

ODOS MIKROBIOTA IR JOS ATSPARUMO TYRIMAI *IN VITRO*

ZITA JOVAIŠIENĖ*, EMILIJA BUROKAITĖ**

**Utenos kolegija, Medicinos fakultetas, Utenio a. 2, Utena, LT-28241*

***Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas,
M. K. Čiurlionio g. 21, Vilnius, LT-03101*

A n o t a c i j a

Ištirtas eterinių aliejų *Lavandula angustifolia*, *Thymus vulgaris* ir *Melaleuca alternifolia* poveikis nuo žmogaus odos išskirtiems ir išaugintiems *in vitro* *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp. Efektyviausiai visas tris tirtąsias grybų rūšis veikė čiobrelio *Thymus vulgaris*, o silpniausiai – tikrosios levandos *Lavandula angustifolia* eterinis aliejus. *Fusarium* sp. ir *Geotrichum* sp. nebuvo labai jautrūs farmakologiškai pripažintam fungicidui – pražangalapio mirtenio *Melaleuca alternifolia* aliejui. Nustatyta, kad skirtingos dermatofitų rūšys yra specifiskai jautrios juos veikusiems aliejams.

Reikšminiai žodžiai: dermatofitai, *Lavandula angustifolia*, *Thymus vulgaris*, *Melaleuca alternifolia*, eteriniai aliejai, *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp.

ĮVADAS

Žmogaus odoje aptinkama daugybė mikroorganizmų rūšių. Didžioji jų dalis yra nekenksmingi, o kai kurie – būtini, kad oda išliktų sveika. Aplinkos sąlygos, prakitavimas, viršutinių kvėpavimo takų infekcijos, kūno higiena, odos traumos, imuninės sistemos būklė daro didelę įtaką jų sudėčiai. Todėl kartais aptinkama tokių, kurie nėra įprastinė odos mikrobiota. Iki šiol tiksliai nežinoma, kokios mikroorganizmų rūšys gali gyventi žmogaus odoje kaip komensalai ar oportunistai, o kurios gali sukelti rimtas odos ligas. Gerai ištirtas tik kai kurių mikroorganizmų vaidmuo, pvz., stafilokokinės infekcijos esant aknei, raudonei, neurodermatitui. Tačiau koks vaidmuo, pvz., *Propionbacterium acne*, *Bacillus oleronius*, *Demodex* spp., yra mokslinių diskusijų objektas iki

šiol (Bauman, 2009). Odos uždegimo apimtose srityse, pūliuojančiuose bėrimuose, be bakterijų, erkių, aptinkami ir mikroskopiniai grybai. Jų įtaka epidermio būklei iki šiol mažai tyrinėta.

Dar sudėtingesnis klausimas kyla tuomet, kai reikia šiuos mikrobus sunaikinti. Dezinfekuojamos priemonės, įvairūs tepalai infekuotai odai gydyti naikina visus mikroorganizmus. Šitaip gydant nelieka ir naudingųjų. Sunaikinus gerąsias bakterijas atsiranda laisva erdvė oportunistiniams organizmams, pavyzdžiui, plačiai paplitusiam mieliagrybiui *Candida albicans*. Padidėjęs *C. albicans* medžiagų apykaitos produktų kiekis silpnina organizmo imuninę sistemą (Tampieri et al., 2005; Schnaubelt, 2012). K. Schnaubelt (2012) teigia, kad daugelis šiuolaikinių kūno priežiūros priemonių turi sintetinės kilmės aromatinių medžiagų. Jos, kaip antibiotikai, kai kurie pesticidai, evoliucijos požiūriu yra svetimos organizmui, ir jis į šias medžiagas reaguoja naujo pobūdžio ligomis – neurodermatitais, chroniško nuovargio sindromu ir kt.

