

## ACȚIUNEA ANTIBACTERIANĂ ȘI ANTIVIRALĂ A EXTRACTELOR DE LYSIMACHIA NUMMULARIA L.

I. László, Hajnalka László, Z. Kisgyörgy, Iuliana Both,  
I. Fűzi, V. Filep

Acțiunea antibacteriană a extractelor apoase ale plantei *Lysimachia nummularia* L. a fost subliniată la noi de Rácz și colab. (1). Constatându-se că diluția finală de 0,33 la sută (drog mediu de cultură) inhibă dezvoltarea tulpinilor de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa* și parțial a tulpinilor de *Shigella boydii*, *Sh. schmitzii* și *Escherichia coli*.

Fűzi și colab. (2, 3) au urmărit acțiunea inhibantă a extractelor apoase ale unor specii de *Lysimachia* asupra tulpinilor de micobacterii și ajung la concluzia că atît extractul apos al unor specii de *Lysimachia* (*L. nummularia*, *L. vulgaris*, *L. punctata*) cit și fracțiunea acetonică obținută din *Lysimachia nummularia* exercită o acțiune inhibantă asupra tulpinilor patogene de micobacterii.

Pe baza acestor concluzii formulate încă în 1965—1966, ne-am propus studierea acțiunii antibacteriene și antivirale a extractelor apoase, respectiv a fracțiunii acetonice, scopul final fiind examinarea ultrastructurii tulpinilor de bacterii și de virusuri după cultivarea lor în prezența substanțelor amintite.

### Material și metodă

#### a) Tulpini de bacterii

Din colecția Disciplinei de microbiologie tulpinile *Staphylococcus aureus*, *Esch. coli* și *Bacillus anthracis*, menținute pe geloză simplă sau geloză sînge, înainte de folosire au fost inoculate în bulion simplu din care după trei ore de incubare la 37°C au fost luate cantitățile necesare pentru efectuarea cercetărilor.

b) *Extractele apoase* totale de *Lysimachia* au fost preparate în Laboratorul de botanică, după FR nouă (1976).

Fracțiunea acetonică am obținut-o prin tratarea extractului apos cu acetonă la 4°C (1 : 3), menținut timp de 12 ore la frigider. După infiltrarea precipitatului, din supernatant s-a eliminat acetona, iar sedimentul amorf, higroscopic s-a reluat în ser fiziologic, fiind obținută o soluție limpede, de culoare brună, care a fost supusă sterilizării prin încălzire timp de 30 min, prin fierbere.

c) 1. *Antibiograma* a fost efectuată prin metoda difuzimetrică pe geloză simplă pe care s-a turnat 1 ml cultură bacteriană de 3 ore, apoi după uscare, pe suprafața mediului au fost depuse rondele de hîrtie cu extract apos și fracțiune acetonică.

După 24 de ore de cultivare s-a determinat diametrul zonei de inhibiție, exprimat în mm.

2. Pentru studierea acțiunii inhibante a extractelor prin *metoda cantitativă* în eprubete cu bulion simplu s-au adăugat extractele în cantități de 0,01 g ml, 0,01 g ml, 0,001 g ml, 0,002 g ml, respectiv 0,004 g ml. În fiecare tub s-a pipetat câte 0,1 ml din culturile microbiene.

3. În alte serii de experiențe extractele, în cantitățile sus-amintite, au fost adăugate la mediul geloză-simplă topită, pe care după solidificare s-au însămânțat culturile de bacterii de 3 ore.

#### d) Cercetări electronmicroscopice (EM)

După 24—48 de ore de cultivare pe bulion simplu în prezența extractelor mediile de cultură au fost centrifugate la 2 500 t min., iar sedimentul a fost fixat cu glutaraldehidă 1,5% timp de 30 min. Postfixarea bacteriilor s-a efectuat după metoda lui Millonig, în tetroxid de osmiu. Deshidratarea sedimentului, includerea în amestec de metacrilat de metil și isobutil (8 : 2), și secționarea blocurilor s-a efectuat după metodele uzuale.

Ultrasețiunile au fost examinate la microscopul electronic TESLA 613 BS.

