

**Кандибей Н.В., Мозуль В.І., Денисенко О.М.,
Головкін В.В., Шкопинська Т.Є., Головкін Віт.В., Мартиненко Є.Є.**

Запорізький державний медичний університет

ПрАТ Фармацевтична фабрика «Віола»

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТУ ДЕРЕВІЮ ЧОРНОМОРСЬКОГО (ACHILLEA EUXINA KLOK.)

У сучасній медицині велика увага приділяється пошуку нових джерел природних біологічно активних речовин та створенню на їх основі лікарських препаратів. Розширення асортименту лікарських засобів та сировинної бази лікарських рослин антимікробної і протизапальної дії є однією з актуальних проблем фармації.

Значну зацікавленість представляє деревій чорноморський (*Achillea euxina* Klok.) родини Asteraceae, який широко застосовується в народній медицині, має значну сировинну базу, але досліджений недостатньо, тому його вивчення є актуальним.

Деревій чорноморський - багаторічна темно-зелена рослина родини айстрових з повзучим кореневищем, помітно, але не густо опушена. Стебла поодинокі 30-70 см заввишки, прості, лише з вкороченими пазушними гілочками, разом з листками негусто-притиснуто-повстисті; листки в обрисі лінійні чи вузько-довгасто-еліптичні, прикореневі і нижні стеблові листки з перистороздільними сегментами, які у живих рослинах стоять майже перпендикулярно до стрижня листка, кінцеві частини листків широколанцетні або трикутні, короткі, але здебільшого відносно широкі, закінчуються дуже коротким мозолистим вістрям; верхня частина листка вкрита крапчасто-ямчастими залозками. Обгортки яйцевидні; язички крайових квіток білі, рідше трохи рожеві, майже овальні [2].

Види роду деревій знаходять широке застосування в народній медицині як кровоспинний засіб при легеневих, кишкових, гемороїдальних і носових кровотечах, запальних захворюваннях сечостатевої системи та шлунково-

кишкового тракту. Рослина також знайшла широке застосування в якості противоконвульсивного, апетитного, потогінного засобу та для лікування різних порушень обміну речовин [2, 3].

Галенові препарати видів роду деревій мають спазмолітичну дію на гладку мускулатуру кишківника, жовчовивідних і сечовивідних шляхів, підвищують діурез, розширюють жовчні протоки і посилюють жовчовиділення в дванадцятипалу кишку, посилюють секрецію шлункового соку. Бактерицидна, протизапальна, ранозагоювальна і антиалергічна дія препаратів деревію пов'язана з вмістом в ньому дубильних речовин і ефірної олії, що містить хамазулен [4].

Водно-спиртовий екстракт *Achillea millefolium* L. викликає сильну антибактеріальну дію на *Staphylococcus aureus* [7].

Раніше проведені нами дослідження хімічного складу хромато-мас-спектрометричним методом виявили у траві деревію чорноморського сесквітерпенові сполуки: хамазулен (5,18%), β -бісаболен (3,79%), 1,6-гермакрасієн-5-ол (3,11%), ізоаромадендронепоксид (2,19%), 3,6-дигідрохамазулен (1,5%), що дає підстави для його подальшого вивчення [5].

Метою даної роботи стало дослідження протимікробної дії екстракту деревію чорноморського (*Achillea euxina* Klok.).

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження була трава деревію чорноморського (*Achillea euxina* Klok.), зібрана у фазу цвітіння на території Запорізької області. Траву сушили в сушильній шафі при температурі 40°C і подрібнювали до діаметру частинок менше 0,5 мм. Подрібнену траву екстрагували 70% спиртом етиловим у співвідношенні сировина/екстрагент 1:10 з урахуванням коефіцієнта водопоглинання при температурі 100 °C на водяній бані при безперервному помішуванні. Екстракцію повторювали тричі. Витяг фільтрували в конічну колбу. Тривалість екстракції 25-30 хвилин. Очищений екстракт випарювали в вакуум-випарних установках при температурі 50-60°C до певної щільності.