Sustabdyti nepageidaujamų mikrobus dauginimąsi odoje, nesutrikdant jos apsauginių funkcijų, yra sudėtinga. Pastaruoju metu vis didesnio dėmesio sulaukia augalinės kilmės organiniai junginiai. Nustatyta, kad augalų antriniai metabolitai – eteriniai aliejai – įprasti žmogaus organizmui, todėl, teisingai juos naudojant, yra saugūs odai, nežaloja jos sveikųjų ląstelių ir gali būti sėkmingai taikomi šiai problemai spręsti. Fiziologinėmis dozėmis vartojant natūralius aliejus rizika atrodo menka lyginant su tradicinės medicinos rizika (Schnaubelt, 2012). J. Buckle (2003) aprašo daugelį klinikinių tyrimų, atliktų gydant infekuotas žaizdas, pragulas ir kitas bakterijų kolonizuotas odos ir gleivinių vietas (Buckle, 2003). P. Belaiche (1979) pasiūlė bakterinių kultūrų jautrumo eteriniams aliejams patikrinimo būdą – aromatoqramą (Belaiche, 1979; Blackwell, Smith, 1995). Mikozių sukėlėjams panašaus metodo kol kas nėra sukurta, nors aromaterapinių studijų atlikta nemažai. Rezultatų susisteminti ir palyginti neįmanoma dėl jų epizodiškumo ir metodikų įvairovės. Bandymą sugrupuoti odos ligas ir jas gydančių augalų rūšis pateikia R. Solanki (2011). Straipsnyje nurodomi farmakologiškai patvirtinti vaistinių augalų sąrašai, tūkstančius metų naudoti liaudies medicinoje odos susirgimams gydyti. Tačiau patentuotais jų preparatais kol kas nei Lietuvoje, nei kitose Europos šalyse oficialiai neprekiuojama.

Pasaulyje žinomos 350 grybų rūšys, kurios asocijuojamos su žmonių ir kitų šiltakraujų gyvūnų mikozėmis (Van der Aa et al., 1998). A. Lugauskas ir kt. (2002) aprašė 193 žmogaus sveikatai pavojingas grybų rūšis, aptiktas Lietuvoje. Autoriai pateikia duomenų ir apie šio tyrimo metu išskirtas, sąlygiškai patogeniškoms laikomas *Geotrichum*, *Phoma*, *Fusarium* genčių grybų rūšis. Pvz., rašoma, kad *Geotrichum candidum* pasižymi proteolitiniu, lipaziniu, celiuliaziniu fermentiniu aktyvumu, jis išplitęs ant įvairių negyvų substratų. Vis dėlto kai kurios padermės gali sukelti įvairių odos, nagų, burnos gleivinės pažeidimų. *Phoma* genties grybų taip pat randama dažnai, jie gali sintetinti anti-biotines medžiagas, kurios, tikėtina, būna naudingųjų ar patogeninių mikroorganizmų disbalanso priežastis odoje. Šio patogeno aptinkama jaunų žmonių spuoguose (Kwon-Chung, Bennett, 1992). *Fusarium* genties grybų taip pat plačiai aptinkama gamtoje, kai kurios rūšys išskiria mikotoksinus, kuriais apsinuodija gyvūnai. Šios rūšies grybai sukelia triušių odos nekrozę, jie pavojingi ir žmonėms – gali sukelti odos keratinozę, pažeisti kojų sąnarius, įsiveisti nosies ertmėje (Lugauskas ir kt., 2002).

Darbo tikslas: ištirti odos pasėlių kultūrose išaugintų *Geotrichum* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp. jautrumą *Lavandula angustifolia*, *Melaleuca alternifolia* ir *Thymus vulgaris* (linalolio tipas) eteriniams aliejams *in vitro*.

METODIKA

Tyrimo medžiaga. Pirmas ėminys – nuo aknės pažeisto ir šerpetojančio 54 metų moters skruosto, kurios odos riebalinių liaukų pūlinukuose buvo aptikta ir *Demodex* sp. erkučių.

Antras ėminys – nuo 48 metų moters paraudusio ir paburkusio akies voko krašto, kuriai įtarta raudonė.

Organinės kilmės eteriniai aliejai *Levandula angustifolia*, *Thymus vulgaris* (linalolio tipo) ir *Melaleuca alterinfolia* įsigyti prekybos salone „Kvapų namai“.

Tyrimo metodas. Kokybinis bandomasis tyrimas.

