria*, fruits of *Juniperus communis* L., roots of *Sanguisorba officinalis* L.). Besides antibacterial the antiinflammatory (extracts from rhizomes of *Polygonum bistorta* L., inflorescence of *Grindelia squarrosa* (Pursh) Dun., thallus of *Cetraria islandica* (L.) and IFN- γ - and TNF- α -inducing (extracts from *Viscum album* L. and *Symphytum officinale* L.) activity.

Aqueous-ethanolic and acetone extracts of *Polygonum bistorta* rhizomes showed antimicrobial, anti-inflammatory and antidysbiotic activity. Extracted compounds of *Polygonum bistorta* rhizomes are capable to neutralize antibiotic resistance determinants in staphylococci and increase their sensitivity to oxacillin and ciprofloxacin. That facts determine the use the drug of *Polygonum bistorta* rhizomes for creation of new medications with a wide spectrum of pharmacological properties.

Key words: staphylococci, gramnegative bacteria, antimicrobial activity, antimicrobial resistance to chemotherapeutic agents, medicinal plants, *Polygonum bistorta* L., antibiotic potentiation activity.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

MRS	– метіцилінорезистентні стафілококи
XTP	– хіміотерапевтичні препарати
CNS	– коагулазонегативні стафілококи
MRSA	– метіцилінорезистентні штами золотистого стафілокока
УПМ	– умовно-патогенний(і) мікроорганізм(и)
DMSO	– диметилсульфоксид
МБсК	– мінімальна бактеріостатична концентрація
МБцК	– мінімальна бактерицидна концентрація
БАР	– біологічно-активні речовини
НФГНБ	– неферментуючі грамнегативні бактерії
ІФН (IFN)	– інтерферон
ФНП (TNF)	– фактор некрозу пухлин
ФГА	– фітогемаглютинін
н/ч	– надземна частина рослини
кор.	– корені рослини
к/к	– кореневища рослини
лис.	– листя рослини
паг.	– пагони рослини
GI ₅₀	– growth inhibition of 50 % – концентрація екстракту, яка забезпечує 50 % пригнічення росту тест-культури
TGI	– total growth inhibition – концентрація екстракту, яка забезпечує повне пригнічення росту

Підписано до друку 05.05.2016 р. Замовл. № 102
Формат 60x90 1/16 ум. Друк. арк. 0,9 друк офсетний.
Наклад 100 примірників

Вінниця. Друкарня ВНМУ ім. М.І. Пирогова, Пирогова, 56.

