

© Казмірчук В.В., Мельник А.Л., Воронкіна І.А., Невмержицький В.В., Волков Т.О.

УДК 579.61+615.28:615.32:615.45

Казмірчук В.В., Мельник А.Л., Воронкіна І.А., Невмержицький В.В., Волков Т.О.

## ОЦІНКА ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ СПИРТОВОГО ЕКСТРАКТУ ХМЕЛЮ

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології

ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (м. Харків)

I.protivomicrob@mail.ru

Робота виконана в рамках планової НДР лабораторії протимікробних засобів Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» за темою «Розробка протимікробного засобу на основі біологічно активних речовин *Humulus lupulus* L. для лікування інфекційних і гнійно-запальних захворювань», № держ. реєстрації 0105U001115.

**Вступ.** На початку XXI століття проблема гнійно-запальних процесів у стоматології залишається надзвичайно актуальною. Одним з найрозповсюдженіших захворювань, з яким зустрічаються стоматологи, є захворювання пародонту. Так, за даними ВООЗ близько 80% людей страждають на захворювання пародонту в тій чи іншій мірі, при цьому у останні роки частота захворювання пародонту серед людей молодшого віку значно підвищилась і досягає 80-95%. Актуальність проблеми пов'язана також з тим, що на ранніх етапах захворювання має не виражену клінічну картину, отже за медичною допомогою пацієнти звертаються запізно, що призводить до втрати зубів та інших ускладнень [9].

На сьогодні вже відомий перелік периодонтопатогенних бактерій. до них відносять *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*. Дані макроорганізми мають виражену вірулентність та здатні ушкоджувати клітини епітелію ротової порожнини [10]. Залежно від локалізації та важкості інфекції, віку пацієнта та супутньої патології, можливі зміни у мікробному спектрі збудників [7]. Тяжкі гнійні ураження досить часто асоціюються з факультативною грамнегативною та грампозитивною флорою (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, та ін.).

Основним методом лікування пародонтиту є антибактеріальна терапія. Найчастіше антибактеріальні препарати призначаються емпірично та безконтрольно, що призводить до селекції полірезистентних штамів мікроорганізмів. Також антибактеріальна терапія має цілу низку побічних ефектів: зниження місцевого та загального імунітету, розвиток дисбіотичних порушень і, як наслідок, появу алергічних ускладнень та ін. Таким чином, виникає необхідність пошуку та розробки нових засобів лікування даної групи хворих.

Одним з альтернативних методів лікування захворювань пародонту є фітотерапія. Фітопрепарати вже традиційно використовують для прискорення загоє-

ня після хірургічного втручання та місцевого лікування захворювань слизової оболонки ротової порожнини [1, 4]. Перевагою лікування лікарськими рослинами є їх мала токсичність і відсутність побічної дії. Фітопрепарати, які використовують для лікування захворювань пародонту повинні мати протизапальну, кератопластичну, антисептичну та бактерицидну дію. Такими лікувальними засобами можуть бути препарати створені на основі біологічно активних речовин хмелю (*Humulus lupulus* L.).

Популярність хмелю досить висока. Його шишки здавна використовували у пивоварінні і хлібопеченні. У науковій медицині його використовували мало: внутрішньо (в пілюлях та порошках) – як заспокійливий, антиспастичний засіб при циститах та як гіркоту для поліпшення апетиту; зовнішньо (у вигляді ароматичних ванн, припарок і примочок) для лікування забитих місць [3]. Значно ширше застосування знайшли шишки хмелю в нетрадиційній медицині. Цю рослину застосовують як безпечний засіб при захворюваннях різної локалізації (запаленні сечового міхура, при неврастенії, хворобах печінки, при запаленні нирок та ін.) [2].

За даними Мануйлова Б.М. при створенні фітопрепарату для використання в стоматології необхідно брати до уваги наступні фактори: знання та аналіз історичного досвіду використання лікарських рослин у стоматології, знання та науковий аналіз структури будови лікарських рослин, хімічні, фізичні властивості та біологічну дію природних лікарських речовин, особливості будови та фізіології тканин пародонту, знання та використання нових методів та технології екстракції, створення більш ефективних у терапевтичному плані лікарських форм [6]. У попередніх дослідження дані фактори були взяті до уваги при створенні спиртового екстракту хмелю.