Tyrimo eiga. Tyrimo pradžia – 2010 01 07, pabaiga – 2010 01 21,

tyrimas atliktas buvusioje Valstybinės augalų apsaugos tarnybos Fito-sanitarinių tyrimų laboratorijoje. Odos ėminio pasėliai – *Petri* lėkštelėse į bulvių dekstrozės agarą mitybos terpę (PDA) (Van der Aa et al., 1998), inkubatoriuje, 23° C temperatūroje dienos ir nakties sąlygomis. Išaugusios trijų rūšių grybų kolonijos – *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Geotrichum* sp. – identifikuotos šviesiniu mikroskopu (Olympus, x 400) pagal morfologinius požymius (Van der Aa et al., 1998; Lugauskas ir kt., 2002).

Tyrimo pradžia laikyta tuomet, kai mikroskopinio dydžio grybienes fragmentai iš kolonijos krašto steriliai perkeliama ant šviežios PDA terpės ir auginami dar vieną savaitę. Po 7 auginimo dienų buvo išmatuotas šių grybų kolonijų skersmuo mm (1 lentelė: 1, 4, 7, 10 stulpeliai) ir tyrimas tęstas dar 7 paras. Pirmąsias 3 dienas ant *Petri* lėkštelės dangtelių vidinės pusės atitinkamai buvo lašinta po 1 lašą 100 % grynų tikrosios levandos (*Levandula angustifolia*), vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) (linalolio tipas) ir pražangalapės mirtinės (*Melaleuca alternifolia*) eterinių aliejų, po to dar 4 paras leista grybams augti netrukdomai.

Tyrimo pabaigoje įvertintas mikroorganizmų gyvybingumas matuojant milimetrais jų kolonijos augimo greitį (1 lentelė: 2, 5, 8, 11 stulpeliai), apskaičiuojant kolonijų skersmens dydžio skirtumus (1 lentelė: 3, 6, 9, 12 stulpeliai) ir vizualiai įvertint grybienes vešlumą (1–9 pav.).

1 lentelė. Eterinių aliejų efektyvumas

Table 1. The effectiveness of essential oils

Grybų kolonijų augimo stebėjimo pradžia (1, 4, 7, 10), pabaiga (2, 5, 8, 11) ir priaugio skirtumai (mm) (3, 6, 9, 12)												
Grybo rūšis	MAEA*			LAEA*			ThVEA *			Kontrolė*		
	1	2	3	4	5	6*	7	8	9*	10	11	12*
<i>Fusarium</i> sp.	22,0	26,0	+4,0	22,0	26,0	+4,0	22,0	22,0	0,0	20,0	42,0	+22,0
<i>Phoma</i> sp.	33,0	33,0	0,0	33,0	33,0	0,0	33,0	33,0	0,0	33,0	70,0	+37,0
<i>Geotrichum</i> sp.	25,0	26,0	+1,0	26,0	30,0	+4,0	25,0	26,0	+1,0	25,0	68,0	+43,0

*Pastaba:

MAEA – pražangalapės mirtinės (*Melaleuca alternifolia*) eterinis aliejus.

LAEA – tikrosios levandos (*Levandula angustifolia*) eterinis aliejus.

ThVEA – vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) eterinis aliejus.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Odos dermatitą gali sukelti daugelis faktorių. Šių ligų progresavimui didelės reikšmės turi sumažėjęs organizmo atsparumas žmogaus gyvenamojoje aplinkoje esantiems mikroorganizmams. Pažeistoje odoje jų galima beveik visuomet aptikti. Tačiau mikroskopinių grybų rūšis dėl jų polimorfiškumo nustatyti nėra paprasta: būtina kultūras išauginti *in vitro* ir jas identifikuoti pasitelkiant arba klasikinius (morfologinius) arba molekulinius metodus (PGR – polimerazės grandininės reakcijos). Turint galvoje, kad odos ligų gydymas yra ilgas procesas, patogeno rūšies identifikavimo metodas praktiškai galėtų būti taikomas visuomet. Pvz., atlikus tyrimą grybo rūšinė priklausomybė morfologiniu metodu buvo nustatyta po penkių dienų, o reakcija į eterinį aliejų buvo aiškiai matoma po savaitės (1–9 pav.).



1 pav. *Fusarium* sp.

Kairėje – paveiktas *Lavandula angustifolia* eteriniu aliejumi, dešinėje – kontrolė



2 pav. *Fusarium* sp.