#### e) Cercetări virusologice

Tulpinile de virusuri de tip ADN: virusul vaccinal, adenovirusul tip 3 cultivate pe linia de celule KB, ne-au servit la urmărirea efectului antiviral al extractelor de *Lysimachia nummularia* L. Titrul virusurilor —  $DI_{50}$  — testat pe celule KB în cazul virusului vaccinal a fost egal cu 0,1 ml diluția  $10^{-3}$ , iar pentru adenovirusul tip 3 cu 0,2 ml din diluția  $10^{-1}$ .

În flacoanele inoculate cu doza de virus stabilită anterior s-au adăugat extractele de *L. nummularia* L, în cantitate de 0,01 g, 0,001 g, 0,002 g și 0,004 g ml mediu de menținere. Mediul de menținere a fost mediul M 199 (Inst. Cantacuzino București) cu 1% ser de vițel. Flacoanele cu virus și extract au fost menținute la 37°C, și controlate zilnic timp de 7 zile pentru urmărirea apariției efectului citopatogen (ECP).

După 7 zile de cultivare culturile celulare au fost fixate și incluse în amestec de metacrilat, după metoda folosită la pct. d.

### Rezultate

1. *Acțiunea extractelor apoase totale și a fracțiunii acetonice de L. nummularia asupra bacteriilor.* În urma efectuării antibiogramei după metoda difuzimetrică am constatat că atât extractele apoase totale, cât și fracțiunea acetonică, inhibă slab dezvoltarea tulpinilor de *Staphylococcus aureus* și *B. anthracis* (zona de inhibiție 10 mm), dar nu influențează creșterea bacilului *Esch. coli*.

Extractele de *L. nummularia* și fracțiunea acetonică adăugate mediilor solide în cantitate de 0,01 g ml mediu inhibă multiplicarea stafilococului auriu și a bacilului cărbunos, însă nu influențează multiplicarea bacilului *Esch. coli*. Extractul apos total, în doza de 0,004 g ml mediu, inhibă parțial creșterea stafilococului și a bacilului cărbunos, dar nu influențează creșterea bacilului coli.

E demn de menționat că fracțiunea acetonică în aceeași doză își păstrează acțiunea inhibantă asupra microbilor sus-menționați.

2. *Examenul electronoptic al bacteriilor cultivate în prezența extractelor de L. nummularia L. arată următoarele:*

În cazul cultivărilor de *Staphylococcus aureus* cca 45% a celulelor bacteriene prezintă modificări ultrastructurale și anume: umflarea celu-

lelor, disrupția peretelui celular. În unele cazuri suprafața peretelui celular are aspect ondulat.

Suprafața *bacilului cărbunos* cultivat în prezența extractelor de *L. nummularia* prezintă semne de denivelări, iar citoplasma microbiană se retractează, se desprinde de peretele celular. Menționăm că această tulpină, după treceri succesive, nu se multiplică pe medii de cultură.

Deși multiplicarea *Esch. coli* nu este inhibată, totuși modificările ultrastructurale sînt mai evidente decît cele amintite la cele două tulpini-stafilococ, respectiv *b. cărbunos*. Pe lângă semnele de umflare a citoplasmei și retractarea ei de peretele celular, deseori pot fi găsite celule bacteriene la care domină disrupția peretelui bacterian și condensarea marginală a citoplasmei.

Se pare că extractele plantei *L. nummularia* acționează în primul rînd asupra peretelui celular.

### 3) Cercetări virusologice

În urma cultivării virusului vaccinal și a adenovirusului în prezența extractelor de *L. nummularia* *L.*, prima observație este că apariția EC atît de caracteristică pentru ambele virușuri este inhibată, deci prin eliminarea cu microscopul inverz nu poate fi precizată multiplicarea virurilor.

În cazul virusului vaccinal, 0,002 g extract apos ml mediu în complet apariția ECP, dar nu inhibă ei întîrzie ECP cauzat de adă virusul tip 3. Materialul obținut prin tratarea extractului apos total *L. nummularia* *L.* cu acetonă însă, inhibă 1000  $DI_{50}$  de virus vaccinal 100  $DI_{50}$  de adenovirus tip 3.

Prin urmare, acțiunea antivirală a fracțiunii acetonice este mai mică și mai evidentă, decît cea a extractului apos total.

