

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗРІДЖЕНОГАЗОВИХ ЕКСТРАКТІВ ІЗ ТРАВИ ПІДМАРЕННИКА СПРАВЖНЬОГО

А.В. Проскочило, В.Г. Дем'яненко, Є.М. Бабич, Н.І. Скляр

Національний фармацевтичний університет (Харків)

ДУ «Інститут мікробіології та імунології
імені І.І. Мечникова НАМН України» (Харків)

Вступ

Рід Підмаренник (*Galium L.*) відноситься до родини Маренові (*Rubiaceae*). В останні десятиліття, підмаренник справжній (*Galium verum L.*) привертає увагу дослідників різних країн у якості джерела біологічно-активних речовин (БАР) [6, 16, 17]. Передумовою такої уваги було широке застосування вказаної рослини у народній медицині та в гомеопатії. Відомості про застосування підмаренника справжнього у лікуванні захворювань, викликаних мікробною природою, представляють значний практичний інтерес для сучасної фармацевтичної науки в напрямку пошуку нових БАР, які володіють протимікробною активністю.

Вивченню антибактеріальної та протигрибкової дії екстрактів підмаренника справжнього присвячено роботи [5-7, 9, 10, 12, 13, 15-17, 19]. Під час критичного аналізу цих джерел було встановлено, що їхні дані містять суперечливі та неоднозначні відомості.

Першим, доступним літературним джерелом, яке присвячене дослідженню етанольного екстракту із трави підмаренника справжнього проти штамів *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 8739, *E. faecalis* ATCC 29212, *K. pneumoniae* ATCC 4352, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. mirabilis* ATCC 14153, *S. aureus* ATCC 6538 та *S. epidermidis* ATCC 12228 є [15]. Методами дифузії в агар та серійних розведень була встановлена антимікробна активність вказаного екстракту лише проти штаму *B. subtilis* ATCC 6633.

У роботі [13] досліджувався вплив екстрактів, одержаних шляхом послідовної обробки висушеної та подрібненої трави підмаренника справжнього петролейним ефіром та 70% метанолом. Отримані екстракти після упарювання під вакуумом та після відповідної підготовки були випробувані проти штамів *S. aureus* ATCC 25923 та

ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, SY 252 та SY 252 uvrA, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *S. cerevisiae* ATCC 9763 із застосуванням диск-дифузійного методу. Дані дослідження показали слабку бактеріостатичну активність обох екстрактів тільки проти *P. aeruginosa*.

У статті [17] показано дослідження екстракту трави підмаренника справжнього, одержаного двократною екстракцією 70% етанолом, з подальшим упарюванням, та розведенням упареного залишку водою та спиртоводними сумішами 60, 80 та 95% концентрацій. Було встановлено, що 60% екстракт володіє вираженою бактеріостатичною активністю проти *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* Migula та *P. mirabilis*.

Дослідники [12] вивчали вплив 1,3-дигідрокси-2-метилантрахінону, одержаного шляхом екстракції трави підмаренника справжнього 95% етанолом, з подальшим упарюванням одержаного екстракту. Після упарювання екстракт розводили водою та послідовно розділяли петролейним ефіром, хлороформом і н-бутанолом. Хлороформний витяг розподілявся на хроматографічній колонці. Фракцію 1,3-дигідрокси-2-метилантрахінону розчиняли в ДМСО для одержання концентрації 0,2 мг/мл. Диск-дифузійним методом була встановлена помірна активність 1,3-дигідрокси-2-метилантрахінону проти *E. coli*, *Salmonella aureus*, *P. aeruginosa* та *Salmonella typhimurium*.

У роботі [6] вивчалися антимікробні властивості водного та спиртових екстрактів, а також хлороформні та етилацетатні фракції, одержані із трави підмаренника справжнього. Методом дифузії в агар (метод «колодязів») Було встановлено, що ліпофільні фракції суттєво пригнічують (хоча і різною мірою) ріст та накопичення використаних тест-штамів мікроорганізмів. Так, ліпофільні компоненти підмаренника справжнього демонстрували достатньо високу активність по відношенню до *S. aureus* 25923, *P. aeruginosa* 27853 та *B. subtilis* 6633. Середню та порівняно слабку активність ці фракції проявляли по відношенню до *P. vulgaris* 4636, *C. albicans* 885-663. Етилацетатні витяги мали середню активність по відношенню до *C. albicans* 885-663. Спиртові витяги чинили слабку протимікробну дію щодо *C. albicans* 885-663. Водні екстракти протимікробною дією не володіли.