Kairėje – paveiktas *Thymus vulgaris* eteriniu aliejumi, dešinėje – kontrolė



3 pav. *Fusarium* sp.

Kairėje – paveiktas *Melaleuca alternifolia* eteriniu aliejumi, dešinėje – kontrolė



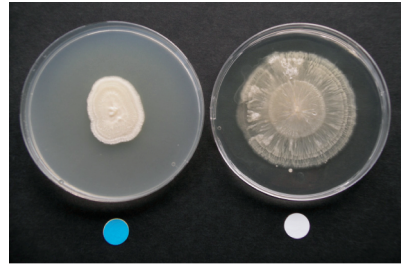
4 pav. *Geotrichum* sp.

Kairėje – paveiktas *Thymus vulgaris* eteriniu aliejumi, dešinėje – kontrolė



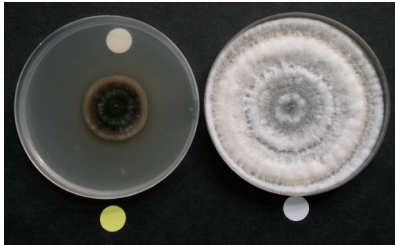
5 pav. *Geotrichum* sp.

Kairėje – paveiktas *Melaleuca alternifolia* eteriniu aliejumi, dešinėje – kontrolė



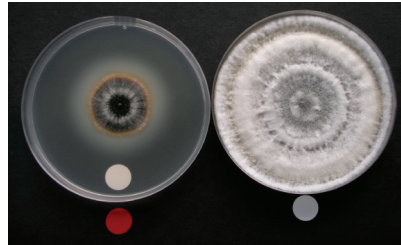
6 pav. *Geotrichum* sp.

Kairėje – paveiktas *Lavandula angustifolia* eteriniu aliejumi, dešinėje – kontrolė



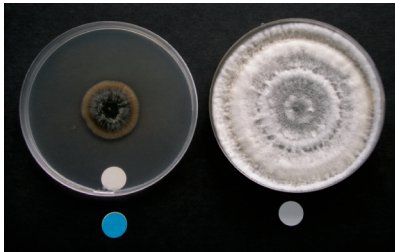
7 pav. *Phoma* sp.

Kairėje – paveiktas *Melaleuca alternifolia* eteriniu aliejumi, dešinėje – kontrolė



8 pav. *Phoma* sp.

Kairėje – paveiktas *Thymus vulgaris* eteriniu aliejumi, dešinėje – kontrolė



9 pav. *Phoma* sp.

Kairėje – paveiktas *Lavandula angustifolia* eteriniu aliejumi, dešinėje – kontrolė

Odos pasėlių kultūrose išaugintų mikroskopinių *Geotrichum* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp. jautrumas buvo patikrintas su trimis eteriniais aliejais, kurių sudėtyje vyraavo monoterpenų grupės dariniai. Iš gausybės sąrašo parinkti šiuo metu Lietuvoje mėgėjų plačiai reklamuojami eteriniai aliejai: *Lavandula angustifolia*, kliniškai patvirtintas *Melaleuca alternifolia* ir mažai žinomas – *Thymus vulgaris*

(linalolio tipas). Nustatyta, kad jautriausias tirtoms medžiagoms buvo *Phoma* sp., nes visų trijų rūšių – tikrosios levandos, vaistinio čiobrelio ir pražangalapės mirtenės – eteriniai aliejai šį grybą veikė fungistatiškai (7–9 pav.). Nepaveiktas eteriniais aliejais *Phoma* sp. kolonijos augimo greitis buvo didelis: kontroliniame variante po 7 dienų kolonijos skersmuo padidėjo daugiau nei dvigubai ir nuo bandymo pradžios užaugo 70 mm (1 lentelė).

Kitos dvi grybų rūšys – *Fusarium* sp. ir *Geotrichum* sp. buvo nežymiai atsparesnės. Slopinamasis kolonijų augimo efektas buvo pastebėtas pražangalapės mirtenės ir tikrosios levandos eteriniais aliejais paveiktose *Petri* lėkštelėse, tačiau šių grybų kolonijų augimą sustabdė vaistinio čiobrelio aliejus (2, 4 pav.). Pastarąjį dėl švelnumo ir antimikrobinio poveikio specialistai jau rekomenduoja aknei gydyti, tačiau jis galėtų būti vartojamas daug plačiau kaip gera antiseptinė priemonė ir kitoms odos problemoms spręsti.