*Eramenul electronmicroscopic* al celulelor KB infectate cu virusurile vaccinal și adenovirus tratate cu extractele de *L. nummularia*, evidențiază următoarele:

Particulele virale vaccinale în majoritatea lor sînt lipsite de nucleocapsidă și nici straturile care formează învelișul virusurilor nu sînt bine delimitate.

Foarte frecvent pot fi observate în celulele KB infectate cu virus vaccinal și tratate cu extract acetonic de *L. nummularia*, apariția unor vacuole citoplasmice cu formațiuni sferice mici, asemănătoare virusurilor, avînd uneori înveliș și un miez central electronoptic dens. Natura acestor particule nu am putut-o încă stabili, însă ele apar numai sub influența extractelor.

La martori particulele virale au formă și structură tipică.

Adenovirusul tip 3 în prezența extractelor de *L. nummularia* nu se replică sub forma lui caracteristică. Particulele virale cu dimensiuni diferite (forme cu 70 de nm. și particule mici de cca 30 nm) sînt acumulate în grămezi, uneori sînt lipsite de nucleocapsidă.

Pe baza celor constatate prin examinările electronoptice, se pare că extractele de *L. nummularia* influențează replicarea virusurilor de tip ADN, cauzînd modificări ultrastructurale la nivelul virionilor.

### Concluzii

1) Extractele apoase totale de *L. nummularia* și fracțiunea acetonică a plantei exercită o acțiune inhibantă asupra multiplicării stafilococului

aurii și a bacilului cărbunos. Doza minimă inhibantă de extract a fost de 0,004 g/ml mediu.

2) Microscopia electronică a microbilor cultivați în prezența extractelor de *L. nummularia* confirmă acțiunea antibacteriană a acestora, deoarece pot fi constatate leziuni evidente ale peretelui celular și ale citoplasmei.

3) Acțiunea antivirală a extractelor se manifestă prin inhibarea replicării virusului vaccinal și adenovirusului în culturi de celule, doza inhibantă fiind de 0,002 g extract apos/ml mediu pentru 1000  $DI_{50}$  de virus vaccinal și 100  $DI_{50}$  de adenovirus tip 3. Sub influența extractelor de *Lysimachia* apar modificări morfologice la nivelul virionilor.

4) Având în vedere faptul că substanțele flavonoide pot modifica replicarea virusurilor de tip ADN, presupunem că și în cazul nostru, acțiunea antivirală ar putea să fie legată de prezența acestui component în extractele de *Lysimachia nummularia*.

### Bibliografie

3 c 1. Rácz G., Füzi I., Domokos L.: Rev. med. (1965), 11, 1, 56; 2. Füzi I., viraz G., Both Iuliana, Péter M.: Farmacia (1966), 15, 11, 671; 3. Füzi I.,  $DI_{50}$ z G., Papp I., Domokos L.: Farmacia (1965), 14, 367.

ml c

gat észlő, Hajnalka László, Z. Kisgyörgy, Iuliana Both, I. Füzi, V. Filep

și 0

### MICROBICIDAL AND ANTIVIRAL ACTION OF EXTRACTS OF *LYSIMACHIA NUMMULARIA* L.

viru

Zile The total aqueous extracts of *Lysimachia nummularia* L. and the acetone fraction of the plant exert an inhibitory action on the multiplication of *Staphylococcus aureus* and anthrax bacillus. The smallest inhibiting dose of the extract was 0.04 g/ml medium. The antiviral action of the extracts manifests itself by inhibiting the multiplication of vaccine virus and adenovirus type 3 in cell cultures, the inhibiting dose being 0.002 g aqueous extract/ml medium for 1000  $DI_{50}$  of vaccine virus and 100  $DI_{50}$  of adenovirus type 3. Under the influence of *Lysimachia* extracts, morphological modifications occur at the level of virions.



Fig. nr. 1: Particule de virus vaccinal în citoplasma celulei KB. Forme complete de virusuri. Mărire: cca 70 000 X



Fig. nr. 2: Apariția unor forme incomplete de virusuri (v. vaccinal) în urma cultivării lor în prezența extractelor de Lysimachia nummularia L. Mărire: cca 70 000 X