Густий екстракт зберігали в герметично закритій тарі. Вихід готового екстракту трави полину чорноморського 8%.

Вивчення антимікробної активності екстракту здійснювали на базі мікробіологічної лабораторії ПрАТ Фармацевтична фабрика «Віола» відповідно до затвердженої нормативної документації [1, 6]. Під час дослідження із вихідного екстракту готували ряд дворазових серійних розведень (від 1:2 до 1:512) в соєво-казеїновому бульйоні (СКБ) об'ємом 1 мл, потім додавали у кожен пробір по 0,1 мл мікробної зависі (мікробне навантаження до музейних штамів становило 10^6 м.к./мл). Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) визначали за відсутністю видимого росту у пробірці з мінімальним розведенням досліджуваного зразка. Мінімальну бактерицидну/фунгіцидну концентрацію (МБ_цК/МФ_цК) – за відсутності росту на агарі після висіву із прозорих пробірок. Кожен дослід супроводжували контролем росту використовуваних тест-штамів та досліджуваного зразка екстракту. Додатково проводили контроль поживних середовищ з використанням загальноприйнятих фармакопейних методик [1]. Для первинного скринінгового дослідження використовували еталонні тест-культури виробництва фірми «Microbiologics» (США) від постачальника ТОВ «Юнілаб». Була досліджена антимікробна активність експериментального зразка екстракту деревію чорноморського на грампозитивних бактеріях (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), грамнегативних бактеріях (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) та дріжджах (*Candida albicans*).

При проведенні випробувань використовували живильні середовища відповідно до вимог ДФУ 2.0.

Поживні середовища відповідали за ростовими, інгібіторними, індикативними властивостями та витримували випробування на стерильність відповідно до вимог ДФУ 2.0 2. Перелік та характеристика живильних середовищ наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

*Перелік поживних середовищ,
що використовувались при аналізі, та їх призначення*

Назва живильного середовища (ПС)	Призначення
Буферний розчин з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0 (БПР)	Підготовка тест-штамів бактерій цільового використання; приготування необхідних розведень.
Соево-казеїновий агар (СКА)	Визначення загальної кількості аеробних мікроорганізмів
Соево-казеїновий бульйон (СКБ)	Підготовка тест-штамів бактерій цільового використання. Приготування випробовуваного зразка при аналізі на антимікробну активність.

При проведенні випробування використовували тест-мікроорганізми відповідно до вимог ДФУ 2.0. Зберігання мікроорганізмів здійснювали відповідно до «Порядку одержання, обліку, зберігання та утримання тест-мікроорганізмів для проведення контролю якості лікарських засобів за мікробіологічними показниками».

Таблиця 2

Перелік тест-штамів мікроорганізмів та їх призначення

Назва тест-мікроорганізму	Номер штаму	Призначення
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Перевірка антимікробної дії екстракту деревію чорноморського
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 16404	

Номер штаму вказує на те, що дана культура є еталоном при дослідженні лікарських засобів на фармацевтичному виробництві.

Для проведення випробування готували культури тест-мікроорганізмів відповідно до вимог ДФУ 2.0 (2.6.12, 2.6.13). Тест-мікроорганізми вирощували кожен окремо на відповідному живильному середовищі. Тест-штами бактерій та дріжджів вирощували на соєво-казеїновому бульйоні (СКБ) при температурі 30-35 °C протягом 18-24 год.

Методи ідентифікації мікроорганізмів

Для ідентифікації мікроорганізмів використовували методи та рекомендації, які наведені в ДФУ 2.0.

При визначенні загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів і дріжджових грибів висновки робили по культуральним властивостям кожного з тест-мікроорганізмів на відповідних щільних живильних середовищах.

