

*Paweł Kwiatkowski¹, Monika Sienkiewicz², Małgorzata Dziecioł³

Ocena wpływu olejku eterycznego z kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare* Mill.) na aktywność przeciwbakteryjną maści Taconal wobec szczepów *Staphylococcus aureus* w warunkach *in vitro*

Evaluation of the effect of fennel essential oil (*Foeniculum vulgare* Mill.) on antibacterial activity of Taconal ointment against *Staphylococcus aureus* in *in vitro* conditions

¹Katedra Mikrobiologii, Immunologii i Medycyny Laboratoryjnej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Barbara Dołęgowska

²Zakład Alergologii i Rehabilitacji Oddechowej, II Katedra Otolaryngologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Hanna Zielińska-Bliźniewska, prof. nadzw.

³Zakład Syntezy Organicznej i Technologii Leków, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Kierownik Zakładu: dr hab. inż. Agnieszka Wróblewska, prof. ZUT

SUMMARY

Introduction. *Staphylococcus aureus* strains are the commonest cause of the difficult to treat skin infections. Increasing the resistance of *S. aureus* clinical strains to synthetic antimicrobials, as well as side effects of their application justify a study on the effects of essential oils to enhance the antimicrobial activity of preparations containing antibiotics.

Aim. The aim of this work was evaluation of the effect of fennel essential oil on antibacterial activity of Taconal ointment against *S. aureus* isolated from patients with purulent skin lesions.

Material and methods. For the research works eleven *S. aureus* clinical strains isolated from wounds, abscesses, ulcers and acne skin and standard strain of *S. aureus* ATCC 29213 were used. Chemical composition of fennel essential oil was analyzed by gas chromatography with mass selective detector. The disc-diffusion method was used to the susceptibility testing to antibiotics and chemotherapeutics. The MIC (minimal inhibitory concentration) for mupirocin was carried out using the E-test method. The effect of fennel essential oil on antibacterial activity of Taconal ointment against *S. aureus* was tested with use of disc-diffusion method in the growth media with addition of selected concentrations of fennel oil.

Results. The main component of fennel essential oil was trans-anethole (content about 80%). The susceptibility testing to antimicrobials showed that 25% of tested *S. aureus* isolates were resistant to erythromycin, clindamycin and showed inducible or constitutive resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B resistance). The addition of fennel essential oil at a concentration of 0.25, 0.5 or 1.0% to the growth medium led to the significant increase of inhibition zones around the discs with Taconal ointment.

Conclusions. During the time of increasing resistance of bacterial strains to antibiotics, our studies connected with an effect of fennel essential oil on Taconal ointment activity showed that this combination can be used in the treatment of purulent skin lesions caused by staphylococci.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Taconal, fennel essential oil

STRESZCZENIE

Wstęp. Gronkowce złociste są najczęstszą przyczyną ciężkich do wyleczenia zakażeń skóry. Narastająca oporność szczepów klinicznych *Staphylococcus aureus* na syntetyczne leki przeciwdrobnoustrojowe, a także skutki uboczne ich stosowania uzasadniają podjęcie badań nad wpływem olejków eterycznych na zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej preparatów zawierających antybiotyki.

Cel pracy. Celem badań była ocena wpływu olejku z kopru włoskiego (OKW) na aktywność przeciwbakteryjną maści Taconal wobec szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z ropnymi zmianami skórnymi.

Materiał i metody. Materiał do badań stanowiło 11 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z ran, ropni, owrzodzenia i zmiany trądzikowej oraz szczep referencyjny *S. aureus* ATCC 29213. Skład chemiczny OKW oznaczano metodą chromatografii gazowej z detektorem mas. Badanie wrażliwości szczepów *S. aureus* na antybiotyki i chemioterapeutyki przeprowadzono z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krążkowej. MIC (minimalne stężenie hamujące) dla mupirocyny wyznaczono metodą E-test. Wpływ OKW na aktywność przeciwbakteryjną maści Taconal wobec *S. aureus* oznaczano metodą dyfuzyjno-krążkową w podłożach zawierających wybrane stężenia OKW.

Wyniki. Dominującym składnikiem badanego OKW był trans-anetol (ok. 80%). Analiza lekowrażliwości wykazała, że 25% spośród badanych szczepów *S. aureus* było opornych na erytromycynę i klindamycynę oraz dysponowało mechanizmem oporności MLS_B . Dodatek OKW w stężeniach 0,25; 0,5 i 1,0% do podłoża wzrostowego powodował znaczne zwiększenie stref zahamowania wzrostu wokół krążków nasączonych maścią Taconal.

