

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ СУХОГО ФІТОЕКСТРАКТУ

Олександр Шмалько¹, Наталія Філімонова²,
Світлана Джорасва³, Лілія Вишневська²

¹Чорноморський національний університет імені
Петра Могили, м. Миколаїв, Україна

²Національний фармацевтичний університет, м.
Харків, Україна

³Державна установа «Інститут дерматології та ве-
нерології НАМН України»

Вступ. Хронічні запальні захворювання кишечника (ХЗК) залишаються однією з актуальних проблем гастроентерології. Це обумовлено поширеністю даної патології в усьому світі, тенденцією до збільшення кількості випадків захворювань як серед дорослого населення, так і дітей, модифікацією перебігу, відсутністю чітких уявлень про етіологію та патогенез, тяжкістю і різноманітністю клінічних проявів, часто малоефективним лікуванням [1-3].

Серед запальних захворювань кишечника слід звернути увагу на неспецифічний виразковий коліт (НВК), поширеність якого становить 40–117 хворих на 100 тис населення, піки розповсюдження хвороби припадають на вік від 20 до 40 та після 55 років, а середній вік на момент виникнення хвороби становить 29 років. Питання щодо причини виникнення і механізмів розвитку НВК все ще не визначене. Серед чинників слід зазначити генетичний фактор, порушення проникності кишкового бар'єру, вплив факторів навколишнього середовища, порушення імунної системи та мікробний фактор (бактеріальні та вірусні інфекції) [4, 5].

На сьогодні відомо, що у функціонуванні організму важливу роль відіграє мікробіота людини, від якої залежить забезпечення важливих функцій людського організму [6]. Тому порушення кількісного або якісного складу мікробіоценозу будь-якого біотопу (дисбіоз) часто ускладнює перебіг багатьох захворювань людей різного віку, а ХЗК становлять суттєву частку хронічної патології органів травлення. На даний час особливу увагу в етіогенезі НВК приділяють інфекційним факторам (ентеровіруси, цитомегаловірус, *Clostridioides difficile*, *Escherichia coli*, мікоплазми), а також порушенню нормальної мікробної біоти кишечника [7]. Згідно даних досліджень, у 10 % хворих на НВК при обстеженні виявляються збудники інфекційної патології, які за думкою деяких дослідників сприяють розвитку захворювання. Враховуючи значущу роль в розвитку НВК кишкового дисбіозу, слід зазначити, що у складі зміненої кишкової мікрофлори є мікроорганізми, що володіють здатністю виробляти токсичні продукти, «ферменти агресії» й ушкоджувати клітини кишечника. Останнє обумовлює зростання кількості та розширення спектру потенційно патогенних мікроорганізмів, збільшення їх транслокації через стінку кишечника, що може призводити до виникнення ендогенної інфекції або суперінфекції [8, 9].

За даними наукових досліджень, у пацієнтів із НВК спостерігаються зниження в мікробіомі

кишечнику кількості *Faecalibacterium*, значуще переважання *Proteobacteria* і надлишкова контамінація товстої кишки бактеріями виду *Fusobacterium*, а також *Escherichia coli*. У пацієнтів з ілеоцекальним локалізацією хронічного коліту (ХК) недостатньо представлені такі підвиди, як *Faecalibacterium* і *Roseburia*, при цьому зростає кількість представників родини *Enterobacteriaceae*, зокрема кишкової палички, а також штамів *Ruminococcus gnavus*. Відзначено, що пацієнти з НВК та ХК уразливі до інфекції, асоційованої з *Clostridioides difficile*, яка здатна ще більш ускладнювати перебіг захворювання, вимагає госпіталізації і призводить до підвищення летальності [10-12].

