

ПРОТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ АРНІКИ ГІРСЬКОЇ

Н.М. ВОРОБЕЦЬ¹, І.С. БІЛІНСЬКА², О.Б.ПІНЯЖКО¹¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, фармацевтичний факультет, кафедра фармакогнозії і ботаніки,²Львівський національний університет імені Івана Франка, біологічний факультет, кафедра мікробіології
e-mail: vorobets@meduniv.lviv.ua

Антимікробну активність грубих водних та етанольних екстрактів арніки гірської вивчали щодо бактерій *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus* та дріжджів *Candida pseudotropicalis* і *Candida kefir*. Найбільш чутливими виявились *E. coli*, оксацилінрезистентні штами *S. aureus*, а також *C. pseudotropicalis*. Більшою антимікробною дією володіють екстракти, виготовлені методом гарячого екстрагування.

Ключові слова: протимікробна активність, арніка гірська, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida kefir*.

Вступ. Введення в арсенал нових протимікробних засобів, виготовлених з лікарських рослин (ЛР), є актуальним завданням сучасної фармакогнозії, медицини, біології. Суттєвими перевагами рослинних препаратів та витяжок з ЛР є те, що при їхньому застосуванні пацієнт одержує комплекс близьких до організму сполук, які краще сприймає, рідше виникають алергійні та інші ускладнення, відсутній негативний кумулятивний ефект.

У цьому сенсі нашу увагу привернула арніка гірська (*Arnica montana* L.) – багаторічна кореневищна, розеткова, вегетативно рухлива, літньозелена рослина, в якій з пазух розеткових листків виростають монокарпічні квітконосні пагоони. *A. montana* широко розповсюджена в Українських Карпатах на всьому гірському пасмі від кордонів з Польщею на заході до границі з Румунією на сході (Кобів, 1992) і є цінною лікарською рослиною (Волошин та ін., 2000). У 70-х роках минулого століття рослина була настільки поширена, що заготівля проводилась у Львівській, Закарпатській, Івано-Франківській та Чернівецькій областях, а її обсяги досягали 67,7 ц (Ивашин и др., 1975). Наприкінці 70-х років сировинна база настільки скоротилась, що арніка гірська була занесена до Червоної книги України (1980). Однак, протягом наступного двадцятирічного періоду сировинна база була відновлена, а арніка гірська стала доступною для використання з природних локалітетів.

Вважають, що бактеріостатичну дію можуть проявляти різні групи фізіологічно активних сполук (ФАС) рослин, а саме: дубильні речовини, флавоноїди, кумарини, ефірні олії, вітаміни, фенолкислоти тощо (Могирьова, 2004), більшість з яких виявлені у кошачках арніки гірської

(Кобзар, 2007). Одночасна наявність різних класів сполук однонаправленої дії сприяє посиленню фармакологічного ефекту кожної групи поокремо.

Метою даної роботи було визначити протимікробну активність водних та етанольних витяжок з кошачків *Arnica montana* L.

Матеріали та методи. Для одержання екстрактів з рослин використовували повітряно сухі кошачки *A. montana* L., зібрані під час цвітіння у 2009–2011 роках у районі хребта Чорний Діл гори Великий Камінь Путильського району Чернівецької області.

Екстрагуючими речовинами при холодному екстрагуванні були 70% і 20% розчини етилового спирту, при гарячій – вода і ці ж розчини етанолу. Холодне екстрагування проведено відповідно до вимог Державної фармакопеї, за співвідношення сировини та екстрагенту 1: 10 (вага/об'єм), залишаючи їх на 2 тижні при температурі 20 °С. Гаряче екстрагування проводили на киплячій водянній бані протягом 30 хв за аналогічного співвідношення сировини та екстрагенту. Після охолодження екстракти фільтрували і визначали їхню протимікробну активність.

Як тест-культури використали умовно-патогенні мікроорганізми: бактерії *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Serratia marcescens* ATCC, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus albus*, а також оксацилінрезистентні штами *S. aureus* та дріжджі *Candida pseudotropicalis* і *Candida kefir* ВКМ Y-701 з колекції культур кафедри мікробіології ЛНУ і кафедри мікробіології, вірусології та імунології ЛНМУ. Мікроорганізми зберігали у пробірках з відповідним середовищем при температурі 4–6

°С. Усі культури є аеробами і хемоорганотрофами; вирощувалися в стаціонарних умовах у термостаті при температурі 30–37 °С.

Культури бактерій вирощували на м'ясопептонному агарі, а дріжджі – на сусло-агарі. Середовища стерилізували при 0,5–0,7 атм протягом 30 хв. Реакцію середовища доводили до рН 7 до стерилізації 33% розчином NaOH.

Для визначення антимікробної активності екстрактів застосували загально визнаний метод дифузії в агар (Державна фармакопея України, 2001) з використанням стерильних дисків і у модифікації зі скляними шліфованими циліндриками (діаметр 5–6 мм, висота 8–10 мм). Диски насичували різною кількістю досліджуваного екстракту безпосередньо перед використанням.

Для аналізу використовували 1–2 денну культуру мікроорганізмів. Суспензію мікроорганізмів, яка містила не менше 10^8 клітин/мл, виготовляли у стерильному фізіологічному розчині і засівали газомом на відповідне середовище у чашки Петрі. Через 30–40 хв накладали диски з екстрактами, або розставляли 4 стерильні циліндрики на одну чашку Петрі так, щоб вони були максимально віддалені один від одного. У диски вносили по 0,1 і 0,2 мл екстракту. Для з'ясування чи мікробіцидний ефект екстрактів рослини не обумовлений лише дією розчинника, перевіряли антимікробну дію екстрагентів – води, 20 %-го і 70 %-го розчинів етанолу (контроль). Чашки Петрі ставили в термостат на 18–24 год з температурою 30 або 37 °С. Аналіз дії екстрактів проводили шляхом вимірювання діаметрів зон затримки росту тест-культури навколо диска або циліндрика за допомогою лінійки з точністю до 1 мм.

Результати досліджень. Тест-культури по-різному реагували на екстракти *A. montana*: з досліджених штамів бактерій найбільш чутливими виявилися кишкова паличка та оксацилінрезистентні штами золотистого стафілокока, а з дріжджів – *C. pseudotropicalis* (табл. 1). Чутливою виявилася і спороутворююча бактерія *B. subtilis*: діаметр зон затримки росту навколо циліндриками з екстрактами коливався у межах 12–17 мм. Мікробіцидна дія екстрактів у більшості випадків була сильнішою у разі використання в якості екстрагента 70 %-го етилового спирту. Усі культури виявились чутливими до 70 %-го етанолу, а 20 %-ий етанол чинив незначний інгібуючий ефект на *E. coli* та *C. pseudotropicalis*. Проте порівняно з екстрактами у більшості випадків мікробіцидний вплив 70 % етанолу був значно слабшим, наприклад, вплив екстрагента на дріжджі проявився в діаметрі зон затримки росту 10 мм, а екстракти на основі даної екстрагуючої речовини давали затримку росту культури до 27 мм. Екстракти рослин могли містити різні мікроорганізми, які могли потрапити в них з поверхні листків, з повітря при виготовленні екстрактів, а також у тару фасування. Однак при перевірці екстрактів на стерильність усі виявились стерильними. Оскільки метод екстрагування і тип екстрагуючої речовини чинять значний вплив на якісний склад, а звідти і ефективність дії рослинної витяжки, про що не раз зазначали різні дослідники, то для одержання витяжки з *A. montana* було застосовано і гаряче екстрагування. В якості екстрагента застосували дистильовану воду, яку ніколи не використовують при холодному екстрагуванні, а також 20% і 70% етиловий спирт. Результати експериментів подані у табл. 2.

Таблиця 1
Антимікробна дія екстрактів *A. montana*, одержаних методом холодного екстрагування

Table 1
Antimicrobial effect of extracts of *A. montana*, obtained by cold-extraction

№ з/п	Екстрагуюча речовина	Кількість екстракту, мл	Діаметр зон затримки росту, мм									
			Тест-культури									
			<i>E. coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. albus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> №8	<i>S. aureus</i> №10	<i>C. pseudotropicalis</i>	<i>C. kefir</i>
1	20 % розчин етанолу	0,1	10±0,5	11±0,5	11±0,6	12±0,4	10±0,4	22±0,56	14±0,5	17±0,7	20±0,7	16±0,9
2		0,2	12±0,5	11±0,3	10±0,8	17±1,8	13±0,2	27±0,7	11±0,8	16±0,9	28±0,8	14±0,3
3	70 % розчин етанолу	0,1	20±0,9	9±0,3	12±0,6	12±0,4	19±0,8	28±0,2	24±0,4	20±0,5	28±0,4	13±0,5
4		0,2	36±1,4	12±0,8	15±0,8	14±0,2	16±0,4	22±0,2	32±0,6	30±0,5	28±0,7	17±0,6
5	20 % розчин етанолу (контроль)	0,1	9±0,8	9±0,9	10±0,8	16±0,2	12±0,2	12±0,3	13±0,4	9±0,3	7±0,5	12±0,3
6		0,2	10±0,8	9±1,0	10±1,3	14±0,3	13±0,2	14±0,4	16±0,9	13±0,9	8±0,5	13±0,5
7	70 % розчин етанолу (контроль)	0,1	12±0,8	10±1,1	17±1,4	12±0,4	15±0,4	14±0,4	17±0,2	22±0,5	13±0,4	13±0,4
8		0,2	12±1,2	10±1,0	15±1,0	13±0,4	16±0,4	14±0,3	20±0,4	20±0,5	17±0,8	14±0,6

Таблиця 2
Антимікробна дія екстрактів *A. montana*, одержаних методом гарячого екстрагування

Table 2
Antimicrobial effect of extracts of *A. montana*, obtained by hot-extraction

№ з/п	Екстрагуюча речовина	Кількість екстракту, мл	Діаметр зон затримки росту, мм								
			Тест-культури								
			<i>E.coli</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>S.marcescens</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.albus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i> №10	<i>S.aureus</i> №18	<i>C.pseudotropicalis</i>
1	Вода	0,1	17±0,5	14±0,2	18±0,3	15±0,4	15±0,2	18±0,2	20±0,3	14±0,4	12±0,1
2		0,2	22±0,5	22±0,3	20±0,4	18±0,3	24±0,2	17±0,2	23±0,3	12±0,3	24±0,2
3	20 % розчин етанолу	0,1	11±0,2	26±0,4	14±0,2	15±0,3	24±0,3	16±0,4	10±0,2	8±0,3	10±0,1
4		0,2	20±0,2	25±0,4	18±0,2	22±0,2	26±0,4	12±0,4	9±0,1	11±0,2	11±0,1
5	70 % розчин етанолу	0,1	18±0,4	25±0,4	22±0,3	25±0,2	28±0,4	22±0,5	14±0,2	37±0,4	18±0,1
6		0,2	20±0,4	22±0,3	18±0,4	30±0,4	30±0,6	23±0,4	13±0,3	26±0,4	22±0,2

При дослідженні було встановлено, що екстракти, виготовлені методом гарячого екстрагування (табл. 2), здебільшого мають більшу антимікробну дію, ніж витяжки, одержані методом холодного екстрагування. Аналогічно, як і у попередньому експерименті, тест-культури по-різному прореагували на рослинні витяжки. Чутливим виявилися три полірезистентні до хіміопрепаратів штами *S. aureus*, який, як відомо, здатний спричиняти до 80 різних захворювань у людини, зокрема дерматити, уражати слизові оболонки ротової порожнини (Мюллер, 2004).

Відомо, що дріжджі (переважно роду *Candida*) часто спричиняють різні ураження шкіри та слизових оболонок людини (Геппе, Белоусова, 2010). Проте у фармакології на сьогоднішній день є невелика кількість антимікологічних препаратів. Проведені нами дослідження показали, що дріжджі *C. pseudotropicalis* виявилися чутливими до дії екстрактів *A. montana*: величини діаметрів зон затримки росту коливалися від 10 до 24 мм (табл. 1, 2).

Висновки. Одержані результати свідчать про перспективність застосування витяжок з *A. montana* як протистафілококових та антимікологічних препаратів. Найбільш важливим є створення препаратів з арніки та включення її в збори для лікування пародонтитів та уражень шкіри.

рення препаратів з арніки та включення її в збори для лікування пародонтитів та уражень шкіри.

Список літератури:

1. Волошин О.І., Захарчук Т.В., Мещишен І.Ф., Яремій І.М. Препарати арніки гірської у клінічній практиці вітчизняної і зарубіжної медицини (Огляд літератури) // Ліки. – 2000. – №3-4. – С. 41-47.
2. Геппе Н.А., Белоусова Н.А. Кандидозы // Consilium Medicum. – 2010. – Т. 12. – № 4.
3. Державна фармакопея України. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
4. Івашин Д.С., Катина З.Ф., Рыбачук И.З., Иванов В.С., Бутенко Л.Т. Лекарственные растения Украины. – К.: Урожай, 1975. – 360 с.
5. Кобзар А.Я. Фармакогнозія в медицині: Навч. посібник. – К.: Медицина, 2007. – 544 с.
6. Кобів Ю.Й. Екологія та популяційно-онтогенетичні особливості *Arnica montana* L. (Asteraceae) в Українських Карпатах // Укр. ботан. журн. – 1992. – Т. 49. – № 3. – С. 46-51.
7. Могирьова Л.А. До питання розробки нових антибактеріальних фітопрепаратів // Ліки. – 2004. – № 1-2. – С. 3-7.
8. Мюллер Х.-П. Пародонтологія. – Львов: ГалДент, 2004. – 256 с.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ARNICA MONTANA

N.Vorobets, I.Bilinska, O.Pinyazhko

Ethanollic and aqueous extracts of Arnica montana were screened for their antibacterial activity against Escherichia coli, Proteus vulgaris, Serratia marcescens, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus albus and antifungal activity against Candida pseudotropicalis and Candida kefir. The most sensitivity have been observed for Escherichia coli, oxacillin resistant strains of Staphylococcus aureus, and Candida pseudotropicalis. The most effective were extracts prepared by method of hot extraction.

Keywords: antibacterial and antifungal activity, *Arnica montana*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida kefir*.

Отримано редколегією 04.07.2011