Wnioski. W dobie narastania oporności szczepów bakteryjnych na antybiotyki, przeprowadzone badania, wskazujące na zwiększenie aktywności maści Taconal pod wpływem OKW, niosą możliwość stosowania tego połączenia w leczeniu ropnych zmian skórnych o etiologii gronkowcowej.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, Taconal, olejek eteryczny z kopru włoskiego

Wprowadzenie

Gronkowce złociste są jedną z najczęstszych przyczyn zakażeń zarówno u pacjentów hospitalizowanych, jak i leczonych ambulatoryjnie. *Staphylococcus aureus* są odpowiedzialne za zakażenia miejscowe, takie jak: czyraki, zapalenie mieszków włosowych, liszajec pęcherzowy; zakażenia narządowe, w tym głównie zapalenia płuc, wsierdza, ropni narządowych, a także kości, stawów oraz postaci uogólnionych, jak bakteremia, sepsa, choroba Rittera, wstrząs toksyczny (1, 2). Za chorobotwórczość gronkowców odpowiada szereg czynników zjadliwości. Wśród nich są: egzotoksyny – hemolizyny, leukocydyna Panton-Valentine; enterotoksyny gronkowcowe, toksyna wstrząsu toksycznego oraz eksfoliatyny, szereg egzoenzymów: proteazy, hydrolazy, nukleazy, hialuronidaza, koagulaza, a także białka powierzchniowe wiążące białka macierzy zewnątrzkomórkowej, m.in. fibronektyna, kolagen i elastyna (3).

Zakażenia skóry o etiologii gronkowcowej stanowią poważny problem w praktyce medycznej, szczególnie w leczeniu pacjentów z niedoborami odporności czy z chorobami współistniejącymi, jak np. cukrzyca. Bakterie te są najczęstszą przyczyną zakażeń miejsca operowanego. Bardzo istotnym aspektem w leczeniu jest narastanie oporności gronkowców na szereg leków przeciwbakteryjnych stosowanych w praktyce klinicznej. Rynek farmaceutyczny oferuje wiele leków do stosowania miejscowego w gronkowcowych zakażeniach skóry. Przykładem jest maść Taconal firmy Aflofarm, której główną substancją czynną jest mupirocyna (20 mg/g) – antybiotyk wytwarzany przez bakterie *Pseudomonas fluorescens* (4). Maść stosuje się

do miejscowego leczenia bakteryjnych zakażeń skóry, wywoływanych przez *S. aureus* (w tym przez szczepy *S. aureus* odporne na metycylinę – MRSA), a także inne gronkowce i paciorkowce. Jednak ze względu na działania uboczne mupirocyny, maść nie jest polecana do leczenia np. rozległych ran czy oparzeń.

Pojawienie się opornych na antybiotyki szczepów bakteryjnych z gatunku *S. aureus*, będących przyczyną ciężkich do wyleczenia zakażeń skóry, a także skutki uboczne stosowania leków syntetycznych uzasadniają podjęcie badań nad wpływem olejków eterycznych na zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej preparatów zawierających antybiotyki. Zakażenia skóry o etiologii gronkowcowej pozostają nadal wyzwaniem dla lekarzy klinicyków, a zatem uzasadnione jest poszukiwanie alternatywnych metod leczenia tych zakażeń, np. na drodze wykorzystania olejków eterycznych, na które, jak wiadomo z dostępnego piśmiennictwa, bakterie nie wytworzyły mechanizmów oporności.

Cenną rośliną olejkodajną o właściwościach przeciwbakteryjnych jest koper włoski (*Foeniculum vulgare* Mill.) z rodziny Selerowatych (*Apiaceae*) pochodzący z Europy Południowej oraz regionu Morza Śródziemnego i szeroko uprawiany na całym świecie (5).

Głównymi składnikami olejku eterycznego z kopru włoskiego (OKW) są: trans-anetol, kamfen, fenchon, estragol, limonen, α -pinen, β -pinen, β -mircen, kamfora, 3-karen, α -felandren oraz cis-anetol (6). Zgodnie z piśmiennictwem, dwa najważniejsze chemotypy OKW pochodzą ze słodkiego kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* var. *dulce*), który zawiera nie mniej niż 2% olejku eterycznego oraz z gorzkiego

kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare* var. *vulgare*) zawierającego 14,5% olejku eterycznego. W pierwszym z nich dominuje anetol (około 80%), estragol (około 10%) oraz fenchon (około 7,5%), natomiast w drugim proporcje głównych składników są odmiennie: *trans*-anetol (56,4-58,4%), fenchon (36,2-39,5%) oraz estragol (2,2-2,5%) (7).

Ze względu na swój niepowtarzalny smak, aromat i właściwości konserwujące, OKW stosowany jest głównie w produktach spożywczych (8). Poza przemysłem spożywczym ma on liczne zastosowania w kosmetyce. Ze względu na działanie łagodzące dolegliwości ze strony układu pokarmowego oraz oddechowego, w ostatnich latach rośnie zainteresowanie OKW pod kątem zastosowania medycznego (5). Wywary z kopru włoskiego stosowane są od dawna u niemowląt w celu zapobiegania kolkom oraz wzdęciom (7). Olejek z kopru włoskiego wykazuje poza tym właściwości regulujące i wywołujące menstruację, łagodzące bóle menstruacyjne oraz zwiększające libido (6). Ponadto z danych piśmiennictwa wynika, że OKW ma działanie przeciwtleniające, przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe, przeciwnowotworowe, przeciwkurczycowe, roztoczobójcze, przeciwgrzybicze oraz przeciwbakteryjne (9-11). W wielu ośrodkach prowadzone są badania dotyczące wykorzystania olejku koprowego do leczenia chorób pasożytniczych (12).