Нами було отримано сухий екстракт із лікарської рослинної сировини (фенхелю і петрушки плоди, нагідок квітки, кропиви листя, грициків, вероніки і хвоща трава, перстачу і омани кореневища, цикорію корені): методом фільтраційної екстракції (екстрагент 20 % етанол; швидкість екстракції – 2-3 мл/хв; співвідношення сировина : екстрагент – 1 : 10) та подальшим висушуванням у вакуум-сушильній шафі за температури (50–60) °С. Методом тонкошарової хроматографії, в порівнянні з речовинами маркерами, доведено наявність у багатокомпонентному рідкому екстракті кислот поліфенольної природи, схожих за будовою з хлорогеновою кислотою; речовин флавоноїдної будови, схожих за будовою з лютеоліном; речовин, схожих за будовою з дубильними речовинами (катехін) і полісахаридами (фруктоза). Розроблено методики для визначення кількісного вмісту речовин поліфенольної будови, у перерахунку на галову кислоту; речовин флавоноїдної будови, у перерахунку на лютеолін; вміст фенольних сполук, у перерахунку на пірогалол – спектрофотометричним методом [13, 14].

Метою роботи було дослідження протимікробної активності тест-зразка сухого фітоекстракту методом кратних серійних розведень та його мікробіологічної чистоти.

Матеріали та методи. У дослідженнях антимікробної активності екстракту використовували тест-культури *S. aureus* – ATCC-25923, *E. coli* – ATCC-25922, *P. aeruginosa* – ATCC-27853, *Klebsiella pneumoniae* – NCTC 5055. Протигрибкову дію екстракту вивчали на референтному штамі *C. albicans* ATCC 885-653. Зазначений набір тест-штамів є загальноприйнятим при первинному визначенні протимікробної дії фітоекстракту [15]. Усі тест-культури було одержано з лабораторії мікробіології, імунології та молекулярної генетики ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України» (в межах договору про наукове співробітництво).

Дослідження проводять шляхом дворазових розведень препарату в 2 мл м'ясо-пептонного бульйону (МПБ) (середовище № 1) (загалом 10 пробірок). Для кожного розведення використовували окрему піпетку. Після цього в кожену пробірку вносили по 0,2 мл мікробної зависі тест-штаму з відповідною кількістю мікробних клітин. Для цього однодобові культури мікроорганізмів, що використовувалися у дослідженні, змивали на скошеному агарі 0,9 % фізіологічним розчином, доводили до густини 5 ОД за стандартом

каламутності з наступним розведенням до необхідної кількості мікробних клітин у 2 мл і вносили в пробірки з серійно розведеним екстрактом та у контрольну пробірку. Оцінка результатів проводилася за ступенем пригнічення росту тієї чи іншої тест-культури мікроорганізмів певним розведенням екстракту.

При проведенні дослідів додатково проводили контроль росту культури в середовищі без дослідної речовини, у розчиннику; контроль чистоти суспензії мікроорганізму (шляхом висіву на неселективні середовища) та стерильності середовища. Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин (оптична щільність) проводили за допомогою стандарту каламутності (0,5 од. за шкалою McFarland). Використовували прилад Densi-Lameter (виробництва PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Суспензію готували згідно з інструкцією до приладу та інформаційного листа про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій», м. Київ. Синхронізацію культур проводили за допомогою низької температури (4 °С).

Посіви поміщали у термостат за температури 35 °С на 18-24 год. Після інкубації впродовж доби або 48–72 год для культур *Candida* spp., пробірки з посівами переглядали у промінному світлі для визначення наявності росту мікроорганізму. Мінімальна інгібуєча концентрація (МКК) встановлювалась за найменшою концентрацією дослідної речовини, яка пригнічувала видимий ріст культури. Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБЦК) виконували дозовані висіви на тверде поживне середовище (агар Мюллер – Хінтона) культуральної рідини з усіх пробірок, у яких не спостерігали росту мікроорганізму. За МБЦК

вважали найнижчу концентрацію, яка викликала загибель не менше 99,9 % бактерій. У контролі росту тест-мікроорганізму має спостерігатися ріст мікроорганізмів; контроль середовища має бути стерильним. Отримані дані аналізували за методами варіаційної статистики. Прийнятий рівень значущості $p \leq 0,05$ [15].