Fitoaromaterapinės – kaip alternatyvios gydymo – priemonės galėtų būti plačiau naudojamos odos susirgimams gydyti, tačiau, siekiant šiuos metodus įdiegti į klinikinę praktiką, būtina atlikti daugiau įrodymais pagrįstų klinikinių tyrimų.

IŠVADOS

1. Tyrimas, skirtas dermatofitų rūšinės sudėties identifikavimui ir saugaus sunaikinimo paieškoms, parodė, kad ne visi antibakteriniai ir visuotinai pripažinti veiksmingais eteriniai aliejai veikia odos patogeninius grybus.

2. Visi tirtieji aliejai pasižymėjo slopinamuoju poveikiu išskirtiems mikroorganizmams, tačiau efektyviausiai kolonijų augimą stabdė vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) linalolio tipo, o silpniausiai – tikrosios levandos (*Levandula angustifolia*) eterinis aliejus.

3. Fitoaromaterapijos, kaip alternatyvaus odos ligų gydymo metodo, sėkmė priklauso nuo moksliškai pagrįstų tyrimų, įrodančių eterinio aliejaus tinkamumą konkrečiai patogeno rūšiai naikinti.

LITERATŪRA

- BAUMAN, L. 2009. *Cosmetic Dermatology*. New York, 357 p. ISBN-13: 978-0071490627.
- BLACKWELL, R.; SMITH, M. 1995. Aromatograms. *International Journal of Aromatherapy*. Vol. 7 (1), p. 22–27.
- BELAICHE, P. 1979. Laromatogramme. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. T 1. Paris, 204 p. ISBN: 2-224-00520-2.
- BUCKLE, J. 2003. *Clinical Aromatherapy*. London, 405 p. ISBN-13: 978-0443072369.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. 1992. *Medical mycology*. Philadelphia and London, 435 p. ISBN-13: 978-0812114638.
- LUGAUSKAS, A.; PAŠKEVIČIUS, A.; REPEČKIENĖ, J. 2002. *Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje*. Vilnius, 434 p.
- SCHNAUBELT, K. 2012. *Naujoji aromaterapija*. Vilnius, 177 p. ISBN 978-609-95452-0-2.
- TAMPIERI, M. P.; GALUPPI, R.; MACCHIONI, F.; CARELLE, M. S.; FALCIONI, L.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. 2005. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*, Vol. 159, p. 339–345.
- VANDERAA, H. A.; APTROOT, A.; BOEKHOUT, T.; DE COCK, A. W. A.; GAMS, M. W.; HOEKSTRA, E. S.; DE HOOG, G. S.; SAMSON, R. A.; SMITH, M. T.; STALPERS, J. A.; TAN, C. S.; VERKEY, G. J. M. 1998. *CBS Course of Mycology*. The Netherlands: CBS Baarn. 164 p. ISBN- 90: 70351-36-6.
- SOLANKI, R. 2011. Treatment of skin diseases through medicinal plants in different regions of the world. *International Journal of Bomedicinal Research*. Vol. 2 (1), p. 73–78.

MICROBIOTA OF SKIN AND STUDY OF ITS RESISTANCE *IN VITRO*

S u m m a r y

This study investigated the impact of the essential oils *Levandula angustifolia*, *Thymus vulgaris* and *Melaleuca alternifolia in vitro* on the microscopic fungi *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp. isolated from the human skin. The most efficient of all three studied oils on species of fungi were thyme (*Thymus vulgaris*), and the least was lavender (*Levandula angustifolia*) essential oil. *Fusarium* sp. and *Geotrichum* sp. were not very sensitive to pharmacologically recognized fungicides in *Melaleuca alternifolia* oil. The study showed that different species of dermatophytes are specifically sensitive to particular oils that they come into contact with.

Key words: dermatophytes, *Levandula angustifolia*, *Thymus vulgaris*, *Melaleuca alternifolia*, essential oils, *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp.