View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE

Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин

ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ЧАСОПИС

http://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/pharm-chas

УДК 615.322+582.929.4
DOI https://doi.org/10.11603/2312-0967.2020.4.11648

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ВОДНО-ЕТАНОЛЬНИХ ВИТЯГІВ ІЗ ТРАВИ ГОРЛЯНКИ ПОВЗУЧОЇ (*AJUGA REPTANS* L.)

С. В. Малюванчук, Р. В. Куцик, А. Р. Грицик

Івано-Франківський національний медичний університет
sv_malyv@ukr.net

ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції / Received: 14.09.2020
Після доопрацювання / Revised: 10.11.2020
Прийнято до друку / Accepted: 19.11.2020

Ключові слова:
горлянка повзуча;
антимікробна активність;
водно-етанольні витяги;
антигрибкова активність;
грамнегативний;
грампозитивний.

АНОТАЦІЯ

Мета роботи. Визначення мікробіологічної чистоти трави горлянки повзучої та антимікробної активності водно-етанольних витягів трави горлянки повзучої відносно клінічних штамів умовно-патогенних бактерій та дріжджоподібних грибів.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження, антимікробна активність водно-етанольних витягів із трави горлянки повзучої, заготовленої в період масового цвітіння. Дослідження антимікробної активності екстрактів виконано на клінічних ізолятах антибіотикочутливих і антибіотикорезистентних мікроорганізмів. Бактеріальні культури ідентифікували за допомогою біохімічних мікротестів «STAPHYtest 16», «ENTEROtest 24», «NEFERMENTtest 24» (Lachema, Чехія), а також із врахуванням комплексу морфологічних і культуральних властивостей згідно з рекомендаціями 9-го видання «Визначника бактерій Берджі». Культури дріжджоподібних грибів ідентифікували на основі 40 біохімічних тестів за допомогою системи VITEK 2 з використанням VITEK 2 YST ID card (Biomerieux, Франція). Антимікробну дію витягів вивчали мікрометодом дифузії в агар.

Результати й обговорення. Проведено скринінг антимікробних властивостей для водно-етанольних витягів (40 %, 50 %, 70 %, 90 % об/об) трави горлянки повзучої та досліджено мікробіологічну чистоту рослинних витягів на 25 тест-штамах мікроорганізмів.

Висновки. Враховуючи результати досліджень, вважаємо перспективним детальніше вивчення витягів із трави горлянки повзучої на можливу антимікробну дію та проведення мікробіологічних досліджень для розширення асортименту антимікробних лікарських рослинних засобів.

Вступ. Пошук нових рослин із антимікробними властивостями, комплексне використання рослинної сировини, пошук нових напрямів використання сировини з метою розширення сфер її застосування – це основні напрями досліджень при розробці фітозасобів, зокрема, з антимікробною дією [1].

Рід Горлянка (*Ajuga*) родини Глухокропивові (*Lamiaceae*) за різними даними нараховує близько 50 видів [2, 3]. Лікарська рослинна сировина представників роду Горлянка проявляє різноманітну фармакологічну активність, включно протизапальну, протипухлинну, антиоксидантну, антидіабетичну, антимікробну, протидіарейну, сечогінну, гіполіпідемічну, гіпоглікемічну, імуномодулюючу, судинозвужувальну, антимутагенну та нейропротекторну активність [4–8]. Окремі види *Ajuga* використовують в народній медицині низки країн для лікування діабету, запалення, малярії, підвищеного артері-

ального тиску, болю, лихоманки та як антигельмінтні засоби [9, 10].

Горлянка повзуча (*Ajuga reptans* L.), синоніми: *Bugula reptans; Giinsel* – багаторічник із довгими лежачими або припіднятими укоріненими вегетативними пагонами. Поширена в Європі, Західній Азії, Північній Америці, Алжирі та Тунісі [11]. На території України зростає на території Хмельницької області (Національний природний парк «Подільські Товтри»), Чернівецької області (Прут-Дністровське межиріччя), Івано-Франківської області (урочище «Береги» с. Гута Богородчанського району, околицях с. Вікторів Галицького району, с. Посіч Тисменицького району) та урочище «Погур» в Тернопільській області [12–14]. Трава горлянки повзучої містить ефірну олію, дубильні речовини, слідові кількості алкалоїдів [15, 16]. Тому вона може розглядатися як перспективна сировини для виготовлення нових лікарських засобів. У зв'язку з цим актуальним є дослідження антимікробної активності витягів трави горлянки повзучої.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження: трава горлянки повзучої, заготовлена в період масового цвітіння Івано-Франківської області в різних районах (квітень-травень 2019 р.), висушена повітряно-тіньовим способом та подрібнена. Подрібнення сировини проводили за допомогою млинка, просіювали за допомогою лабораторних сит із розміром отворів 0,5–3 мм.

Вивчення мікробіологічної чистоти трави горлянки повзучої виконано відповідно до вимог Державної Фармакопеї України ДФУ 2.3 (розділ 5.1.8 Мікробіологічна чистота рослинних лікарських засобів для орального застосування та екстрактів, що використовують для їх виготовлення) [17]. Із висушеної подрібненої сировини готували змив стерильним фізіологічним розчином (у співвідношенні 1:10). Число життєздатних клітин бактерій і грибів визначали методом послідовних десятикратних серійних розведень з наступним висіванням на чашки з м'ясо-пептонним агаром, середовищами Ендо і Сабуро.

Для екстракції використовували етанол (40 %, 50 %, 70 %, 90 %, об/об). Співвідношення рослинної сировини та екстрагенту 1:10, подрібнена фракція частинок 0,5–3 мм, метод екстракції – мацерація (настоювання впродовж 24 годин).

Дослідження антимікробної активності витягів виконано на клінічних ізолятах антибіотикочутливих і антибіотикорезистентних мікроорганізмів. Бактеріальні культури ідентифікували на основі біохімічних мікротестів «STAPHYtest 16», «ENTEROtest 24», «NEFERMENTtest 24» (Lachema, Чехія), а також із врахуванням комплексу морфологічних і культуральних властивостей згідно з рекомендаціями 9-го видання «Визначника бактерій Берджі» [18]. Культури дріжджоподібних грибів ідентифікували на основі 40 біохімічних тестів за допомогою системи VITEK 2 з використанням VITEK 2 YST ID card (Biomerieux, Франція).

Антимікробну дію витягів вивчали за допомогою мікрометоду дифузії в агар. Він характеризується високою чутливістю і дискримінаційною здатністю, що дає можливість надійно диференціювати активні витяги від неактивних [19]. У чашки Петрі, розміщені на рівній горизонтальній поверхні, заливали по 30 мл агару. Після застигання середовища спеціальним пробійником із рівними краями робили лунки діаметром 4,0 мм. Агар рівномірно засівали суспензією культур клінічних ізолятів (концентрації $1x10^7$ КУО/мл). В дослідні лунки вносили по 20 мкл отриманих витягів, у контрольні – по 20 мкл відповідного екстрагента (етанол 40 %, 50 %, 70 % і 90 % об/об). Після культивування впродовж 24 год визначали діаметри зон затримки росту бактеріальних тест-культур. Реєстрацію фунгістатичної активності проводили після 2 діб, фунгіцидної – після 4 діб культивування. Обробку одержуваних цифрових зображень посівів на чашках здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Image Tool 2.0 (UTHSCSA ImageTool 2.0, The University of Texas Health Science Center in San Antonio, ©1995-1996).

Дослідження синергізму антимікробної дії витягів з антибіотиками виконано на клінічних штамах *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* і *S. epidermidis* з ідентифікованими ефлюксними механізмами резистентності до макролідів, тетрациклінів та фторхінолонів. У поживний агар додавали еритроміцин, тетрациклін або офлоксацин у кінцевих концентраціяз $^1/_4$, $^1/_8$, або $^1/_{16}$ МБсК для кожного тест-штаму. Після 24 годин інкубації порівнювали діаметри зон затримки росту (ЗЗР) мікроорганізмів під впливом витягів на середовищі без засобів (контроль) та на середовищах із суббактеріостатичними концентраціями антибіотиків [20].

Результати й обговорення. Першим етапом дослідження було визначення мікробіологічної чистоти трави горлянки повзучої відповідно до вимог Державної Фармакопеї України ДФУ 2.3 (розділ 5.1.8 Мікробіологічна чистота рослинних лікарських засобів для орального застосування та екстрактів, що використовують для їх виготовлення) [17]. В результаті аналізу зразка сировини встановлено, що рівень його мікробного забруднення відповідає усім фармакопейним критеріям прийнятності мікробіологічної чистоти рослинних лікарських засобів (табл. 1).

Загальне мікробне число у дослідному зразку сировини становило 3000 КУО/г і таким чином не перевищувало допустимих за вимогами ДФУ значень. Серед виділених мікробних культур виразно переважали актиноміцети (2600 КУО/г). Їх ріст виявлено після інкубації впродовж 7 днів посівів на середовищі Сабуро в атмосфері CO_2 при температурі 30 °С. Крім того, встановлено присутність на сировині бацил (*Bacillus* (*B.*) *sp*.) – 80 КУО/г, сарцин (*Sarcina flava*) – 80 КУО/г, мікрококів (*Micrococcus sp*.) – 20 КУО/г і сапрофітного стафілокока (*Staphylococcus saprophyticus*) – 20 КУО/г. Усі перелічені мікроорганізми є сапрофіта-

Таблиця 1
Результати визначення мікробіологічної чистоти трави горлянки повзучої

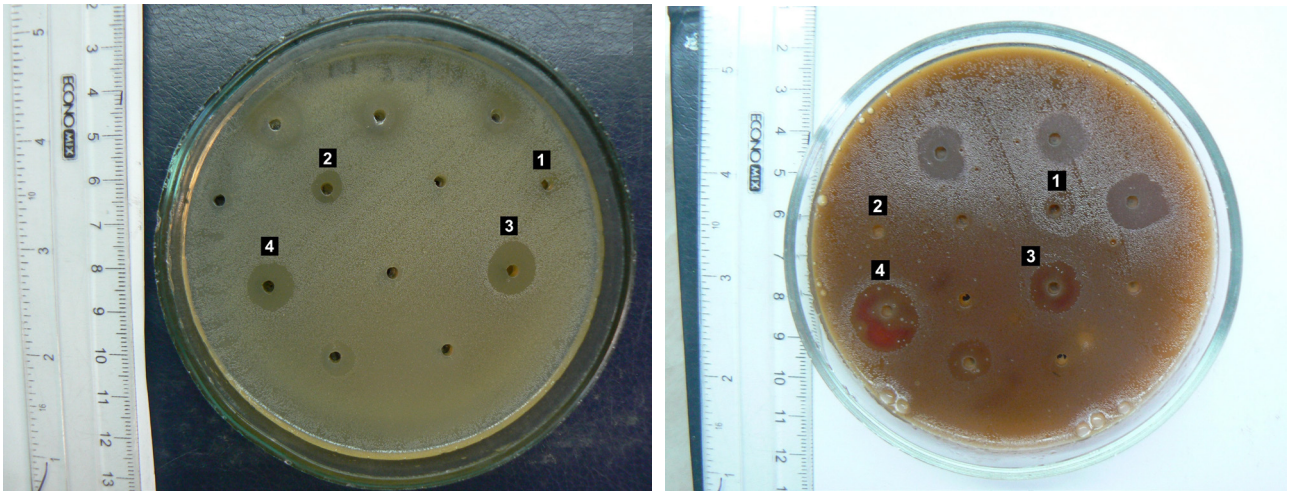
Мікробіологічні показники	Фармакопейні критерії прийнятності мікробіологічної чистоти рослинних лікарських засобів, що містять рослинну сировину			Трава горлянки
	A. Призначених для приготування настоянок та відварів із використанням окропу	B. Для яких спосіб отримання (екстракція) або спосіб попередньої обробки забезпечує зменшення мікробного забруднення	C. Для яких спосіб отримання (екстракція) або спосіб попередньої обробки не забезпечує зменшення мікробного забруднення	
Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС), КУО/г або КУО/мл	10^7	10^4	10^5	3×10^3
Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС), КУО/г або КУО/мл	10^5	10^2	10^4	3×10^1
Толерантні до жовчі грамнегативні бактерії	Не регламентується	10^2	10^4	відсутні
Escherichia coli	відсутня	відсутність в 1 г	відсутність в 1 г	відсутня в 1 г
Salmonella	відсутність в 25 г	відсутність в 25 г	відсутність в 25 г	відсутня в 25 г
Pseudomonas aeruginosa	відсутня	відсутня	відсутня	відсутня в 1 г
Staphylococcus aureus	відсутній	відсутній	відсутній	відсутній в 1 г
Candida albscans	відсутній	відсутній	відсутній	відсутній в 1 г