Випробовування мікробіологічної чистоти (МБЧ) проводили згідно з вимогами ДФУ 2.0; Т 1, п. 2.6.12, п. 2.6.31. і п. 5.1.8, категорія В [16].

10,0 г порошку фітоекстракту поміщали в стерильний мірний контейнер, енергійно перемішуючи. Доводили об'єм до 100 мл стерильним буферним розчином натрію хлориду та пептону з рН 7.0.

Для визначення загального числа мікроорганізмів по 1 мл підготовленого зразка висівали двошаровим методом на соєво-казеїновий агар.

Для визначення загального числа грибів по 1 мл підготовленого зразка висівали двошаровим методом на Сабуро-декстрозний агар.

Результати та обговорення. Багаточисельні повідомлення про формування резистентності у патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів до різних груп протимікробних засобів спонукають до всебічного вивчення антимікробних властивостей речовин, зокрема, рослинного походження [17, 18].

За результатами проведених досліджень виявлено, що зразок сухого фітоекстракту виявляє антибактеріальну активність як по відношенню до грампозитивних бактерій (*S. aureus*), так і до грибів роду *Candida*. В той же час, досліджуваний тест-зразок у означеній концентрації не виявив антибактеріальної активності відносно ентеробактерій. Результати досліджень наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Результати досліджень антимікробної активності екстракту сухого
($M \pm m$) ($p \leq 0,05$), $n=6$

Препарат	Антимікробна активність, мкг/мл				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Екстракт сухий	46,8 ± 17,1	Не виявлена	Не виявлена	Не виявлена	52,1 ± 16,1

За результатами, наведеними у табл. 1, можна обґрунтовано дійти висновку про те, що експериментальний тест-зразок сухого фітоекстракту виявив антимікробну активність відносно *S. aureus* та *C. albicans* у на рівні 46,8 ± 17,1 та 52,1 ± 16,1 мкг/мл відповідно. Разом з тим, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* не виявили чутливості до дії тест-зразка сухого екстракту.

Враховуючи те, що стафілококи, в тому числі найбільш поширений представник цього роду – *S. aureus*, здатні уражати шкіру, внутрішні органи, в т. ч. кишечник, особливо після призначення антибіотиків широкого спектра дії [3], необхідно вивчати можливість застосування запропонованого фітоекстракту при лікуванні кишкової інфекційної патології.

Згідно даних літератури, дріжджеподібні гриби роду *Candida*, зокрема *C. albicans* викликають цілу низку інфекційних захворювань під загальною назвою кандидамікози [8]. Ці гриби, поряд із золотистими стафілококами, визнані одними із найбільш поширених збудників внутрішньолікарняних інфекцій. В

експерименті було встановлено антифунгальну активність досліджуваного екстракту, що відкриває перспективу подальших досліджень у цьому напрямі.

Враховуючи те, що прокаріотам притаманна здатність продукувати модифіковані та конститутивні ферменти, які відрізняються низькими показниками рН, стало доцільним вивчити вплив мікробних культур на зсув рН середовища та вивчити залежність прояву антимікробної активності досліджуваного зразку залежно від показників кислотно-лужної рівноваги. З цією метою було досліджено наявність зміни рН у інфікованих *S. aureus* та *C. albicans* зразках поживного середовища з нейтральними та лужними характеристиками. Оцінка результатів здійснювалась через 48 год після відповідного росту обраних для скринінгу мікробних культур (табл. 2).

Відомо, що в умовах розвитку неспецифічного та специфічного запалення, простежуються послідовні стадії патологічного процесу: ексудація, альтерація і проліферація.

Таблиця 2. Вплив мікробних культур на зміну рН поживного середовища

Заданий рН поживного середовища	Зміна рН зразків МПБ в результаті інфікування	
	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
7,0	3,6 ± 0,42 (49 %)	3,2 ± 0,35 (54 %)
7,5	4,2 ± 0,50 (44 %)	3,8 ± 0,56 (49 %)
8,0	5,4 ± 0,75 (32 %)	4,6 ± 0,92 (42 %)
8,5	5,8 ± 0,93 (31 %)	5,4 ± 1,12 (31 %)

Примітка: у дужках, у %, наведено мікробнозалежний зсув у показниках рН порівнювальних зразків МПБ

Встановлено, що на стадії ексудації, закономірно простежується ацидоз, на стадії альтерації – лужний зсув і, нарешті, на стадії проліферації з ефектами репарації – відновлення фізіологічно значущих показників рН. Останнє обумовлює доцільність вивчення

залежності прояву антимікробних властивостей фітоекстракту від показників кислотно-лужної рівноваги. Результати проведених досліджень узагальнені в таблиці 3.

Таблиця 3. Результати впливу показників рН на реалізацію протимікробного потенціалу фітоекстракту

рН середовища	Антимікробна активність, МІК, мкг/мл	
	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
5,0	Не виявлено	Не виявлено
5,5	Не виявлено	Не виявлено
6,0	Не виявлено	Не виявлено
6,5	Не виявлено	Не виявлено
6,8	57,3 ± 2,23	62,5 ± 1,84
6,8	57,3 ± 2,23	59,0 ± 2,32
7,0	52,8 ± 1,65	56,4 ± 2,47
7,5	46,6 ± 2,60	52,5 ± 1,65
7,8	43,6 ± 2,25	50,5 ± 1,86
8,0	42,3 ± 1,75	46,8 ± 1,45
8,2	38,5 ± 2,17	34,5 ± 1,28
8,5	28,2 ± 1,38	29,5 ± 1,46

Підтверджено, що наявність фітоекстракту у буферних зразках МПБ з рН від 5,0 до 6,5 не впливала на фізіологічні властивості мікроорганізмів. Одночасно, починаючи з рН 6,8 до 8,5 реєструється посилення протимікробної дії. Отримані результати доводять, що у порівнянні зразків МПБ з рН 6,8 та 8,5 бактеріостатична антистафілококова активність досліджуваного зразка посилилась у 2,03 рази, а відносно *C. albicans* – 2,1 рази.

Таким чином, проведеним експериментом доведено, що у кислих і слабокислих розчинах фітоекстракт у досліджуваній концентрації характеризується відсутністю антимікробних властивостей. У нейтральних розчинах спостерігаються фонові або слабо виражені антимікробні властивості досліджуваного екстракту, а при послідовному зростанні лужності реєструється посилення притаманних антимікробних властивостей.

При вивченні фітоекстракту стало доцільним дослідити мікробіологічну чистоту досліджуваного тест-зразка, враховуючи, що цей показник є одним з найважливіших показників якості лікарських препаратів.

У ДФУ 2 вид., розд. 5.1.4, зазначені чіткі вимоги до кожної лікарської форми. Фітоекстракт належать до категорії 3 (5.1.4 N), тобто загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів не має перевищувати 10³ КУО/г, а дріжджових і пліснявих грибів – 10² КУО/г. Бактерії роду *E. coli* мають бути відсутні.

Досліджувані зразки фітоекстракту зберігали у звичайних умовах (15-25) °С. Усі дослідження виконували в асептичних умовах з використанням ламінарного боксу ШЛВО2а-02.

Результати визначення мікробіологічної чистоти тест-зразка фітоекстракту наведені у таблиці 4.

Таблиця 4. Результати дослідження тест-зразка комплексного фітоекстракту за показником «мікробіологічна чистота»

Зразки	Метод двошарового висівання		Мікроорганізми
	Кількість КУО / г		
	аеробних мікроорганізмів (ТАМС)	дріжджових і пліснявих грибів (ТУМС)	<i>E. coli</i>
Фітоекстракт	55	10	Відсутні

Примітка. КУО / г – колонієутворювальні одиниці в 1,0 мл зразків.