Продовженням антимікробних досліджень хлороформного та етилацетатного екстрактів підмаренника справжнього стосовно *S. aureus* ATCC 25923 та 40 клінічних ізолятів стафілококів з різним рівнем антибіотикорезистентності від пацієнтів з захворюваннями

верхніх дихальних шляхів можна вважати статтю [7]. Методом дифузії в агар було встановлено порівняно високу чутливість музейного штаму *S. aureus* ATCC 25923 до дії вказаних екстрактів. Разом із тим, проти клінічних штамів ці екстракти проявили неоднозначний і порівняно низький рівень активності.

У той же час, не можна оминати увагою роботу [19], в якій протигрибкову активність хлороформного та метанольного екстракту трави підмаренника справжнього вивчали диск-дифузійним методом проти 99 патогенних клінічних ізолятів, що належали до 35 *S. albicans*, 33 *S. tropicalis* та 31 *S. glabrata* зразків штамів та стандартних штамів *Candida spp.* (*S. albicans* ATCC 10231, *S. glabrata* ATCC 80030 та *S. tropicalis* ATCC 22019). Ні хлороформний, ні метанольний екстракти не проявляли протигрибкових властивостей.

Пізніше, автори [5] досліджували формування резистентності бактерій та грибів до ліпофільних фракцій трави підмаренника справжнього. У результатах показано, що при багаторазових пересівах штамів грампозитивних, грамнегативних мікроорганізмів та грибів роду *Candida* на середовищах, що містили зростаючі концентрації ліпофільних фракцій трави підмаренника справжнього, було встановлено повільне формування резистентності *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *S. albicans* ATCC 885-653 у порівнянні з референс-препаратами.

Дослідження антимікробної активності етанольного, ацетонового та ефірного екстрактів описані в роботі [16]. Було встановлено, що до вказаних екстрактів найбільш чутливими штамми були *S. epidermis*, *S. aureus*, *Shigella ssp.* та *Escherichia coli*, найбільш стійким штамом виявився *S. albicans*.

Останніми роботами, присвяченими дослідженню протигрибкової активності хлороформного та етилацетатного екстрактів підмаренника справжнього проти штамів *S. albicans* ATCC 885-653, *S. parapsilosis* 488/10, *S. yamata* (*Debariomyces hansenii*) 40 b/3, *S. rugosa* Скляр 27, *S. tropicalis* F-195, *S. tropicalis* 195, *S. utilis* (*Pichajadinii*) CCTM 991, *S. intermedia* Y-59, *S. intermedia* ATCC 14439 та *S. glabrata* 1712 є [9, 10]. У них показано кореляцію між вмістом БАР у етилацетатній та хлороформній фракціях підмаренників справжнього та рівнем їх протигрибкової активності.

Наведені факти підтверджують антибактеріальну та противандидну активність екстрактів трави підмаренника справжнього, отриманих за допомогою класичних екстракційних методів.

При обробці лікарської рослинної сировини зрідженими газами, у залежності від параметрів процесу та природи газу (фреони, вуглекислота, пропан-бутанові суміші тощо) можливо отримувати екстракти різноманітного якісного та кількісного складу, при значному скороченні тривалості процесу та ряду інших переваг.

Нами було одержано ліпофільні комплекси із трави підмаренника справжнього (ЛКТП) екстракцією зрідженим дифторхлорметаном [8], тому вивчення їхньої антимікробної активності є актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана згідно із планом науково-дослідних робіт (НДР) Національного фармацевтичного університету (м. Харків) та є фрагментом теми НДР «Створення складу і технології одержання біологічно-активних речовин та лікарських засобів природного походження» (№ державної реєстрації 0103U000477).

Мета – вивчення антимікробної активності зрідженогазових екстрактів трави підмаренника справжнього.

Матеріал та методи дослідження

Мікробіологічним дослідженням підлягали такі зразки: А - дифторхлорметановий екстракт із трави підмаренника справжнього 2010 р. збору, В - дифторхлорметановий витяг екстракт із трави підмаренника справжнього 2009 р. збору.

Зразки для забезпечення належних технологічних властивостей та зручності дозування розвели з лактозою, мікробну контамінацію якої також було досліджено.

Еталонними тест-культурами були референс-штами мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538 P, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 6783, *S. albicans* ATCC 885-653, а також циркулюючі клінічні ізоляти *S. aureus* (n=4), *E. faecalis* (n=2) та *S. albicans* (n=2), вилучені при гнійно-запальних захворюваннях сечостатевої системи та верхніх дихальних шляхів.

Випробування мікробіологічної чистоти досліджуваних зразків а також контроль ростових властивостей живильних середовищ проводились згідно із ДФУ, pp.2.6, 2.6.12 та 2.6.13 [4].

Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин проводили за допомогою електронного приладу *Densi-La-Meter* (PLIVA-Lachema, Чехія) за шкалою *McFarland* згідно з інструкцією до приладу та нормативним документом [11]. Синхронізацію культур перед

проведенням дослідів досягали одноразовим впливом низької температури (+4 °C) впродовж 30 хв [1].

Визначення протимікробної активності зразків проводили методами дифузії в агар, серійних розведень у рідкому та твердому живильних середовищах згідно з методичними рекомендаціями [2] і ДФУ, р. 2.7, 2.7.2.1 [3].

Отримані результати та обговорення

Результати визначення мікробіологічної чистоти екстрактів підмаренника справжнього, одержаних зрідженим дифторхлорметаном, а також лактози, наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Мікробіологічна чистота досліджуваних зразків та допоміжних речовин

Назва зразка	Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів (КУО*/г)	Загальне число пліснявих та дріжджових грибів (КУО/г)	Наявність ентеробактерій, у т.ч. кишкової палички в 1 г зразка
Зразок А	10 ³	0	Не виявлено
Зразок В	2·10 ⁴	0	Не виявлено
Лактоза 80 mesh	0	0	Не виявлено

Як видно з одержаних даних, зразки А та В за мікробіологічною чистотою належали до категорії «В» згідно з ДФУ, р. 5.1.4 [4]. Загальне число аеробних мікроорганізмів у зразку В можна пояснити його тривалим та неощадливим зберіганням (більше одного року при кімнатній температурі до моменту проведення випробування).

З іншого боку, позитивним є факт повної відсутності грибів та ентеробактерій у досліджуваних зразках, що може вказувати на бактерицидну дію зрідженого дифторхлорметану, як екстрагенту, а також на активність екстракту відносно вказаних мікроорганізмів.

Експериментальні дані стосовно антимікробної активності досліджуваних зразків показано у таблиці 2.

Враховуючи обставину, що зразок В мав майже у 4,5 рази меншу протистафілококову активність ніж у зразку А, і не проявив протикандидної активності, у подальшому мінімальні інгібуючі та бактерицидні концентрації (МІК та МБК) досліджували лише для зразку А, результати яких показано у таблиці 3.

Таблиця 2

Результати якісного визначення антимікробної дії зразків ЛКТП

Назва зразку	Межі досліджених концентрацій (мг/мл)	Наявність / відсутність протимікробної активності до тест-штамів								
		Золотисті стафілококи (n=6)				Ентерококи (n=3)		Кандиди (n=3)		
		S.aureus ATCC 25923	S.aureus ATCC 6538 P (209-P)	Клінічні штами (n=4)	E.faecalis ATCC 6783	Циркулюючі штами (n=2)	C.albicans ATCC 885-653	Циркулюючі штами (n=2)	E.coli ATCC 25922	P.aeruginosa ATCC 27853
Зразок А	24,25 - 0,185	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Зразок В	14,26 - 0,14	+	н/в	н/в	н/в	н/в	-	н/в	-	-

Примітки: + - має антимікробну активність; - - не має антимікробну активність; н/в - не визначали.

Таблиця 3

Результати кількісного визначення антимікробної дії зразків ЛКТП

Назва зразку	Межі протимікробних концентрацій (мг/мл) досліджених зразків стосовно тест-штамів												
	Золотисті стафілококи (n=6)				Ентерококи (n=3)				Кандиди (n=3)				
	S.aureus ATCC 25923	S.aureus ATCC 6538 P (209-P)	Циркулюючі штами (n=4)	E.faecalis ATCC 6783	Циркулюючі штами (n=2)	C.albicans ATCC 885-653	Циркулюючі штами (n=2)	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК
Зразок А	0,75-1,5	3,03-6,06	3,03-6,06	6,06-12,12	1,5	6,06	1,5-6,06	6,06	6,06	6,06	24,25	12,125-24,25	**
Зразок В	7,13	**	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	-	-	н/в	н/в

Примітки: ** - у межах концентрацій для даного методу не виявлено; н/в - не визначали; - - не володіє протимікробною активністю.

Як видно із даних таблиці 3, ЛКТП, одержаний шляхом екстракції зрідженим дифторхлорметаном трави підмаренника справжнього, заготовленої у 2010 році, виявив протистафілококову, протиентерококову та антикандидну активність. Рівень антимікробної дії ЛКТП стосовно музейних штамів *S. aureus* та *C. albicans* схожий із даними робіт [6, 9, 10], однак вплив на циркулюючі штами вказує на суттєву відмінність у складі хлороформних та етилацетатних витягів і ЛКТП.