Спиртовий екстракт хмелю, як і будь який інший екстракт, представляє собою досить складну та багатокomпонентну суміш. Серед відомих біологічно активних речовин хмелю виділяють три основні групи: гіркі кислоти, що є похідними ацилфлороглюкоцидів, зокрема  $\alpha$ -кислоти (гумулен, когумулен та адгумулен) і  $\beta$ -кислоти (лупулен та його похідні), ефірні масла (каріофіллен,  $\beta$ -мірцен та гумулен), пренілфлавоноїди, серед яких домінують ксантогумол та 8 – преніларінгенін [11]. Використання спиртового екстракту хмелю у фармацевтичних композиціях з седативною, спазмолітичною, знеболювальною, ранозагоюваль-

ною дією свідчить про прийнятні для таких композицій параметри токсичності та суттєвий потенціал в галузі комплексності терапевтичного впливу.

**Мета даного дослідження** – визначення протимікробної дії спиртового екстракту хмелю відносно мурейних тест-штамів мікроорганізмів.

**Об'єкт і методи дослідження.** Об'єкт дослідження – спиртовий екстракт хмелю, створений на базі лабораторії протимікробних засобів Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (композиція виготовлена у формі 1% розчину у 96% етиловому спирті з вмістом активної речовини 10 мг/мл) та тест-штами мікроорганізмів (*S. aureus* ATCC 25923, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 10702, *B. subtilis* ATCC 6633, *K. pneumoniae* K-7 NCTC 9127, *P. vulgaris* ATCC 4636).

Протимікробну дію густого спиртового екстракту шишок хмелю перевіряли методом дифузії в агар (методом «колодязів») [8]. Для цього готували суспензію мікроорганізмів щільністю 0,5 за McFarland з однодобових культур тест-штамів. Далі суспензію розводили у 10 разів до  $10^7$  КУО/мл. Дослід проводили на середовищі Мюллера-Хінтона виробництва HiMedia.

Через 18 – 20 години інкубації в термостаті при температурі 37 °С вважали результати за розмірами діаметрів зон затримки росту мікроорганізмів. При оцінці протимікробної активності користувались наступними критеріями: відсутність зони затримки росту мікроорганізмів навколо лунки або діаметр затримки росту до 10 мм вказували на нечутливість мікробу до визначеної концентрації зразка; діаметр зони затримки росту 11 – 15 мм свідчив про помірну стійкість мікроорганізму; діаметр зони затримки росту 16-25 мм вказував на чутливість мікроорганізмів; діаметр зони затримки росту більш 25 мм – про високу чутливість мікроорганізмів.

Діаметр зон затримки росту з урахуванням діаметру «колодязя» виміряли з точністю до 0,1 мм, при цьому орієнтувались на повну відсутність видимого росту.

При дослідженні специфічної активності в якості препарату порівняння використано хлорофіліп у формі з аналогічним розчинником та вмістом активної субстанції (екстракту густого *Eucalyptus viminalis*). Контроль – розчин спирту етилового у концентрації, аналогічній концентрації в досліджуваних лікарських формах.

Результати, отримані за даними методами, проводили у трьох повтореннях.

Отримані результати досліджень оброблено методом варіаційної статистики за допомогою програми MS Excel 2003 з використанням середньої M, стандартної похибки (m) та критерію p [5].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Дослідження протимікробної активності 1% спиртового екстракту хмелю показало досить високу його активність по відношенню до тест-штамів, де контролем був 1% розчин спирту етилового (табл.). Золотистий стафілокок (*S. aureus* ATCC 25923) виявився високочутливим до досліджуваного екстракту (діаметр зони затримки росту (33,3±0,4) мм), інший представник

грампозитивної флори – *S. pneumoniae* ATCC 49619 також виявив чутливість до препарату – (22,9±0,2) мм.

Діаметри зон затримки росту грамнегативної флори (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* K-7 NCTC 9127, *P. vulgaris* ATCC 4636) свідчили про чутливість даних штамів до препарату.

Відомо, що синьогнійна паличка є досить частим збудником гнійно-запальних процесів різної локалізації, які досить важко піддаються антибактеріальній терапії внаслідок полірезистентності даного мікроорганізму, тому для нас було вкрай важливо визначити її чутливість до експериментального препарату. Зона затримки росту *P. aeruginosa* ATCC 27853 склала (16,5±0,2) мм. Таким чином даний штам виявив чутливість до екстракту.

Помірною виявилась чутливість *B. subtilis* ATCC 6633 – зона затримки росту (12,2±0,4) мм.

Таблиця

## Протимікробна активність спиртового екстракту хмелю

№	Штами мікроорганізмів	Діаметр зон затримки росту, мм (M±m)	
		1% спиртовий екстракт	Контроль
1.	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	(33,3±0,4)	*
2.	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	(22,9±0,2)	*
3.	<i>E. coli</i> ATCC 25922	(18,1±0,1)	*
4.	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	(16,5±0,2)	*
5.	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	(20,3±0,2)	*
6.	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	(12,2±0,4)	*
7.	<i>K. pneumoniae</i> K-7 NCTC 9127	(23,1±0,2)	*
8.	<i>P. vulgaris</i> ATCC 4636	(22,1±0,3)	*

Примітка: \* – зони затримки росту немає

Отже, наведені в таблиці результати дослідження свідчать про наявність у 1% спиртовому екстракті хмелю протимікробної активності відносно як грампозитивної, так і грамнегативної мікрофлори.

Проведений порівняльний аналіз протимікробної активності досліджуваної речовини з хлорофіліптом показав, що зони затримки росту *S. aureus* ATCC 25923 та *S. pneumoniae* ATCC 49619 під дією екстракту хмелю були у 3 рази більшими, ніж під дією препарату порівняння (p<0,05) (рис.).

Зони затримки росту тест-штамів *E. coli* ATCC 25922 та *P. vulgaris* ATCC 4636 були майже у 2 рази більші у порівнянні з хлорофіліптом і склали (18,1±0,1) та (22,1±0,3) мм відповідно.

Достовірної різниці між чутливістю грампозитивних паличок (*B. cereus* ATCC 10702 та *B. subtilis* ATCC 6633) до 1% спиртового екстракту хмелю та до 1% спиртового

го екстракту хлорофіліпту не виявлено ( $p > 0,05$ ).

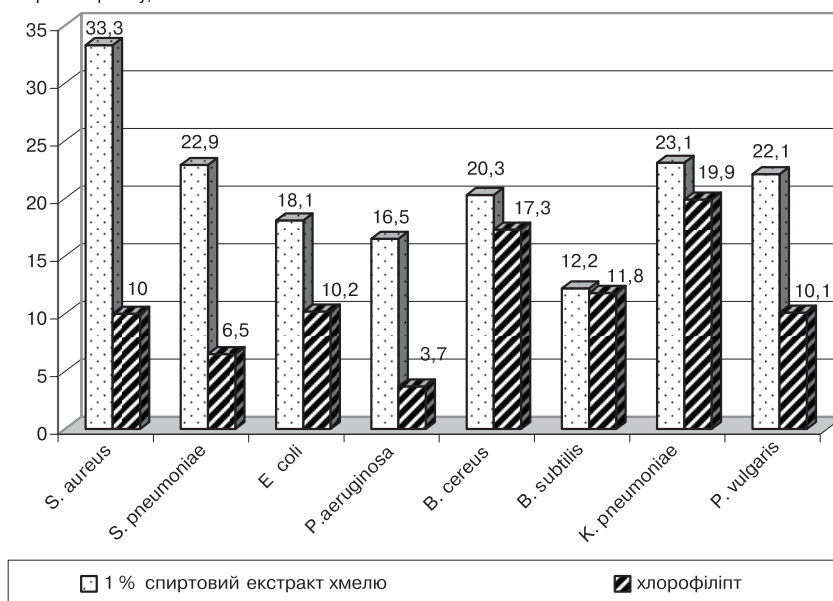
Як було зазначено вище, при створенні ефективного препарату має значення технологія екстракції. Саме при етанольній екстракції досягається максимальний вміст фенольних сполук, до яких належать пренілфлавоноїди хмелю. Ксантогумол має суттєвий антиінфекційний потенціал та виявляє антибактерійну активність по відношенню до різних мікроорганізмів [12]. Виявлена нами протимікробна активність може бути зумовлена саме цим компонентом. Крім того, як і будь-який інший екстракт з рослинної сировини, спиртовий екстракт хмелю, представляє собою достатньо складну для аналізу багатокомпонентну суміш, в якій можлива наявність інших речовин здатних потенціювати протимікробні властивості.

**Висновки.** Експериментально визначено спектр протимікробної дії 1% спиртового екстракту хмелю, щодо тест-штамів мікроорганізмів.

При дослідженні протимікробної активності виявлена висока активність експериментального зразка у відношенні до *S. aureus* ATCC 25923 ( $p \leq 0,05$ ), у порівнянні з хлорофіліптом.

Визначено, що чутливими до даного препарату були і представники грамнегативної мікро-

діаметри зон  
затримки росту, мм



**Рис. Порівняльний аналіз протимікробної активності 1% спиртових екстрактів хмелю та хлорофіліпту.**

флори (*E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* ATCC 4636, *K. pneumoniae* K-7 NCTC 9127, *P. aeruginosa* ATCC 27853).

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані результати досліджень протимікробної активності спиртового екстракту хмелю свідчать про перспективність використання препаратів хмелю для лікування пародонтиту та про доцільність подальшого їх впровадження на фармацевтичних заводах України.

## Література

- Бажанов Н.Н. Стоматология: Учеб. 3-е изд., перераб. и доп. / Н.Н. Бажанов. – М.: Медицина, 1997. – 336 с.
- Григорчук О.Ю. Хміль у народній та науковій медицині / О.Ю. Григорчук, О.І. Тихонов // Фармацевт. журн. – 2002. – № 5. – С. 90-93.
- Костриця М.Ю. Хміль та пиво в Україні з давнини до сьогодні / М.Ю. Костриця, Й.Г. Рейтман. – Житомир: «М.А.К.» Лтд., 1997. – 240 с.
- Лекарственные растения в стоматологии. 2-е изд., доп. / [А.И. Марченко, И.А. Баранюк, Е.В. Левицкая и др.]. – Кишинев: Штиинца, 1989. – 182 с.
- Лапач С.М. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С.М. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: «МОРИОН», 2001 – 408 с.
- Мануйлов Б.М. Некоторые особенности фитотерапии в стоматологии / Б.М. Мануйлов // Методические рекомендации. – М.: 2005. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.medicus.ru/stomatology/specialist/fitopreparaty-pri-lechenii-boleznej-parodonta-24012.phtml>.
- Одонтогенные и пародонтальные инфекции: практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – М.: Медицина, 1997. – 288 с.
- Определение активности антибактериальных средств наружного применения для лечения гнойно-воспалительных заболеваний / Метод. рекомендации. – Харьков, 1981. – 14 с.
- Супрун Э. В. Заболевания пародонта: современные подходы к рационализации местной терапии в рамках комплексного лечения воспалительных заболеваний полости рта / Э.В. Супрун, А.Ф. Пиминов, С. Н. Ролик // Ежедневник Аптека [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.apтека.ua/article/259575>.
- Ярынич-Бучинская Н.П. Роль микробного фактора в развитии пародонтита / Н.П. Ярынич-Бучинская, И.П. Кайдашев, П.Н. Скрипников [и др.] // Стоматолог [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.provisor.com.ua>.
- De Keukeleire J. Formation and accumulation of alpha-acids, beta-acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.) / J. De Keukeleire, G. Ooms [et al.] // J. Agric. Food. Chem. – 2003. – Vol. 51, № 15. – P. 4436-4441.
- Gerhauser C. Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop / C. Gerhauser, A. Alt, E. Heiss [et al.] // Mol. Cancer Ther. – 2002. – Vol. 1, № 11. – P. 959-069.

УДК 579.61+615.28:615.32:615.45

**ОЦІНКА ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ СПИРТОВОГО ЕКСТРАКТУ ХМЕЛЮ**

**Казмірчук В.В., Мельник А.Л., Воронкіна І.А., Невмержицький В.В., Волков Т.О.**

**Резюме.** Експериментально визначено спектр протимікробної дії 1% спиртового екстракту хмелю, щодо тест-штамів мікроорганізмів. При дослідженні протимікробної активності виявлена висока активність екстракту у відношенні до *S. aureus* ATCC 25923. Діаметри зони затримки росту стафілокока та стрептокока під дією екстракту хмелю були у 3 рази більшими, ніж під дією хлорофілліпту. Визначено, що чутливими до досліджуваного екстракту були і представники грамнегативної мікрофлори. Отримані результати досліджень протимікробної активності свідчать про перспективність використання препаратів хмелю для лікування пародонтиту.

**Ключові слова:** спиртовий екстракт хмелю, протимікробна активність, тест-штами, пародонтит.

УДК 579.61+615.28:615.32:615.45

**ОЦЕНКА ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ СПИРТОВОГО ЭКСТРАКТА ХМЕЛЯ**

**Казмирчук В.В., Мельник А.Л., Воронкина И.А., Невмержицкий В.В., Волков Т.А.**

**Резюме.** Экспериментально определен спектр противомикробной активности 1% спиртового экстракта хмеля по отношению к тест-штаммам микроорганизмов. При исследовании противомикробной активности выявлена высокая активность экстракта по отношению к *S. aureus* ATCC 25923. Диаметры зон задержки роста стафилококка и стрептококка под действием экстракта хмеля были в 3 раза больше, чем под действием хлорофиллипта. Чувствительными к исследуемому образцу были и представители грамнегативной микрофлоры. Полученные результаты исследований противомикробной активности свидетельствуют о перспективности использования препаратов хмеля для лечения пародонтита.

**Ключевые слова:** спиртовой экстракт хмеля, противомикробная активность, тест-штаммы, пародонтит.

UDC 579.61+615.28, 615.32, 615.45

**Evaluation of Antimicrobial Activity of Ethanol Extract of Hop**

**Kazmirchuk V.V., Mel'nyk A.L., Voronkina I.A., Nevmerzhyts'kyi V.V., Volkov T.O.**

**Abstract.** Periodontal disease is one of the most common diseases in the practice of a dentist. Antibiotic therapy is considered to be the main mode in treatment of periodontal diseases. One of the new aids in treatment of periodontal diseases is phytotherapy.

*The purpose of the research* is to determine the antimicrobial activity of ethanol extract of hop against the museum test- strains.

*Object and methods.* The object of the study was ethanol extract of hop, produced at the laboratory of antimicrobial agents, based at the Public Institution "I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine" (composition is made in the form of 1% solution in 96% ethanol with 10 mg/ml active substance content) and test- strains (*S. aureus* ATCC 25923, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 10702, *B. subtilis* ATCC 6633, *K. pneumoniae* K-7 NCTC 9127, *P. vulgaris* ATCC 4636).

Antimicrobial effect of heavy ethanol extract of hop cones was verified by the agar diffusion method.

In 18-20 hours of thermostat incubation in 37°C the results were assessed by the diameters of zones of bacterial stasis. The evaluation of antimicrobial activity was made by the following criteria: absence of zones of bacterial stasis around the cavity or the diameter of stasis up to 10 mm indicated about the bacterium insensitivity to a specified concentration of a sample; the diameter of stasis of 11-15 mm indicated about the moderate bacterial resistance; the diameter of stasis of 16-25 mm indicated about the sensitivity of bacteria; the diameter of stasis greater than 25 mm indicated about the high sensitivity of microorganisms.

*Results and Discussion.* The analysis of antimicrobial activity of 1% ethanol extract of hop showed a relatively high activity against test strains. Golden staph (*S. aureus* ATCC 25923) was highly sensitive to the test extract (diameter of stasis of  $33.3 \pm 0.4$  mm). The diameters of the zones of stasis of gram-negative bacteria (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* K-7 NCTC 9127, *P. vulgaris* ATCC 4636) showed sensitivity of the given strains to the agent. Comparative analysis of antimicrobial activity of investigated substance with chlorophyllipt showed that zone of stasis of *S. aureus* ATCC 25923 and *S. pneumoniae* ATCC 49619 under the hop extract were 3 times higher than under the effect of a comparison agent ( $p < 0.05$ ). Zones of stasis of test strains *E. coli* ATCC 25922 and *P. vulgaris* ATCC 4636 were almost two times more than in chlorophyllipt. The findings of antimicrobial activity of ethanol extract of hop proved the prospectivity of use of the hop agents in treatment of periodontal diseases.

*Conclusions.* The range of antimicrobial effect of ethanol extract of hop against the test strains has been defined experimentally.

The analysis of antimicrobial activity revealed the high activity of experimental sample against *S. aureus* 25923 ATSS ( $p < 0.05$ ), as compared with chlorophyllipt.

It was established that representatives of gram-negative microflora (*E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* ATCC 4636, *K. pneumoniae* K-7 NCTC 9127, *P. aeruginosa* ATCC 27853) were also sensitive to the agent.

Perspectives of further research will encompass further study of antimicrobial activity of ethanol extract of hop, proved to be reasonable supplementary aid in treatment of periodontal diseases to be produced at pharmaceutical enterprises in Ukraine.

**Keywords:** ethanol extract of hop, antimicrobial activity, test strains, periodontal diseases.

*Рецензент – проф. Дев'яткіна Т.О.*

*Стаття надійшла 13.08.2015 р.*