Cel pracy

Badania miały na celu określenie wpływu OKW na aktywność przeciwbakteryjną maści Taconal wobec szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z ropnymi zmianami skórnymi.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne

Wykorzystane do badań szczepy *Staphylococcus aureus* zostały wyizolowane w latach 2015-2016 z materiałów pobranych z ropnych zmian skórnych od 11 pacjentów leczonych w Samodzielnym Publicznym Szpitalu Klinicznym nr 2 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Do hodowli wyizolowanych bakterii używano podłoża Chapmana oraz Columbia agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (bioMérieux). Inkubację prowadzono w temp. 37°C przez 24 godz. w warunkach tlenowych. W identyfikacji bakterii uwzględniano: barwienie metodą Grama, typ hemolizy na podłożu z krwią oraz zdolność do rozkładu mannitolu. Wykonywano test koagulazy probówkowej (Biomed) oraz test aglutynacyjny Slidex Staph-Kit (bioMérieux). Szczep *S. aureus* ATCC 29213 został użyty jako szczep kontrolny.

Analiza olejku eterycznego

Do badań wykorzystano handlowy olejek z kopru włoskiego (OKW) firmy Pollena-Aroma. OKW przechowywano w temp. 4°C w butelce z ciemnego szkła.

Skład chemiczny olejku eterycznego oznaczono metodą chromatografii gazowej z detektorem mas (GC-MS). Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu gazowego Agilent Technologies 6890N z detektorem mas 5973 Network, wyposażonego w automatyczny dozownik próbek 7683 Series Injector. Rozdział substancji przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej HP-5MSI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), z następującym programem temperaturowym: temperatura początkowa 50°C, przyrost 4°C/min do 290°C (całkowity czas analizy: 60 min). Pozostałe warunki analizy: jonizacja elektronowa EI (70 eV), gaz nośny: hel (1,2 ml/min), temperatura dozownika: 250°C, temperatura źródła jonów: 230°C, temperatura kwadrupola: 150°C. Chromatogramy całkowitego prądu jonowego rejestrowano w zakresie skanowania 20-500 m/z.

Do zbierania i obróbki danych wykorzystano program ChemStation. Identyfikację związków obecnych w badanym oleju eterycznym przeprowadzono na podstawie ich widm masowych, porównując je z widmami wzorców z biblioteki NIST02. Względna zawartość procentową zidentyfikowanych związków w badanym oleju określano, biorąc pod uwagę ich udział w całkowitym prądzie jonowym wszystkich związków obecnych w próbce.

Wrażliwość szczepów *S. aureus* na antybiotyki i chemioterapeutyki

Badanie wrażliwości szczepów gronkowców złościstych na gentamycynę – GE (10 µg), amikacynę – AN (30 µg), tobramycynę – TOB (10 µg), ciprofloksacynę – CIP (5 µg), lewofloksacynę – LVX (5 µg), trimetoprim/sulfametoksazol – SXT (1,25-23,75 µg), linezolid – LD (10 µg), rifampicynę – RA (5 µg) i mupirocynę – MUP (200 µg) (Becton Dickinson) przeprowadzono z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krażkowej. Oznaczenie oporności na metycylinę (fenotyp MRSA) przeprowadzono z wykorzystaniem krążka bibułowego nasączonego 30 µg cefoksytyny (FOX) (Becton Dickinson). Szczepy bakteryjne posiewano na podłożu Columbia agar z dodatkiem 5% krwi baraniej i inkubowano 24 godz. w temp. 37°C w warunkach tlenowych, a następnie sporządzano zawiesiny bakteryjne o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Tak przygotowane zawiesiny posiewano na podłożu Mueller-Hinton agar (MHA) (bioMérieux),

a następnie umieszczano na nich krążki z antybiotykami. Uzyskane wyniki interpretowano zgodnie z zaleceniami European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (13).

Do określenia fenotypu oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B (MLS_B) zastosowano metodę dyfuzyjno-krążkową zgodnie z rekomendacjami EUCAST (13) z zastosowaniem krążków z erytromycyną – E (15 µg) i klindamycyną – CC (2 µg) (Becton Dickinson) oraz podłoża MHA. Płytki inkubowano w warunkach tlenowych przez 18 godz. w temp. 37°C. Interpretacji wyników dokonywano według Leclercq (14). Oporność na oba antybiotyki (fenotyp konstytutywny) lub oporność na E i strefa zahamowania wzrostu w kształcie litery D wokół krążka z CC (fenotyp indukcyjny) świadczyła o obecności mechanizmu oporności MLS_B.

Określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dla mupirocyny

MIC dla mupirocyny wyznaczono metodą E-test zgodnie z zaleceniami EUCAST (13). Paski z MUP (bioMérieux) w gradiencie stężeń 0,064-1024 µg układano na podłożu MHA, na które uprzednio posiano zawiesiny szczepów *S. aureus* (0,5 w skali McFarlanda). Płytki inkubowano w warunkach tlenowych przez 18 godz. w temp. 37°C, po czym odczytywano wyniki badań.

Przygotowanie podłoż do badania wpływu OKW na aktywność bakteriobójczą maści Taconal

Podłoża mikrobiologiczne przygotowano według procedury opisanej przez Hammer i wsp. (15) w modyfikacji własnej. W tym celu do wysterylizowanego podłoża MHA o temp. 50°C dodawano OKW, tak aby uzyskać podłoża zawierające odpowiednio 0,25; 0,5 i 1,0% badanego olejku eterycznego. W celu równomiernej dyspersji olejku do mieszaniny dodawano Tween 80 (1%) (Sigma-Aldrich). Całość mieszano przy użyciu mieszadła mechanicznego do równomiernego rozprowadzenia olejku w całej objętości podłoża, a następnie przenoszono je za pomocą pipety serologicznej do sterylnych płytek Petriego (o średnicy 90 mm) i pozostawiano do zastygnięcia. Płytki umieszczano następnie na 1 godz. w cieplarni w temp. 37°C.

Określenie wpływu OKW na aktywność przeciwbakteryjną maści Taconal

Wpływ OKW na aktywność przeciwbakteryjną maści Taconal wobec szczepów *S. aureus* oznaczano metodą dyfuzyjno-krążkową. 24-godzinne hodowle *S. aureus* rozcieńczano w płynie fizjologicznym (0,9% NaCl) do gęstości 0,5 w skali McFarlanda i наносzono na

płytki z przygotowanymi podłożami MHA, następnie na płytkach układano krążki bibułowe (o średnicy 9 mm) nasączone 25 µl roztworem maści Taconal firmy Aflofarm (1 g/ml wody destylowanej). Czas nasączenia wynosił 1 godz. Płytki wraz z ułożonymi na nich krążkami inkubowano przez 18 godz. w temperaturze 37°C. Po inkubacji odczytywano strefy zahamowania wzrostu w mm. Jako kontrolę użyto SXT (trimetoprim/sulfametoksazol) (1,25/23,75 µg) firmy Diag-Med (o średnicy 6 mm). Wszystkie doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki

Skład chemiczny OKW

Analiza chemiczna olejku eterycznego z kopru włoskiego wykazała obecność 11 związków, wśród których dominującym składnikiem był *trans*-anetol (77,9%). W badanym oleju stwierdzono również znaczącą ilość fenchonu (12,8%), w mniejszych ilościach występowały: α-pinen (3,8%), estragol (2,3%) i limonen (2,1%) i inne związki. Wyniki szczegółowej analizy składu chemicznego OKW zostały przedstawione w tabeli 1.

Wrażliwość szczepów *S. aureus* na antybiotyki i chemioterapeutyki

Analiza lekowrażliwości szczepów *S. aureus* wykazała, że większość szczepów – 8 (66,7%) – była wrażliwa na wszystkie użyte związki przeciwbakteryjne. Wszystkie izolaty były wrażliwe na FOX, co

Tab. 1. Skład olejku z kopru włoskiego (OKW) wyznaczony metodą GC-MS

Związek	Czas retencji RT (min)	Zawartość względna (%)
α-Pinen*	5,52	3,8
Kamfen	5,89	0,1
β-Pinen	6,63	0,1
Mircen	7,03	0,2
α-Felandren	7,41	0,2
Limonen*	8,13	2,1
γ-Terpinen	9,07	0,2
Fenchon*	10,05	12,8
Estragol*	13,75	2,3
Aldehyd anyżowy	15,86	0,3
<i>trans</i> -Anetol*	16,96	77,9

*główne składniki OKW

świadczy o braku szczepów MRSA w badanej grupie. W przypadku pozostałych antybiotyków odsetek opornych szczepów *S. aureus* kształtował się następująco: E – 3 (25,0%), CC – 3 (25,0%) i CIP – 1 (8,3%). W przypadku 2 szczepów (16,7%) wykryto mechanizm oporności MLS_B typu indukcyjnego, a dla 1 (8,3%) szczepu MLS_B typu konstytutywnego.

Szczegółowy rozkład wrażliwości na poszczególne antybiotyki i chemioterapeutyki przedstawiono w tabeli 2.