Більше того, схожі між собою рівні МК та МБК відносно штамів *E. faecalis* вказують на перспективність ЛКТП, у якості нового протиентерококового лікарського засобу та створюють передумову для його подальших досліджень, враховуючи сучасні проблеми вірулентності та резистентності умовно патогенних мікроорганізмів [14, 18].

Висновки

1. Проведено дослідження мікробіологічної чистоти, антимікробної та протигрибкової активності екстрактів із трави підмаренника справжнього, одержаних із використанням зрідженого дифторхлорметану.

2. Встановлено, що екстракти за показником загального числа аеробів відповідали вимогами ДФУ. Гриби та ентеробактерії не були знайдені в жодному зі зразків.

3. Виявлено перспективний напрямок застосування ліпофільного комплексу із трави підмаренника справжнього у лікуванні гнійно-запальних захворювань сечостатевої системи, викликаних *E. faecalis*.

Література

1. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И.А. Баснакьян. – М.: Медицина, 1992. – С. 29-59.
2. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: метод. реком. / Ю.Л. Волянський, І.С. Гриценко, В.П. Широбоков [та ін.]. – К., 2004. – 40 с.
3. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – [1-е вид.] – Харків: PIPEГ, 2001. – 556 с.
4. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – [1-е вид., Доповнення 4] – Харків: Держ. п-во «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. – 540 с.
5. Дослідження формування резистентності мікроорганізмів та грибів до ліпофільних фракцій представників роду *Galium* L. / Н.В. Каптур, А.Ю. Волянський, О.В. Горяча [та ін.] // *Аннали Мечниковського інституту*. – 2011. – № 3. – С. 27-34.

6. Каптур Н.В. Визначення антибактеріальної дії біологічно активних речовин підмаренника справжнього (*Galium verum* L.) / Н.В. Каптур // *Медицина сьогодні і завтра*. – 2011. – № 3 (52). – С. 63-65.

7. Каптур Н.В. Протимікробна активність екстрактів представників роду *Artemisia* і роду *Galium* відносно стафілококів з різним рівнем метицилінорезистентності / Н.В. Каптур // *Медицина сьогодні і завтра*. – 2010. – № 4 (49). – С. 40-43.

8. Патент 75923 Україна. А61К36/74, А61К135/00. Спосіб одержання екстракту із трави підмаренника справжнього / Проскочило А.В., Дем'яненко В.Г., Дем'яненко Д.В.; заявл. 12.02.2012; опубл. 25.12.2012, бюл. № 24.

9. Протигрибкова активність ліпофільних фракцій рослин роду *Galium*. Повідомлення 1 / Н.В. Каптур, О.В. Горяча, Т.В. Ільїна [та ін.] // *Клінічна фармація*. – 2011. – Т. 15, № 4. – С. 50-53.

10. Протигрибкова активність ліпофільних фракцій рослин роду *Galium*. Повідомлення 2. / Н.В. Каптур, О.В. Горяча, Т.В. Ільїна [та ін.] // *Клінічна фармація*. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 48-51.

11. Стандартизація приготування мікробних суспензій : Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006. – Київ: Укрмедпатентінформ, 2006. – 10 с.

12. A new anthraquinone from *Galium verum* L / C-C. Zhao, J-H. Shao, X. Li [et al.] // *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. – 2006. – Vol.20, № 11. – P. 981-984.

13. Antimicrobial activities of *Galium* species / F. Ergun, D. Deliorman, A. Veliolgu [et al.] // *J. Fac.Pharm. Gazi*. – 1999. – Vol. 16. – P. 7-11.

14. High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17) / G. Werner, C. Fleige, B. Ewert [et al.] // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2010. – Vol. 35 (2). – P. 119-125.

15. Introductory study of antimicrobial and antimutagenic activities of *Galium verum* L. (Rubiaceae) / S. Ivanović, B. Vuković-Gačić, T. Kundaković [et al.] // *Int. Cong. and 49th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Erlangen, Germany*. – 2001. – P. 101-102.

16. Kunduhoglu B. Antimicrobial screening of some medicinal plants collected from Eskisehir, Turkey / B. Kunduhoglu; S. Pilatin, F. Caliskan // *Fresenius Environ. Bull.* – 2011. – Vol.20. – P. 945-952.

17. Lu W-H. Study on medicinal herb - *Galium verum* L. - Antibiotic, anti-inflammatory activity, compounds and fingerprint / W-H. Lu, X-M. Yu, Y-L. Ma // *Nat. Prod. Res. Dev.* – 2006. – Vol. 18 (7). – P. 1-8.

18. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium* / H. Billström, B. Lund, Å. Sullivan [et al.] // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2008. – Vol. 32 (5). – P. 374-377.

19. Yiğit D. An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey / D. Yiğit, N. Yiğit, U. Özgen // *Mycoses*. – 2009. – Vol. 52. – P. 135–140.

Резюме

Проскочило А.В., Дем'яненко В.Г., Бабич Є.М., Скляр Н.І. Мікробіологічні дослідження зрідженогазових екстрактів із трави підмаренника справжнього.

Вивчено мікробіологічну чистоту та антимікробну активність екстрактів із трави підмаренника справжнього, одержаних за допомогою зрідженого дифторхлорметану. Досліджувані зразки за мікробною чистотою відповідали вимогам ДФУ щодо рослинних лікарських засобів для орального застосування. Дифторхлорметанові екстракти виявили протистафілококову, протиентерококову та антикандидну активність.

Ключові слова: екстракція, підмаренник справжній (*Galium verum* L.), дифторхлорметан, антимікробна активність.

Резюме

Проскочило А.В., Демьяненко В.Г., Бабич Е.М., Скляр Н.И. Микробиологическое исследование сжиженогазовых экстрактов из травы подмаренника настоящего.

Изучены микробиологическая чистота и антимикробная активность экстрактов из травы подмаренника настоящего, полученных с помощью сжиженного дифторхлорметана. Исследуемые образцы по микробной чистоте отвечали требованиям ГФУ для растительных лекарственных средств для орального применения. Дифторхлорметановые экстракты проявили протистафилококковую, противоэнтерококковую и антикандидную активность.

Ключевые слова: экстракция, подмаренник настоящий (*Galium verum* L.), дифторхлорметан, антимикробная активность.

Summary

Proskochilo A.V., Demianenko V.G., Babych Ye.M., Sklyar N.I. Microbiological study of liquefied gas extracts from *Galium verum* herb.

Microbiological purity and antimicrobial activity of extracts from Lady's Bedstraw (*Galium verum*) herb, obtained with liquefied difluorochloromethane have been studied. Microbial purity of the researched samples conformed to the SPhU requirements stated for non-sterile oral herbal medicines. Difluorochloromethane extracts have showed antistaphylococcal, antienterococcal and anticandidal activities.

Key words: extraction, Lady's Bedstraw (*Galium verum* L.), difluorochloromethane, antimicrobial activity.

Рецензент: д.фарм.н., проф. Д.І. Дмитрієвський

УДК 615.1 : 339.13.017 : 615.225.2

ЕКОНОМІЧНЕ ТА КОМЕРЦІЙНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ДОЦІЛЬНОСТІ ВПРОВАДЖЕННЯ ПРОТИАЛЕРГІЙНОГО ПРЕПАРАТУ ЛЕВОЦЕТИРИЗИНУ

О.С. Самборський, М.М. Слободянюк

*Івано-Франківський національний медичний університет
Національний фармацевтичний університет (Харків)*

Вступ

Останнім часом алергію іменують хворобою цивілізації, вона поширена у всіх країнах світу і має найрізноманітніші форми. Прояви алергійних захворювань (АЗ) спричиняють не лише дискомфорт, але й приводять до постійного стресу, депресії, порушення нормального способу життя. Згідно даних ВООЗ на сьогодні АЗ займають за поширеністю третє місце, а за прогнозами ці хвороби до 2017 рр. посядуть перше місце в структурі захворюваності населення [8, 9]. В Україні поширеність АЗ у різних регіонах коливається від 5,0 до 20,5%. АЗ, їх прояви та ускладнення перейшли у розряд соціально-економічної проблеми, визивають дискомфорт у житті людей [2, 4, 5]. Використання вискоєфективних, якісних, безпечних та економічно доступних лікарських препаратів (ЛП) нових поколінь для профілактики та лікування АЗ є важливою не лише медичною, а й соціальною та економічною проблемою в державі. Особливе місце займає зацікавленість виробників в нововведеннях, яка обумовлюється як привабливістю та перспективністю сегменту товарного ринку, так і його ємністю, прибутковістю продукції, швидкістю окупності інвестицій. В Україні подібні дослідження, особливо комплексні, досі не проводилися. У окремих публікаціях [6, 7] надається методологія та методики таких досліджень.

Вищевикладене обумовлює актуальність комплексних досліджень щодо проведення бізнес-аналізу нововведень у медичну практику нових ЛП на основі економічних та маркетингових методів досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами: робота виконана згідно з планом науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Організація фармацевтичної справи, менеджмент та маркетинг у фармації» (номер державної реєстрації 0103U000479).