ми, які широко розповсюджені у природі, особливо на поверхні рослинних організмів. Також спостерігається мінімальне забруднення висушеної трави горлянки грибковою мікрофлорою – загальне число грибів на рівні 30 КУО/г. У зразку сировини виявлено поодинокі міцеліальні гриби (*Aspergillus sp*. – 10 КУО/г, *Mucor sp*. – 20 КУО/г), а дріжджові і дріжджоподібні гриби відсутні. При мікробіологічному дослідженні у сировині не виявлено патогенних та умовно-патогенних бактерій – золотистого стафілокока, кишкової палички та інших коліформних бактерій, сальмонел і синьогнійної палички. Таким чином, заготовлена сировина трави горлянки повзучої відповідає вимогам ДФУ, була придатна для виготовлення лікарських форм: відварів, настоїв, екстрактів.

Методом мацерації, використовуючи екстрагенти із різним вмістом етанолу (40 %, 50 %, 70 % і 90 % об/об), з трави горлянки повзучої було одержано витяги. Як тест-культури використовували стафілококи, α- і β-гемолітичні стрептококи, ентерококи, бацили, ентеробактерії, псевдомонади та дріжджоподібні гриби. Ми встановили бактерицидну і бактеріостатичну активність витягів трави горлянки повзучої відносно різних мікробних культур. Бактерицидний характер дії проявлявся формуванням виразних зон повного пригнічення росту культур клінічних ізолятів навколо лунок з екстрактами. При вивченні бактеріостатичної дії спостерігали зони часткового пригнічення росту мікроорганізмів, які не мали чітких країв, а в межах цих зон формувалися атипові колонії (рис. 1).

Обраховані експериментальні результати наведено в таблиці 2.

Слід зазначити, що водно-етанольні витяги трави горлянки повзучої виявили вищу активність відносно грампозитивних мікроорганізмів, ніж відносно грамнегативних. Особливо чутливими виявилися до них стрептококи. Витяги трави горлянки, виготовлені на 70 % і 90 % етанолі, зумовлювали виражене пригнічення росту патогенних β-гемолітичних стрептококів груп А і G – збудників тонзилітів і ангін (рис. 1 Б), а також β-гемолітичного стрептокока групи В – збудника запальних процесів зовнішніх жіночих статевих органів. Умовно-патогенні α-гемолітичні стрептококи оральної мікрофлори *St. oralis*, *St. sanguinis*, *St. gordonii*, які можуть спричиняти гнійно-запальні процеси слизової оболонки ротової порожнини і тканин



А Б

Рис. 1. Фотографії, отримані при дослідженні антимікробної активності витягів трави горлянки повзучої відносно культур ентерокока *Enterococcus faecslis* (А) і β-гемолітичного стрептокока групи G *Streptococcus* (*St.*) *group G* (Б). Витяги виготовлені на етанолі різних концентрацій (об/об): 1 – 40 %, 2 – 50 %, 3 – 70 %, 4 – 90 %.

Таблиця 2
Результати вивчення антимікробної активності витягів трави горлянки повзучої

Мікробні культури	Концентрація етанолу у витягу, % (об/об)			
	40	50	70	90
1	2	3	4	5
Стафілококи				
S. aureus	0	0	6,36±0,28	6,47±0,32
S. haemolyticus	6,58±0,12	6,95±0,46	5,84±0,27	5,89±0,21
S. epidermidis	0	5,01±0,64	4,48±0,30	13,79±0,23*
Ентерококи				
Enterococcus (*E.*) *faecalis*	3,83±0,20	7,29±0,34*	11,49±0,61*	10,66±0,06*
β-гемолітичні стрептококи				
St. pyogenes (групи А)	0	11,96±0,67*	13,99±0,67*	12,14±0,47*
St. agalacticae (групи В)	0	0	9,31±0,49*	14,78±0,21*
St. group G	4,39±0,09	4,65±0,26	12,27±0,10*	16,45±0,55*
α -гемолітичні стрептококи				
St. gordonii	4,63±0,12	4,51±0,30	13,24±0,60*	17,45±0,35*
St. sanguinis	0	11,82±0,40*	0	15,18±0,91
St. oralis	[8,96±0,61]*	12,14±0,34*	12,13±0,13	18,20±1,01*
St.pneumoniae	[6,37±0,24]*	[10,86±0,30]*	[11,01±1,57]*	15,20±1,43*
Бацили				
B. subtilis	4,07±0,29	8,29±0,48*	4,48±0,69	11,12±0,65*
Ентеробактерії				
Escherichia coli	0	0	5,80±0,42	0
Escherichia fergusonii	0	0	3,86±0,19	10,76±0,20*
Citrobacter freundii	0	3,89±0,08	12,45±0,50*	[8,75±0,31]*
Morganella morganii	4,07±0,14	4,44±0,35	5,66±0,10*	5,81±0,26
Providencia rettgeri	0	0	9,09±0,21*	6,80±0,42

Продовження табл. 2

1	2	3	4	5
Providencia stuartii	0	5,10±0,44	8,61±0,46*	[9,38±0,19]
Klebsiella pneumoniae	0	0	5,68±0,40	8,36±0,49*
Псевдомонади				
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	0
Дріжджоподібні гриби роду *Candida* (*C.*)				
C. albicans	0	0	[10,36±0,48]	20,64±0,46*
C. tropicalis	0	0	[5,35±0,63]	9,24±0,34*
C. lusitaniae	3,92±0,16	5,25±0,72	[4,98±0,55]	4,21±0,64
C. lipolytica	0	4,65±0,55	[5,83±0,28]	5,99±0,84
C. kefyr	3,10±0,16	4,38±0,29	[9,55±0,35]	8,72±0,93

Примітки: 1) у квадратних дужках наведено зони часткового пригнічення росту мікроорганізмів (бактеріостатична/фунгістатична дія);

2) * – $p < 0,01$ достовірно порівняно з контролем (чистий екстрагент).

пародонта, виявили також високу чутливість до застосування 70 % і 90 % етанольних витягів із трави горлянки. Відносно цих мікроорганізмів було отримано найбільші зони пригнічення росту при тестуванні витягу на 90 % етанолі – їхні діаметри сягали 15,18–18,20 мм. Ріст *St. sanguinis* і *St. oralis*, крім того, виразно пригнічувався застосуванням витягу з трави горлянки на 50 % етанолі. Стосовно основного збудника бактеріальних респіраторних інфекцій (бронхітів, отитів, синуситів) пневмокока *St. Pneumoniae,* витяги на 50 % і 70 % етанолі виявили бактеріостатичну, а витяг на 90 % етанолі – виражену бактерицидну активність. Таким чином, можна припустити перспективність застосування горлянки для лікування стрептококових інфекцій у стоматологічній, педіатричній та ЛОР-практиці.

Достатньо високу чутливість до 70 % і 90 % етанольних витягів із трави горлянки виявив ентерокок *E. faecalis* – поширений збудник урологічних і ранових інфекцій. Цей результат заслуговує на особливу увагу у зв'язку з високою природною резистентністю ентерокока до антибіотиків більшості груп.

Стафілококи – найбільш поширені із збудників гнійно-запальних процесів, виявилися менш чутливими до витягів із трави горлянки повзучої, порівняно із стрептококами. Слабкою чутливістю до усіх випробовуваних витягів характеризуються *S. aureus* і *S. haemolyticus*. Ріст культури *S. epidermidis* достовірно пригнічував лише витяг, виготовлений на 90 % етанолі.

Грамнегативні бактерії в цілому є значно менш чутливими до біологічно активних речовин витягів горлянки повзучої. Абсолютно не чутливою до них виявилася нормальна кишкова паличка. Виявлено таку тенденцію: витяги з трави горлянки на 70 % і 90 % етанолі здатні пригнічувати ріст *Escherichia fergusonii*, яка має знижену ферментативну активність, а також цитробактерів та представників гнилісної мікрофлори кишечника провіденцій і морганел. Тому можна висувати гіпотезу про раціональність включення трави горлянки повзучої як допоміжний компонент у трав'яні збори та компленксні фітозасоби для лікування легких форм дизбактеріозів кишечника. Щодо більшості видів дріжджоподібних грибів роду *Candida* витяги з трави горлянки повзучої виявили слабку фунгістатичну активність. Заслуговує на увагу лише фунгіцидна дія витягу з трави горлянки, виготовленого на 90 % етанолі, відносно полірезистентних до класичних антигрибкових засобів штамів *C. albicans* і *C. tropicalis*. Отримані дані цілком узгоджуються з публікаціями інших дослідників. Для екстракту з трави горлянки повзучої, зібраної в Румунії, отриманого методом мацерації із застосуванням 70 % етанолу, A. Toiu і співавт. встановили бактерицидну активність відносно *S. aureus* – 1,56 мг/мл, *Pseudomonas aeruginosa* – 3,12 мг/мл, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* та *Salmonella typhimurium* – 12,5 мг/мл. Значно вищу активність цей екстракт виявив відносно грибів: *Aspergillus* (*As.*) *flavus* (мінімальна фунгіцидна концентрація 0,1 мг/мл), *As. niger* (0,05 мг/мл), *C. albicans* (0,025 мг/мл), *C. parapsilosis* (0,05 мг/мл), *Penicillium fumiculosum* (0,1 мг/мл) [21]. Етанольний екстракт горлянки повзучої, яка зростає в Туреччині, виявив помірну антимікробну активність (зони затримки росту навколо дисків з екстрактом 7-11 мм) відносно *S. epidermidis*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris* та *Proteus aeruginosa* [22]. Відносно *S. aureus, Streptococcus pyogenes, Klebsiella pneumoniae* цей екстракт виявився не активним.

Незважаючи на певні відмінності результатів, пов'язані з особливостями виготовлення екстрактів, процедурою тестування на протимікробну активність та використаними тест-штамами мікроорганізмів,

слід констатувати факт, що антимікробна дія витягів, отриманих із трави горлянки повзучої за допомогою етанолу різних концентрацій, проявляється в діапазоні концентрацій 10 – 0,1 мг/мл, тоді як для високоактивних фітосполук характерним є діапазон <100 мкг/мл, а для класичних антибіотиків – <4–2 мкг/мл. Схожий діапазон активних концентрацій встановлено для інших видів рослин роду *Ajuga* L., які застосовують в народній медицині: *Ajuga* (*A.*) *laxmannii* (Murray) Benth. [23], *Ajuga genevensis* L. [24], *Ajuga iva* (L.) Schreb. [25], *Ajuga pseudoiva* Rob. [26].

У зв'язку з цим практичне застосування трави горлянки повзучої самостійно або у складі комплексних фітозасобів може бути виправданим з огляду на її інші види біологічної активності: протизапальна, антиоксидантна, нейропротекторна, гіпоглікемічна, гіполіпідемічна дія.

Лікарську рослинну сировину вивчають не лише як джерело сполук із прямою антимікробною дією. Вивчено здатність окремих флавоноїдів, терпенів, катехінів, галотанінів і алкалоїдів потенціювати дію класичних антибіотиків [27, 28]. Такий пошук і вивчення речовин – пріоритетний шлях боротьби з антибіотикорезистентністю мікроорганізмів. У зв'язку з цим було проведено досліди на виявлення можливого синергізму антимікробної дії витягів з антибіотиками відносно клінічних штамів *S. aureus* і *S. epidermidis* з ідентифікованими ефлюксними механізмами резистентності до макролідів, тетрациклінів та фторхінолонів. У результаті дослідження не було зареєстровано жодного достовірного збільшення діаметрів зон пригнічення росту стафілококів під впливом витягів з трави горлянки на середовищах із суббактеріостатичними концентраціями еритроміцину, тетрацикліну та офлоксацину ($^1/_4$, $^1/_8$ та $^1/_{16}$ МБсК для кожного тест-штаму) порівняно з контрольними посівами на середовищі без антибіотика. Отже, інгібіторів ефлюксних помп макролідів, тетрациклінів та фторхінолонів немає у досліджуваних із трави горлянки повзучої.

У ході виконаних досліджень ми встановили важливу закономірність – антимікробна активність витягів із трави горлянки посилюється пропорційно до зростання концентрації етанолу в екстрагенті. Це може свідчити про те, що більш гідрофобні біологічно активні сполуки забезпечують антимікробну активність витягів. Додатковим підтвердженням цього припущення є дані про значно вищу антигрибкову активність петролейно-ефірного і хлороформного екстрактів трави *A. reptans* [18], петролейно-ефірного екстракту *Ajuga remota Benth*. [29] та ефірної олії *Ajuga pseudoiva Rob*. [26] порівняно з етанольними або метанольними екстрактами. Тому є усі підстави пов'язувати антимікробну дію екстрактів горлянки повзучої передусім із компонентами ефірної олії, а саме – присутністю в сировині неоклероданових дитерпенів [30], іридоїдних глікозидів [31] та танінів.

Висновки. 1. При мікробіологічному дослідженні в траві горлянки повзучої не виявлено патогенних та умовно-патогенних бактерій – золотистого стафілокока, кишкової палички та інших коліформних бактерій, сальмонел і синьогнійної палички – сировина відповідає вимогам ДФУ і придатна для виготовлення лікарських форм.

2. Водно-етанольні витяги (етанол 50 %, 70 %) трави горлянки повзучої виявили бактеріостатичну дію проти α-гемолітичного стрептокока *St. pneumoniae*, а на 90 % етанолі виражену бактерицидну активність. Також нами досліджено, що грампозитивні мікроорганізми є більш чутливими до біологічно активних сполук горлянки повзучої, ніж грамнегативні. Порівняно з іншими грампозитивними бактеріями, вищу чутливість до витягів горлянки повзучої проявили β-гемолітичні стрептококи груп A, B і G, пневмокок *Streptococcus pneumoniae* та оральні α-гемолітичні стрептококи *Streptococcus oralis*, *St. sanguinis*, *St. gordonii*.

3. Антимікробна активність витягів із трави горлянки повзучої збільшується зі зростанням концентрації етанолу в екстрагенті.

4. Синергізму дії виготовлених етанольних витягів із трави горлянки повзучої з макролідами, тетрациклінами та фторхінолонами відносно резистентних штамів стафілококів не виявлено.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to desclare.

RESEARCH OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF WATER-ETHANOL EXTRACTS OF *AJUGA REPTANS* L. HERB

S. V. Maliuvanchuk, R. V. Kutsyk, A. R. Grytsyk

Ivano-Frankivsk National Medical University
sv_malyv@ukr.net

The aim of the work. To determine the microbiological purity of *Ajuga reptans* L. herb and antimicrobial activity of it's water-ethanol extracts against clinical strains of opportunistic bacteria and yeast-like fungi.
Materials and Methods. The object of the study was the antimicrobial activity of water-ethanol extracts of *Ajuga reptans* L. herb, harvested during the period of mass flowering. The study of antimicrobial activity of extracts was performed on clinical

isolates of antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant microorganisms. Bacterial cultures were identified using biochemical microtests "STAPHYtest 16", "ENTEROtest 24", "NEFERMENTtest 24" (Lachema, Czech Republic), as well as taking into account a set of morphological and cultural properties according to the recommendations of the 9th edition of "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Yeast-like fungal cultures were identified on the basis of 40 biochemical tests using the VITEK 2 system with VITEK 2 YST ID card (Biomerieux, France). The antimicrobial activity of the extracts was studied by the micromethod of diffusion into agar.

Results and Discussion. Screening of antimicrobial properties of water-ethanol extracts (40 %, 50 %, 70 %, 90 %) of *Ajuga reptans* L. herb was carried out and microbiological purity of herbal extracts was investigated on 25 test strains of microorganisms.

Conclusions. Results of the research indicate that further detailed studies of antimicrobial activity of *Ajuga reptans* L. herb are promising to increase the range of antimicrobial herbal medicines.

Key words: *Ajuga reptans* L.; antimicrobial activity; water-ethanol extract; antifungal activity; gram-negative; gram-positive.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ ВЫТЯЖЕК ТРАВЫ ЖИВУЧКИ ПОЛЗУЧЕЙ (AJUGA REPTANS L.)

С. В. Малюванчук, Р. В. Куцык, А. Р. Грицык

Ивано-Франковский национальный медицинский университет
sv_malyv@ukr.net

Цель работы. Определение микробиологической чистоты травы живучки ползучей и антимикробной активности водно-этанольных вытяжек биологически активных веществ травы живучки ползучей относительно клинических штаммов условно-патогенных бактерий и дрожжеподобных грибов.

Материалы и методы. Объект исследования: антимикробная активность водно-этанольных вытяжек травы живучки ползучей, заготовленной в период массового цветения. Исследование антимикробной активности экстрактов выполнено на клинических изолятах антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных микроорганизмов. Бактериальные культуры идентифицировали на основе биохимических микротестов «STAPHYtest 16», «ENTEROtest 24», «NEFERMENTtest 24» (Lachema, Чехия), а также с учетом комплекса морфологических и культуральных свойств согласно рекомендациям 9-го издания «Определитель бактерий Берджи». Культуры дрожжеподобных грибов идентифицировали на основе 40 биохимических тестов с помощью системы VITEK 2 с использованием VITEK 2 YST ID card (Biomerieux, Франция). Антимикробное действие вытяжек изучали микрометодом диффузии в агар.

Результаты и обсуждение. Проведен скрининг антимикробных свойств для водно-этанольных вытяжек (40 %, 50 %, 70 %, 90 % об / об) травы живучки ползучей и исследовано микробиологическую чистоту растительных вытяжек на 25 тест-штаммах микроорганизмов.

Выводы. Учитывая результаты исследований, считаем перспективным детальное изучение вытяжек из травы живучки ползучей на возможное антимикробное действие и проведение микробиологических исследований для расширения ассортимента антимикробных лекарственных растительных средств.

Ключевые слова: живучка ползучая; антимикробная активность; водно-этанольная вытяжка; антигрибковая активность; граммотрицательные; граммположительные.

Перелік бібліографічних посилань

1. Тернинко І. І., Вітохіна Н. В., Штепа С. Ю. Створення комплексної настоянки з лікарської рослинної сировини і вивчення її антимікробної активності. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини.* 2008. Т. 3, № 2.
2. Гродзінський А. М. Лікарські рослини : енциклопедичний довідник. Відп. ред. А. М. Гродзінський. Київ : Голов. ред. УРЕ, 1990. С. 120–121.
3. Флора УРСР / під ред. Д. К. Зерова. Т. 9. Київ : В-во Академії наук УРСР, 1960. С. 184–194.
4. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. A. G. Atanasov, B. Waltenberger, E. M. Pferschy-Wenzig et al. *Biotechnol. Adv*. 2015. Vol. 33 (8). P. 1582–1614.
5. Biologically active *Ajuga* species extracts modulate supportive processes for cancer cell development. V.-F. Rauca, L. Vlase, T. Casian et al. *Front. Pharmacol.* 2019. Vol. 10. P. 334.
6. Ethnomedicinal uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of species from the *Ajuga genus* L.: a systematic review. F. Luan, K. Han, M. Li et al. *Am. J. Chin. Med.* 2019. Vol. 47, No 5. P. 959–1003.
7. *Ajuga remota* Benth.: from ethnopharmacology to phytomedical perspective in the treatment of malaria.

K. Cocquyt, P. Cos, P. Herdewijn et al. *Phytomedicine*. 2011. Vol. 18 (14). P. 1229–1237.
8. The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuga remota.* K. A. M. Kuria, H. Chepkwony, C. Govaerts et al. *J. Nat. Prod*. 2002. Vol. 65 (5). P. 789–793.
9. Экдистероиды *Ajuga reptans* L. / Алексеева Л. И., Лафон Р., Володин В. В., Лукша В. Г. *Физиология растений.* 1998. Т. 45, № 3. С. 372–377.
10. Алексеева Л. И., Тетерюк Л. В., Володин В. В., Колегова Н. А. Динамика содержания экдистероидов у *Ajuga reptans* L. на северной границе ее ареала (респ. Коми). *Растительные ресурсы.* 1998. Т. 34, вып. 4. С. 56–62.
11. Малюванчук С. В., Грицик А. Р., Мельник М. В. Дослідження морфолого-анатомічних ознак Ajuga *reptans* L. Трави. *Медична та клініч. хімія.* 2018. Т. 20, № 4. С. 120–124.
12. Флора Хотинської височини (Прут-Дністровське межиріччя): аналіз, порівняльна характеристика й охорона : автореф. дис. … канд. біол. наук : 03.00.05 Т. Д. Никирса ; НАН України. Нац. ботан. сад ім. М. М. Гришка. Київ, 2007. 20 с.
13. Новосад В. В., Крицька Л. І., Любінська Л. Г. Фітобіота національного природного парку «Подільські Товтри». Судинні рослини. Київ: Фітон, 2009. 292 с.
14. Флора і рослинність урочища «Пагур» (Придністровське Поділля). URL: https://smekni.com/a/9197/flora-roslinnst-urochishcha-pagur/
15. Шанайда М. І. Ботаніко-фармакогностичні аспекти вивчення лікарських рослин родини Lamiaceae Juss. *Фітотерапія. Часопис.* 2005. № 2. С. 50–57.
16. Аннамухаммедова О. О., Аннамухаммедов А. О. Лікарські рослини в таблицях та схемах : навч. посіб. Житомир : Вид-во ЖДУ ім. І. Франка, 2016. С. 137.
17. Державна Фармакопея України ДФУ. Харків : Державне підприємство «Український науковий фамакопейний центр якості лікарських засобів», 2018. 416 с.
18. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. Изд. 9. Пер. с анг. ; под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. Москва : Мир, 1997.
19. Куцик Р. В. Дослідження протимікробної активності лікарський рослин Прикарпаття відносно антибіотикорезистентних клінічних штамів стафілококів. Повідомлення 1. *Галицький лікарський вісник.* 2004. Т. 11, № 4. С. 44–48.
20. Юрчишин О. І., Куровець Л. М., Руско Г. В. Вивчення протимікробних і антибіотикопотенціюючих властивостей спиртових рослинних екстрактів відносно шкірних ізолятів стафілококів – збудників піодермій з різними механізмами MLS-резистентності. *Biomedical and Biosocial Anthropology.* 2016. № 26. С. 52–57.
21. Comparative phytochemical profile, antioxidant, antimicrobial and *in vivo* anti-inflammatory activity of different extracts of traditionally used Romanian *Ajuga genevensis L*. and *A. reptans L*. (*Lamiaceae*). A. Toiu, A. Mocan, L. Vlase et al. *Molecules.* 2019. Vol. 24 (8). P. 1597.
22. Yildirim A. B., Karakas F. P., Turker A. U. *In vitro* antibacterial and antitumor activities of some medicinal plant extracts, growing in Turkey. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2013. Vol. 6, No 8. P. 616-624.
23. Phytochemical composition, antioxidant, antimicrobial and *in Vivo* anti-inflammatory activity of traditionally used romanian *Ajuga laxmannii* (Murray) benth. ("Nobleman's Beard" - Barba Împăratului). A. Toiu, A. Mocan, L. Vlase et al. *Front. Pharmacol*. 2018. Vol. 9. P. 7.
24. Саакян Н. Ж., Петросян М. Т., Агаджанян Дж. А. Антибактериальная активность изолированной культуры живучки женевской *Ajuga genevensis* L. *Биолог. журн. Армении.* 2008. № 1–2. С. 60–65.
25. Biological activities, and phytocompounds of northwest Algeria Ajuga iva (L) extracts: Partial identification of the antibacterial fraction. S. Medjeldi, L. Bouslama, A Benabdallah et al. *Microb. Pathog.* 2018. Vol. 121. P. 173–178.
26. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from south Tunisian *Ajuga pseudoiva Rob*. L. M. Ben Mansoura, R. Balti, L. Rabaoui et al. *Proc. Biochem.* 2013. Vol. 48. P. 723–729.
27. Wright G. D. Opportunities for natural products in 21(st) century antibiotic discovery. *Nat. Prod. Rep.* 2017. Vol 34, No 7. P. 694–701.
28. Gibbons S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat. Prod. Rep.* 2004. Vol. 21, No 2. P. 263–277.
29. Kariba R. M. Antifungal activity of *Ajuga remota. Fitoterapia.* 2001. Vol. 72, No 2. P. 177– 178. Available from: doi: 10.1016/s0367-326x(00)00280-x.
30. Carbonell P., Coll J. Ajugatansins, neo-clerodane diterpenes from *Ajuga reptans*. *Phytochem. Anal.* 2001. Vol. 12, No 1. P. 73–78.
31. Four new iridoid glucosides from Ajuga reptans. M. Ono, C. Furusawa, T. Ozono et al. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 2011. Vol. 59 (8). P. 1065–1068.

References

1. Terninko II, Vitokhina NV, Shtepa SYu. [Creation of a complex tincture of medicinal plant raw materials and the study of its antimicrobial activity]. Ukrainskyi zhurnal klinichnoi i laboratornoi medytsyny. 2008;3(2). Ukrainian.
2. Hrodzinskyi AM. Medicinal plants: encyclopedic reference book [Лікарські рослини : енциклопедичний довідник]. Grodzinsky AM ed. Kyiv: Head. ed. URE; 1990. Ukrainian.
3. Flora of the USSR [Флора УРСР]. Zerov DK. ed. Kyiv: Publishing House AS USSR; 1960: 184-94. Ukrainian.
4. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnol Adv. 2015;33(8): 1582-614.
5. Rauca V-F, Vlase L, Casian T, Sesarman A, Gheldiu A-M, Mocan A, et al. Biologically active *Ajuga* species extracts modulate supportive processes for cancer cell development. Front Pharmacol. 2019;10: 334.

6. Luan F, Han K, Li M, Zhang T, Liu D, Yu L, et al. Ethnomedicinal uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of species from the *Ajuga genus* L.: a systematic review. Am J Chin Med. 2019;47(5): 959-1003.
7. Cocquyt K, Cos P, Herdewijn P, Maes L, Van den Steen PE, Laekeman G. *Ajuga remota* Benth : from ethnopharmacology to phytomedical perspective in the treatment of malaria. Phytomedicine. 2011;18(14): 1229-37.
8. Kuria KAM, Chepkwony H, Govaerts C, Roets E, Busson R, De Witte P, et al. The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuga remota*. J Nat Prod. 2002;65(5): 789-93.
9. Alekseyeva LI, Lafon R, Volodin VV, Luksha VG. [Ecdysteroids *Ajuga reptans* L.]. Fiziologiya rasteniy. 1998;45(3): 372-7. Russian.
10. Alekseyeva LI, Teteryuk LV, Volodin VV, Kolegova NA. [Dynamics of ecdysteroid content in Ajuga reptans L. on the northern border of its range (Komi Republic)]. Rastitelnyye resursy. 1998;34(4): 56-62. Russian.
11. Maliuvanchuk SV, Hrytsyk AR, Melnyk MV. [Investigation of morphological and anatomical features of Ajuga reptans L. grass]. Med Clin Chem. 2018;20(4): 120-4. Ukrainian.
12. Nikirsa TD. Flora of Khotyn upland (Prut-Dniester interfluve): analysis, comparative characteristics and protection. Extended abstract of Candidate's thesis. Kyiv: NAS Ukraine; 2007. Ukrainian.
13. Novosad VV, Krytska LI, Lyubinska LH. Phytobiota of the Podilsky Tovtry National Nature Park. Vascular plants. [Фітобіота національного природного парку «Подільські Товтри». Судинні рослини] Kyiv: Fiton; 2009. Ukrainian.
14. Flora and vegetation of the tract "Pagur" (Transnistrian Podillya) [Electronic resource]. Available from: https://smekni.com/a/9197/flora-roslinnst-urochishcha-pagur/ Ukrainian.
15. Shanayda MI. [Botanical and pharmacognostic aspects of the study of medicinal plants of the Lamiaceae Juss family]. Fitoterapiia. Chasopys. 2005;2: 50-7. Ukrainian.
16. Annamukhammedova OO, Annamukhammedov AO. Medicinal plants in tables and diagrams: Textbook. [Лікарські рослини в таблицях та схемах: навч. пос.]. Zhytomyr: ZhSU Publishing House. I. Franko; 2016. Ukrainian.
17. The State Pharmacopoeia of Ukraine. Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Medicinal Products Quality. [Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»]. Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Medicinal Products Quality; 2018. Ukrainian.
18. Hoult J, Krieg N, Snit P, Staley J, Williams S. eds. Keys to bacteria Berzhdi: in 2 vols. Ed. 9. Transl. from En. [Определитель бактерий Бержди : в 2 т. Изд. 9. Пер. с анг.]. Moscow: Mir; 1997. Russian.
19. Kutsyk RV. [Study of antimicrobial activity of medicinal plants of Prykarpattia against antibiotic-resistant clinical strains of staphylococci]. Galician Med Bull. 2014;11(4): 44-8. Ukrainian.
20. Yurchyshyn OI, Kurovets LM, Rusko HV. [Study of antimicrobial and antibiotic-potentiating properties of alcoholic plant extracts against skin isolates of staphylococci - pathogens of pyoderma with different mechanisms of MLS-resistance]. Biomedical and Biosocial Anthropology. 2016;26: 52-7. Ukrainian.
21. Toiu A, Mocan A, Vlase L, Parvu AE, Vodnar DC, Gheldiu AM, et al. Comparative phytochemical profile, antioxidant, antimicrobial and *in vivo* anti-inflammatory activity of different extracts of traditionally used Romanian *Ajuga genevensis L*. and *A. reptans L*. (*Lamiaceae*). Molecules. 2019;24(8): 1597. DOI: 10.3390/molecules24081597.
22. Yildirim AB, Karakas FP, Turker AU. *In vitro* antibacterial and antitumor activities of some medicinal plant extracts, growing in Turkey. Asian Pac J Trop Med. 2013;6(8): 616-24. DOI: 10.1016/S1995-7645(13)60106-6.
23. Toiu A, Mocan A, Vlase L, Pârvu AE, Vodnar DC, Gheldiu A-M, et al. Phytochemical composition, antioxidant, antimicrobial and *in Vivo* anti-inflammatory activity of traditionally used romanian *Ajuga laxmannii* (Murray) Benth. ("Nobleman's Beard" - Barba Împăratului). Front Pharmacol. 2018;9: 7. DOI: 10.3389/fphar.2018.00007.
24. Saakyan NZh, Petrosyan MT, Agadzhanyan DzhA. [Antibacterial activity of an isolated culture of the ajuga genevensis]. Biolog. zhurn. Armenii. 2008;1-2: 60-5.
25. Medjeldi S, Bouslama L, Benabdallah A, Essid R, Haou S, Elkahoui S. Biological activities, and phytocompounds of northwest Algeria *Ajuga iva* L. extracts: Partial identification of the antibacterial fraction. Microb Pathog. 2018;121: 173-8.
26. Ben Mansoura M, Balti R, Rabaoui L, Bougatef A, Guerfel M. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from south Tunisian *Ajuga pseudoiva Rob*. L. Proc Biochem. 2013:48: 723-9. DOI: 10.1016/j.procbio.2013.02.022.
27. Wright GD. Opportunities for natural products in 21(st) century antibiotic discovery. Nat Prod Rep. 2017;34(7): 694-701. DOI: 10.1039/c7np00019g.
28. Gibbons S. Anti-staphylococcal plant natural products. Nat Prod Rep. 2004;21(2): 263-77. DOI: 10.1039/b212695h.
29. Kariba RM. Antifungal activity of *Ajuga remota.* Fitoterapia. 2001;72(2): 177-8. DOI: 10.1016/s0367-326x(00)00280-x.
30. Carbonell P, Coll J. Ajugatansins, neo-clerodane diterpenes from *Ajuga reptans*. Phytochem Anal. 2001;12(1): 73-8.
31. Ono M, Furusawa C, Ozono T, Oda K, Yasuda S, Okawa M, et al. Four new iridoid glucosides from Ajuga reptans. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2011;59(8): 1065-8. DOI:10.1248/cpb.59.1065.

Відомості про авторів
Малюванчук С. В. – асистент кафедри фармації, Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна. E-mail: sv_malyv@ukr.net, ORCID 0000-0002-6530-7834
Куцик Р. В. – д. мед. наук, професор кафедри мікробіології, вірусології та імуннології, Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна. E-mail: rkutsyk@ifnmu.edu.ua, ORCID 0000-0001-9408-9074
Грицик А. Р. – д. фармац. наук, професор кафедри фармації, Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна, E-mail: grycyk@ukr.net, ORCID 0000-0001-7335-887X

Information about the authors
Maliuvanchuk S. V. – Assistant Professor of Pharmacy Department, Ivano-Frankivsk National Medical University Ivano-Frankivsk, Ukraine. E-mail: sv_malyv@ukr.net, ORCID 0000-0002-6530-7834
Kutsyk R. V. – DSc (Medicine), Professor of the Microbiology, Virology and Immunology Department, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine. E-mail: r . kutsyk@ifnmu.edu.ua, ORCID 0000-0001-9408-9074
Grytsyk A. R. – DSc (Pharmacy), Professor of the Pharmacy Department, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine. E-mail: grycyk@ukr.net, ORCID 0000-0001-7335-887X