Визначення антимікробної дії

Перед початком дослідження було визначено мікробіологічну чистоту даних препаратів глибинним методом. Результати показали, що досліджувані матеріали відповідають вимогам мікробіологічної чистоти.

Під час дослідження із вихідного матеріалу готували ряд подвійних серійних розведень (від 1:2 до 1:512) в соєво-казеїновому бульйоні (СКБ), потім додавали у кожную пробірку по 0,1 мл мікробної зависі (мікробне навантаження до музейних штамів становило 10^6 м.к./мл).

Контроль середовища, а також досліджуваних зразків, не мав росту.

При вивченні впливу на тест-штами досліджуваного матеріалу, пересіяного на щільне поживне середовище, було визначено, що нативний екстракт мав бактерицидну дію на всі досліджувані тест-штами, окрім *St. aureus*, а у другому розведенні – бактеріостатичну дію на *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli*.

Результатом дослідження експериментального зразка деревію екстракту є отримані дані, що зразок повністю пригнічує ріст *B. Subtilis*, *Ps. aeruginosa*, *C.*

albicans, *E. Coli* та має бактеріостатичну дію на *St. aureus* у співвідношенні 1:10 і на *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli* у співвідношенні 1:100.

Таблиця 3

*Показники росту культур в досліджуваних варіантах на СКА
при відповідному розведенні зразка деревію чорноморського екстракту*

Тест культура микроорганизмів	№ пробірки та розведення										Ріст культур у контрольних варіантах		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
	1*	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	+К	Кс -а.	К зр
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	в/р	б/с	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	в/р	в/р
<i>St. aureus</i> ATCC 6538	б/с	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р		
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 9027	в/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р		
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	в/р	б/с	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р		
<i>E. coli</i> ATCC 8739	в/р	б/с	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р	н/р		

Примітки :

- 1)* - нативний екстракт;
- 2) в/р – відсутність видимого росту;
- 3) н/р - наявність росту;
- 4) б/с – бактеріостатична дія препарату.

Висновки

Експериментальні зразки екстракту деревію чорноморського мають схожий вплив на використовувані тест-штами. Нативний препарат має бактерицидну дію на більшість досліджуваних штамів, окрім *St. aureus*, та має високу бактеріостатичну дію, що дозволяє етнофармакологічне використання рослин цього роду і ставить *Achillea euxina* Klok. на один рівень із визнаним *Achillea millefolium* та робить його дуже цінним та доступним джерелом для дослідження та використання.

Література:

1. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т.1. – с. 251-269, с. 310-314.
2. Компендиум [Електронний ресурс] //– Режим доступу до ресурсу:<http://compendium.com.ua/atc>.
3. Лебеда А.Ф. Лекарственные растения: Самая полная энциклопедия/ А.Ф. Лебеда, Н.И. Джуренко, А.П. Исайкина, В.Г Собко. - М.: АСТПРЕСС КНИГА, - 2006. – 912 с.
4. Лекарственные растения [Електронний ресурс] // Режим доступу до ресурсу:<http://fitopedia.com.ua/rastenia-tisyachelistnik-vidi.html>
5. Мозуль В.И., Денисенко О.Н., Карпун Е.А. Летучие компоненты *Achillea euxina* Kok. - Materials of the XVI International scientific and practical conference. Modern european science– 2020, June 30 – July 7, 2020: Sheffield, England.-С.3-10.
6. Наказ МОЗ України від 14 січня 2004 року № 5 «Про затвердження Порядку одержання, обліку, зберігання та утримання тест-штамів мікроорганізмів для проведення контролю якості лікарських засобів за мікробіологічними показниками» (зі змінами).
7. Grigore A, Colceru-Mihul S, Bazdoaca C, Yuksel R, Ionita C, Glava L. Antimicrobial Activity of an *Achillea millefolium* L. *Proceedings*. 2020; 57(1): 34. <https://doi.org/10.3390/proceedings2020057034>