Działanie mupirocyny na szczepy *S. aureus*

Stwierdzono, że MUP wykazywała działanie przeciwbakteryjne wobec wszystkich szczepów *S. aureus*. Uzyskane wartości MIC wahały się w granicach 0,19–0,125 µg/ml (tab. 2).

Ocena wpływu OKW na aktywność przeciwbakteryjną maści Taconal

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że maść Taconal w zastosowanym stężeniu wykazywała

właściwości antybakteryjne wobec szczepu referencyjnego, jak i wszystkich szczepów klinicznych *S. aureus* izolowanych od pacjentów ze skórnymi zmianami ropnymi. Dodatek OKW do podłoża MHA powodował zwiększenie strefy zahamowania wzrostu dookoła krążków nasączonych maścią Taconal średnio o 4 mm przy zawartości 0,25% olejku z kopru włoskiego, o 8 mm przy zawartości 0,5% OKW i o 14 mm, kiedy zastosowano 1,0% OKW. Zwiększenie strefy zahamowania wzrostu dookoła krążków z SXT z zastosowaniem tych samych ilości OKW w podłożu zwiększyło strefy zahamowania wzrostu o 2, 4 i 5 mm.

Dodatek 1% Tweenu 80 do podłoża MHA nie wpływał znacząco na strefę zahamowania wzrostu dookoła krążków nasączonych roztworem maści Taconal oraz SXT. Uzyskane wyniki przedstawiono szczegółowo w tabeli 3 oraz na rycinie 1.

Dyskusja

Ogromne nadzieje na otrzymanie wielu aktywnych biologicznie leków mogących mieć zastosowanie

Tab. 2. Analiza lekowrażliwości badanych szczepów *S. aureus*

Miejsce izolacji <i>S. aureus</i>	Lekowrażliwość szczepów <i>S. aureus</i>												MIC MUP [µg/ml]	Fenotyp
	FOX	GE	AN	TOB	CIP	LVX	E	CC	SXT	LD	RA	MUP		
Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,19	–
Zmiana trądzikowa	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,25	–
Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,19	–
Ropień	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	0,25	kMLS _B
Rana	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	0,19	iMLS _B
Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,125	–
Owrzodzenie	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,25	–
Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,19	–
Ropień	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,25	–
Rana	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	0,25	iMLS _B
Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,19	–
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,25	–

S – wrażliwy; R – oporny; FOX – cefoksytyna; GE – gentamycyna; AN – amikacyna; TOB – tobramycyna; CIP – ciprofloksacyna; LVX – lewofloksacyna; E – erytromycyna; CC – klindamycyna; SXT – trimetoprim/sulfametoksazol; LD – linezolid; RA – rifampicyna; MUP – mupirocyna; MIC – minimalne stężenie hamujące; kMLS_B – fenotyp oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B typu konstytutywnego; iMLS_B – fenotyp oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B typu indukcyjnego

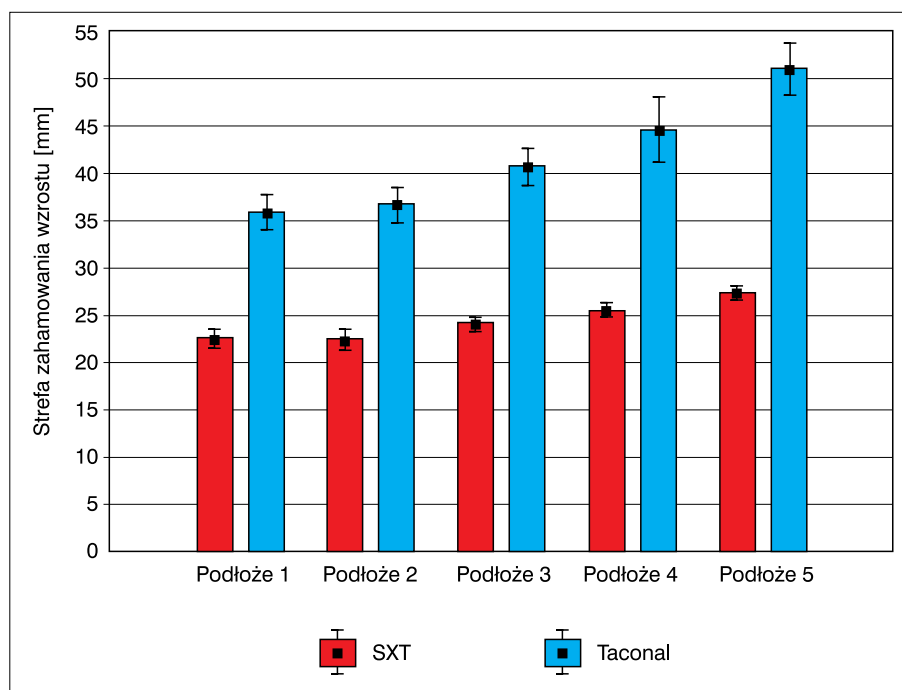
Tab. 3. Analiza wpływu OKW w podłożu MHA na strefy zahamowania wzrostu dla SXT (trimetoprim/sulfametoksazol) i maści Taconal wobec badanych szczepów *S. aureus*

Nr szczepu	Substancja aktywna	Strefa zahamowania wzrostu [mm]				
		podłoże 1	podłoże 2	podłoże 3	podłoże 4	podłoże 5
1	SXT	22,5 ± 0,6	21,5 ± 0,6	23,0 ± 0,0	25,5 ± 0,6	27,0 ± 0,0
	Taconal	35,0 ± 1,0	36,0 ± 1,0	38,3 ± 0,6	41,3 ± 0,6	47,7 ± 1,1
2	SXT	22,5 ± 0,6	22,0 ± 0,0	23,0 ± 0,0	24,5 ± 0,6	27,0 ± 0,0
	Taconal	32,7 ± 1,5	34,3 ± 0,6	37,7 ± 0,6	40,3 ± 0,6	47,0 ± 1,0
3	SXT	21,5 ± 0,6	21,5 ± 0,6	25,0 ± 0,0	26,5 ± 0,6	28,0 ± 0,0
	Taconal	34,0 ± 1,0	34,3 ± 0,6	43,7 ± 1,5	48,7 ± 0,6	54,0 ± 0,0
4	SXT	22,0 ± 0,0	20,5 ± 0,6	23,5 ± 0,6	24,5 ± 0,6	27,0 ± 0,0
	Taconal	35,3 ± 0,6	35,3 ± 0,6	40,3 ± 0,6	44,7 ± 0,6	53,0 ± 0,0
5	SXT	21,0 ± 0,0	21,5 ± 0,6	23,5 ± 0,6	26,5 ± 0,6	28,0 ± 0,0
	Taconal	33,7 ± 0,6	35,0 ± 1,0	42,3 ± 0,6	52,0 ± 0,0	b.w.
6	SXT	22,5 ± 0,6	22,5 ± 0,6	24,5 ± 0,6	26,0 ± 1,0	27,5 ± 0,6
	Taconal	36,7 ± 0,6	37,3 ± 0,6	42,3 ± 0,6	43,7 ± 0,6	52,0 ± 0,0
7	SXT	23,5 ± 0,6	23,5 ± 0,6	25,0 ± 0,0	26,5 ± 0,6	27,5 ± 0,6
	Taconal	37,3 ± 0,6	38,3 ± 0,6	42,3 ± 0,6	47,3 ± 0,6	54,0 ± 0,0
8	SXT	24,5 ± 0,6	24,0 ± 0,0	24,5 ± 0,6	25,5 ± 0,6	27,0 ± 0,0
	Taconal	37,3 ± 0,6	39,3 ± 0,6	41,3 ± 0,6	44,7 ± 0,6	51,0 ± 0,0
9	SXT	22,5 ± 0,6	23,5 ± 0,6	24,5 ± 0,6	25,0 ± 0,0	27,5 ± 0,6
	Taconal	36,3 ± 0,6	37,7 ± 0,6	40,7 ± 0,6	45,7 ± 0,6	52,0 ± 0,0
10	SXT	23,0 ± 0,0	23,5 ± 0,6	24,0 ± 0,0	25,6 ± 0,6	27,0 ± 0,0
	Taconal	39,0 ± 0,0	39,3 ± 0,6	41,0 ± 0,0	43,7 ± 0,6	51,0 ± 0,0
11	SXT	22,5 ± 0,6	22,5 ± 0,6	24,0 ± 0,0	25,0 ± 0,0	26,5 ± 0,6
	Taconal	36,3 ± 0,6	37,3 ± 0,6	40,7 ± 0,6	43,3 ± 0,6	53,0 ± 0,0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	SXT	22,0 ± 0,0	22,0 ± 0,0	24,0 ± 0,0	26,0 ± 0,0	27,5 ± 0,6
	Taconal	36,7 ± 0,6	35,7 ± 0,6	37,7 ± 0,6	40,3 ± 0,6	46,0 ± 1,0

podłoże 1 – Mueller-Hinton agar (MHA); podłoże 2 – MHA + 1% Tween 80; podłoże 3 – MHA + 1% Tween 80 + 0,25% oleju z kopru włoskiego (OKW); podłoże 4 – MHA + 1% Tween 80 + 0,5% OKW; podłoże 5 – MHA + 1% Tween 80 + 1% OKW; SXT – trimetoprim/sulfametoksazol; b.w. – brak wzrostu

w terapii przeciwdrobnoustrojowej wiązano z rozwojem nauk chemicznych, w tym z możliwościami syntezy skomplikowanych strukturalnie związków. Jednak na przestrzeni lat okazało się, że wraz z opracowywaniem

i wprowadzaniem na rynek farmaceutyczny coraz to nowych antybiotyków, drobnoustroje ciągle udoskonalają swoje mechanizmy oporności. Wiadomo, że przeciwdrobnoustrojowe leki syntetyczne nie spełniają



Ryc. 1. Wpływ olejku eterycznego z kopru włoskiego (OKW) w podłożach: 1 – Mueller-Hinton agar (MHA), 2 – MHA + 1% Tween 80, 3 – MHA + 1% Tween 80 + 0,25% OKW, 4 – MHA + 1% Tween 80 + 0,5% OKW, 5 – MHA + 1% Tween 80 + 1% OKW na strefę zahamowania wzrostu w obecności SXT (trimetoprim/sulfametoksazol) oraz maści Taconal w odniesieniu do szczepów *S. aureus* izolowanych ze skórnych zmian ropnych

oczekiwać nie tylko ze względu na malejącą skuteczność, ale również z powodu wielu działań ubocznych. Wrażliwość drobnoustrojów na leki przeciwbakteryjne nie przesądza o sukcesie terapeutycznym w warunkach *in vivo*. Mając powyższe na uwadze, istnieje potrzeba poszukiwania innych skutecznych związków przeciwdrobnoustrojowych. Związki pochodzenia roślinnego wykazują znane i cenione wielokierunkowe działanie terapeutyczne, w tym nie tylko przeciwdrobnoustrojowe, ale również przeciwutleniające czy immunostymulujące. Poza tym wiadomo, że metabolity roślinne, a wśród nich także olejki eteryczne, wykazują właściwości addycyjne i synergistyczne zarówno w połączeniu ze sobą, jak i w połączeniu z zalecanymi w leczeniu syntetycznymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi (16-18).

Zgodnie z zaleceniami Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów, mupirocyna służy do likwidacji nosicielstwa szczepów MRSA na błonach śluzowych nosa. Jednak z powodu coraz częstszego pojawiania się wysokoopornego na mupirocynę szczepu *S. aureus* zaleca się rozważne jej stosowanie w środowisku szpitalnym (19).

Zaprezentowane wyniki aktywności przeciwbakteryjnej olejku eterycznego z kopru włoskiego wskazują, że wykazuje on właściwości zwiększające aktywność maści Taconal. Zastosowanie niskich

stężeń OKW (0,25; 0,5 i 1,0%) w podłożu spowodowało znaczne powiększenie stref zahamowania wzrostu wokół krążków nasączonych maścią Taconal. Znaczne zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej maści Taconal odnotowano również wobec szczepów gronkowców złocistych dysponujących fenotypem oporności na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B.

Zgodnie z wynikiem analizy składu chemicznego badanego OKW dominującym składnikiem był *trans*-anetol, który występował w ilości blisko 80%. Aktywność przeciwbakteryjna olejku eterycznego z pewnością zależy od wysokiej zawartości tego składnika, ale również pozostałych związków występujących w znaczących ilościach. Gradinaru i wsp. (20) wykazali również zwiększoną aktywność przeciwbakteryjną amoksycyliny i ciprofloksacyny w połączeniu z olejkami anyżowym zawierającym powyżej 90% *trans*-anetolu wobec szczepów *Streptococcus pneumoniae*. Autorzy stwierdzili działanie addycyjne wobec szczepu opornego na penicylinę oraz addycyjne i synergistyczne wobec szczepu opornego na penicylinę, streptomycynę i erytromycynę dla wybranych kombinacji stężeń antybiotyku i olejku eterycznego. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe wykazuje również kolejny składnik badanego olejku z kopru włoskiego – fenchon (21). Badania Shin

i Pyun (22) wykazały z kolei właściwości synergistyczne estragolu w połączeniu z ketokonazolem wobec *Candida albicans* i *C. utilis* oraz działanie addycyjne wobec *C. tropicalis*. Wiadomo również, że dwa węglowodory monoterpene: limonen i α -pinen, których obecność została stwierdzona w badanym oleju z kopru włoskiego, w połączeniu ze sobą wykazują działanie synergistyczne (23).

W ostatnich latach metabolity roślinne ze względu na swoje rozliczne właściwości, cieszą się coraz większym zainteresowaniem pod kątem wykorzystania w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz spożywczym. Wiele badań doprowadziło do opracowania unikalnych receptur, co zaowocowało ukazaniem się patentów. Wiele z nich dotyczy ciekawych preparatów o działaniu przeciwbakteryjnym do stosowania przy bakteryjnych zakażeniach skórnych, jak np. opracowanie receptury maści zawierającej ekstrakt metanolowy z liści *Clinacanthus nutans*, skutecznej w leczeniu zakażeń wywołanych przez *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (24). Przykładem wykorzystania olejków eterycznych jest także opracowanie przez Worthingtona i Karpanena (25) preparatu przeznaczonego do zapobiegania i leczenia gronkowcowych

zakażeń skórnych, opartego na eukaliptusowym oleju eterycznym i chlorheksydynie.

Uzyskane wyniki mogą być wskazówką do kontynuacji badań *in vitro* wobec wielolekoopornych gronkowców, w tym szczepów metacylinoopornych, a także prób przedklinicznych.

Wnioski

1. Uzyskane wyniki dowiodły, że maść Taconal w połączeniu z olejkami eterycznymi z kopru włoskiego (OKW) wykazuje znacznie silniejsze właściwości przeciwbakteryjne wobec badanych szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych od pacjentów z ropnymi zmianami skórnymi, w porównaniu do samej maści.
2. Aktywność OKW jest prawdopodobnie związana z obecnością głównego składnika olejku eterycznego – *trans*-anetolu (77,9%), a także innych związków jak fenchon, limonen i α -pinen, występujących w oleju w ilości od 2,1 do 12,8%.
3. Badania wskazują, że istnieje możliwość stosowania maści Taconal w połączeniu z olejkami z kopru włoskiego w leczeniu ropnych zmian skórnych o etiologii gronkowcowej, co umożliwi zmniejszenie skutecznej terapeutycznie dawki antybiotyku.

Piśmiennictwo

1. Dryden MS. Complicated skin and soft tissue infection. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:35-44.
2. van Belkum A, Melles DC, Snijders SV i wsp. Clonal distribution and differential occurrence of the enterotoxin gene cluster, egc, in carriage-versus bacteremia-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1555-7.
3. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:16-34.
4. El-Sayed AK, Hothersall J, Cooper SM i wsp. Characterization of the mupirocin biosynthesis gene cluster from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Chem Biol* 2003; 10:419-30.
5. Esquivel-Ferriño PC, Favela-Hernández JM, Garza-González E i wsp. Antimycobacterial activity of constituents from *Foeniculum vulgare* var. *dulce* grown in Mexico. *Molecules* 2012; 17:8471-82.
6. Ozbek H, Uğraş S, Dülger H i wsp. Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Fitoter* 2003; 74:317-9.
7. Gori L, Gallo E, Mascherini V i wsp. Can estragole in fennel seed decoctions really be considered a danger for human health? A fennel safety update. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012:860542.
8. Shahat AA, Ibrahim AY, Hendawy SF i wsp. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules* 2011; 16:1366-77.
9. Diao WR, Hu QP, Zhang H i wsp. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control* 2014; 35:109-16.
10. Badgujar SB, Patel VV, Bandivdekar AH. *Foeniculum vulgare* Mill: A review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *Biomed Res Int* 2014; 2014:842674.
11. Tripathi P, Tripathi R, Patel RK i wsp. Investigation of antimutagenic potential of *Foeniculum vulgare* essential oil on cyclophosphamide induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Drug Chem Toxicol* 2013; 36:35-41.
12. Wakabayashi KA, de Melo NI, Aguiar DP i wsp. Anthelmintic effects of the essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill., *Apiaceae*) against *Schistosoma mansoni*. *Chem Biodivers* 2015; 12:1105-14.
13. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zones diameters. Version 5.0, 2015. <http://www.eucast.org>.
14. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002; 34:482-92.
15. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999; 86:985-90.
16. Aiyegoro OA, Okoh AI. Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: implications in antimicrobial chemotherapy. *J Med Plants Res* 2009; 3:1147-52.
17. Stefanović O, Comic L. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. *J Appl Pharm Sci* 2012; (2):1-5.

18. Bassolé IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012; 17:3989-4006.
19. Żabicka D, Hryniewicz W. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. Oznaczanie wrażliwości ziarniaków Gram-dodatnich z rodzaju *Staphylococcus* spp. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów 2009.
20. Gradinaru AC, Miron A, Trifan A i wsp. Screening of antibacterial effects of anise essential oil alone and in combination with conventional antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2014; 118:537-43.
21. Angioni A, Barra A, Coroneo V i wsp. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J Agric Food Chem* 2006; 54:4364-70.
22. Shin S, Pyun MS. Anti-*Candida* effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. *Phytother Res* 2004; 18:827-30.
23. Tserennadmid R, Takó M, Galgóczy L i wsp. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int J Food Microbiol* 2011; 144:480-6.
24. Sekar M, Rashid NA. Formulation, evaluation and antibacterial properties of herbal ointment containing methanolic extract of *Clinacanthus nutans* leaves. *Int J Pharm Clin Res* 2016; 8:1170-4.
25. Worthington T, Karpanen T. Use of chlorhexidine in combination with essential oil in manufacturing medicament useful for prevention and/or treatment of infection in the skin below *stratum corneum*, infection of the dermis, and infection of hair follicle. US20110117223 A1 (2011).

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 9.11.2016

zaakceptowano/accepted: 15.12.2016

Adres/address:

*mgr inż. Paweł Kwiatkowski

Katedra Mikrobiologii, Immunologii i Medycyny Laboratoryjnej

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin

tel. +48 (91) 466-16-52

e-mail: pawel.kwiatkowski@pum.edu.pl