Інкубація підготовлених зразків фітоекстракту (розведення 1 : 10) на агарі Мак-Конкі (температура 30-35 °С – 72 год), показала відсутність колоній *E. coli*, що відповідає результату «відсутність бактерій *E. coli* в 1 г досліджуваних зразків». Тобто результати, наведені у табл. 4, свідчать про те, що в аналізованих зразках фітоекстракту не виявлено бактерій *E. coli*.

Визначення мікробіологічної чистоти зразка фітоекстракту методом двошарового висівання показало, що загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів (ТАМС) складає 55 КУО/г і загальне число дріжджових і пліснявих грибів (ТУМС) складає до 10 КУО/г.

Отримані експериментальні результати свідчать про те, що фітоекстракт відповідає вимогам ДФУ за показником «Мікробіологічна чистота».

Перспективи подальших досліджень полягають у тому, що на наступних етапах доцільно провести вивчення біофармацевтичного профілю *in vitro* та фармакологічної активності і ефективності застосування при хронічному неспецифічному виразковому коліті *in vivo* розробленої мікроемulsії.

Висновки. Вивчено антимікробну активність сухого фітоекстракту. Отримані результати вказують на перспективність розроблення лікарських препаратів з досліджуваним фітоекстрактом та подальшого вивчення його антибактеріальних властивостей у інших концентраціях. Результати експериментальних досліджень доводять, що сухий фітоекстракт відповідає вимогам ДФУ за показником «мікробіологічна чистота».

Конфлікт інтересів

Автори декларують, що не мають конфлікту інтересів стосовно даного дослідження, в тому числі фінансового, особистісного характеру, авторства чи іншого характеру, що міг би вплинути на дослідження та його результати, представлені в даній статті.

Study of antimicrobial activity of dry phytoextract Oleksandr Shmalko, Nataliia Filimonova, Svitlana Dzhoraeva, Liliia Vyshnevskia

Introduction. Human microbiota plays an important role in the functioning of the body, on which the provision of important functions of the human body depends. Therefore, a violation of the quantitative or qualitative composition of the microbiocenosis of any biotope (dysbiosis) often complicates the course of many diseases of people of different ages, and chronic inflammatory bowel diseases (IBD) constitute a significant part of chronic pathology of the digestive organs. **The aim** of the work was to study the antimicrobial activity of the dry extract test

sample by the method of multiple serial dilutions and its microbiological purity. **Materials and methods.** The researchers used test cultures of *S. aureus* – ATCC-25923, *E. coli* – ATCC-25922, *P. aeruginosa* – ATCC-27853, *Klebsiella pneumoniae* – NCTC 5055. The antifungal effect of the extract was studied on the reference strain *C. albicans* ATCC 885-653. **Research results.** The experimental test sample of dry phytoextract revealed antimicrobial activity against *S. aureus* and *C. albicans* at the level of 46.8 ± 17.1 and 52.1 ± 16.1 $\mu\text{g/ml}$, respectively. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* showed no sensitivity to the action of the dry extract test sample. It was confirmed that the presence of phytoextract in buffered samples of meat-peptone broth (MPB) with pH from 5.0 to 6.5 did not affect the physiological properties of microbial cultures. At the same time, starting from pH 6.8 to 8.5, an increase in the antiseptic effect is registered. The obtained results prove that in the comparison of MPB samples with pH 6.8 and 8.5, the bacteriostatic antistaphylococcal activity of the studied sample increased by 2.03 times, and relative to *Candida* by 2.1 times. Determination of the microbiological purity of a phytoextract sample by the method of two-layer seeding showed that the total number of viable aerobic microorganisms (ТАМС) is 55 CFU/g and the total number of yeast and mold fungi (ТУМС) is up to 10 CFU/g, which indicates that the phytoextract meets the requirements SPhU according to this indicator. **Conclusions.** The obtained results indicate the prospects for the development of medicinal preparations with the investigated phytoextract and further study of its antibacterial properties in other concentrations of the dry phytoextract. According to the results of experimental studies, the dry phytoextract meets the requirements of SPhU in terms of «microbiological purity».

Keywords: extract, antimicrobial activity, microbiological purity.

References

1. Stoykevich M, Fedorova N, Nedzvetskaya N, Klenina I, Tatarchuk O. Evaluation of the intestinal microbiota and short-chain fatty acids content in patients with chronic inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2021;55(2):98–103. <https://doi.org/10.22141>
2. Shmalko OO, Pestun IV, Vyshnevskia LI. Marketing substantiation of Introduction of a new Herbal medicine for the Treatment of Inflammatory bowel diseases into the Pharmaceutical market of Ukraine. *Research J. Pharm. and Tech*. 2020;13(11):5431-5437. doi: 10.5958/0974-360X.2020.00948.8 <https://rjptonline.org/AbstractView.aspx?PID=2020-13-11-63>
3. Garifulina MA., Voronkova OS., Shevchenko TM., Vinnikov AI. Characteristics of staphylococci and their

- role in children's pathology. Bulletin of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine 2014;5(2):115–120.
4. Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Rasmussen S, Li J, Sunagawa S, et al. Archaea and fungi of the human gut microbiome: Correlations with diet and bacterial residents. PLoS ONE. 2013;8:1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0066019
 5. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. Curr. Opin. Gastroenterol. 2015;31:69–75. doi: 10.1097/MOG.000000000000139).
 6. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. Cell. 2012;Vol.148:1258–1270. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.035.
 7. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. The New England Journal of Medicine. 2011.365:1713–1725.
 8. Ivanko OG., Skrypnikova JaS. Candida albicans infection is the most common fungal disease in children. Available from: <https://health-ua.com/article/68507-nfektuya-Candida-albicans-najblsh-rozpovsyudzhene-gribkove-zahvoryuvannya-u>
 9. Zomorodian K, Bandegani A, Mirhendi H. Чувствительность грибов рода Candida к препаратам азолового ряда. Медичні аспекти здоров'я жінки. 2016;1:41–44.
 10. Bures J, Cyrany J, Kohoutova D, Förstl M, Rejchrt S, Kvetina J, et al. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. World J. Gastroenterol. 2010;Vol.16; 24:2978–2990. doi: 10.3748/wjg.v16.i24.2978
 11. Stepanov YuM, Fedorova NS. Effectiveness of rifaximin in correcting bacterial overgrowth syndrome in chronic inflammatory and functional bowel diseases. Gastroenterology. 2019;54(1):49–54. doi: 10.22141/2308-2097.53.4.2019.182740
 12. Bäumlér AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. Nature. 2016;535:85–93. doi: 10.1038/nature18849
 13. Shmalko OO, Iakovenko VK. Substantiation of the composition and technology of obtaining in laboratory conditions of dry extract of complex action. News of pharmacy. 2023;2 (106):43–50. <https://doi.org/10.24959/nphj.23.124>
 14. Shmalko OO, Iakovenko VK. Experimental studies on the development of methods for the analysis of biologically active substances in a multicomponent liquid extract of complex action. Medical and clinical chemistry. 2023; 4:30-37. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i4.14370>
 15. Volyanskyi YuL, Hrytsenko IS., Shirobokov VP [and others]. Study of the specific activity of antimicrobial drugs: Method. recommendations Ministry of Health of Ukraine. Kyiv; 2004. 38 p.
 16. State Pharmacopoeia of Ukraine. State enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products». 2nd edition Supplement 1. Kharkiv: State enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products». 2016:360. ISBN 978-966-97390-2-5
 17. Salmanov AG., Trokhymchuk VV., Werner OM., Lugach OO. Antimicrobial resistance is a global problem. International journal of antiibiotics and probiotics. 2018 Dec; 4-5(4):6-19.
 18. Romanyuk LB., Kravets NYa., Klimnyuk SI., Kopcha VS., Dronova OY. Antibiotic resistance of opportunistic microorganisms: Relevance, conditions of occurrence, ways to overcome. Infectious diseases. 2019; 4(98):63-71.