

Винахід належить до фармації і медицини, а саме до засобів, що містять біологічні активні речовини рослинного походження, зокрема до способу одержання засобу з антиоксидантною, протимікробною та протигрибковою активністю з плодів ожини.

На сьогоднішній день можна спостерігати зростання смертей від інфекцій. Згідно з офіційною статистикою, загальна кількість смертей від інфекцій у 2019 році оцінюється в 13,7 мільйона, з яких 7,7 мільйона пов'язані з 33 вивченими бактеріальними патогенами та 11 інфекційними синдромами. Ці смерті становили 13,6 % всіх смертей у світі. При поразці клітин тканини бактеріями і грибами виникає окислювальний стрес, який веде лише до погіршення стану [1]. Окислювальний стрес - це стан організму, при якому відбувається надлишкове утворення активних форм кисню, таких як супероксид, гідроксильний радикал, монооксид азоту. Організм людини має власну антиоксидантну систему, до складу якої входять такі ферменти: супероксиддисмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза. Але через ендогенний або екзогенний вплив антиоксидантна система не здатна повністю інактивувати вільні радикали [2]. Таким чином, на сьогоднішній день потрібно створювати та розробляти нові протимікробні, протигрибкові засоби з антиоксидантною дією.

Існує спосіб одержання рідкого екстракту з антимікробною та протигрибковою активністю з висушених бруньок берези бородавчастої [3], шляхом екстракції 60-70 % етиловим спиртом сировини методом перколяції та очистка отриманого рідкого екстракту від супутніх речовин здійснюють відстоюванням при температурі 8 °C не менше 2 діб та наступним фільтруванням.

Недоліком даного способу за прототипом можна вважати недостатню антимікробну дію, відсутність протигрибкової активності засобу, тривалість очищення рідкого екстракту.

Відомий спосіб одержання суми поліфенолів з антимікробною та протизапальною дією з трави гравілату міського [4] шляхом трикратної екстракції сировини гарячою водою ($t=95\text{ }^{\circ}\text{C}$) при співвідношенні сировина і екстрагент 1:10, протягом 2-х годин, після цього сировину додатково промивають екстрагентом у кількості до 40 % від заданого співвідношення, а зливи об'єднують з сумарним екстрактом.

Недоліком даного способу за прототипом можна вважати недостатню антимікробну дію, відсутність протигрибкової та антиоксидантної активності засобу.

Задача винаходу є розробка способу одержання засобу з антиоксидантною, протимікробною та протигрибковою активністю з плодів ожини.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі одержання засобу з антиоксидантною, протимікробною та протигрибковою дією з плодів ожини, що включає пресування сировини, додавання 96 % етанолу у трикратній кількості до витяжки, фільтрація, концентрування фільтрату у вакуум-випарному апараті при температурі 50-60 °C до вологості екстракту 25 %.

В одержаному екстракті з плодів ожини містяться наступні фенольні сполуки: похідні антоціанів, флавоноїдів, гідроксикоричних та органічних кислот.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1.

100 г плодів ожини пресували, до одержаної витяжки 80 г додавали 240 г 96 % етанолу, фільтрували, концентрували фільтрат у вакуум-випарному апараті при температурі 50-60 °C до вологості екстракту 25 %.

Приклад 2.

Антиоксидантну активність екстракту з плодів ожини визначали з використанням потенціометричної методики, яка базується на різкій зміні потенціалу платинового електрода, поміщеного в буферний розчин, що містить медіаторну систему $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ і $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ після додавання досліджуваного зразка в вимірювальну електрохімічну комірку і є результатом зміни співвідношення окисленої і відновленої форми компонентів медіаторної системи. Для порівняння результатів досліджували рівень антиоксидантної активності лікарського препарату "Аскорутин".

Антиоксидантну активність визначали наступним чином:

В електрохімічну комірку вносили 50,0 мл медіаторної системи, яка складалася з $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ і $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ з концентрацією 0,002/0,00002 М, відповідно; 1,0 мл досліджуваного лікарського засобу з плодів ожини додавали до електрохімічній комірці.

Антиоксидантну активність розраховували на підставі отриманої різниці потенціалів по формулам (1-2) і виражали в молях еквівалентів антиоксидантів на масу сухого залишку екстракту (ммоль-екв./тм_{сух. зал.}). Отримані дані при $n=3$ в кожному досліді обробляли статистично.

$$\text{AOA} = \frac{C_{\text{ox}} - \alpha \cdot C_{\text{red}}}{1 + \alpha} \cdot K_{\text{dil}} \cdot 10^3 \cdot \frac{m_1}{m_2}, \quad (1)$$

$$\alpha = \left(\frac{C_{\text{ox}}}{C_{\text{red}}} \right) \cdot 10^{\frac{(\Delta E - E_{\text{ethanol}})^{nF}}{2,3RT}} \quad (2)$$

де: C_{ox} - концентрація $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в електрохімічній комірці, моль/л;

C_{red} - концентрація $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в електрохімічній комірці, моль/л;

K_{dil} - коефіцієнт розведення;
 $E_{ethanol}$ - 0,0546·C% - 0,0091;
 C% - концентрація етанолу;
 m_1 - маса сухого залишку екстракту;
 m_2 - маса сухого залишку в 1 мл екстракту;
 n - кількість електронів в електродній реакції ($n=1$);
 F - постійна Фарадея ($F=96485,333$ Кл/моль);
 R - універсальна газова стала ($R=8,314$ Дж/моль × К);
 T - температура розчину, °К.

Результати вивчення антиоксидантної активності засобу, одержаного за заявленим способом, наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Дослідження антиоксидантної активності засобу, одержаного за заявленим способом

Препарат	Доза фенольних сполук у дослідженому розчині, мг/мл	Антиоксидантна активність при $n=3$, ммоль-екв./ $m_{\text{сух. ост.}}$
Екстракт плодів ожини	5,40	52,47±1,00
Епігалокатехін-3-О-галат	5,40	10,26±0,10

Приклад 3

Для теоретичної оцінки антиоксидантної, протимікробної та протигрибкової активності екстракту плодів ожини було використано метод молекулярного докінгу. Для проведення цього дослідження було використано комп'ютерну програму Autodock 4.2 MGL Tools. Для дослідження антиоксидантної активності був обраний - фермент нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат-оксиредуктазу (НАДФН-оксиредуктазу) (PDB ID: 5o0x), фермент мієлопероксидазу (PDB ID: 3f9p), та фермент ксантин-оксиредуктазу (PDB ID: 1fiq), для дослідження протимікробної активності - дезоксирибонуклеїнова кислота гіраза (ДНК-гіраза) (PDB ID: 1kij), дигідрофолатредуктаза (ДГФР) (PDB ID: 1rx3), деацетилаза (утворення мембрани) (PDB ID: 3uhm), та протигрибкової дії - 14 α -деметилаза (PDB ID: 6ayb), 1,3- β -глюкагонсинтетаза (PDB ID: 1eqp), тимидилатсинтетаза (PDB ID: 5uiv) дані структури ферментів були взяті з банку даних білка (БДБ) [5]. За допомогою Computed Atlas for Surface Topography of Proteins [6] були визначені амінокислоти в активному центрі ферменту відповідних за його інгібування. Для дослідження було взято ціанідин-3-О-глюкозид (CID_12303220), оскільки дана сполука є головною у складі екстракту плодів ожини, як стандарт у випадку антиоксидантної активності - епігалокатехін-3-О-галат (CID_65064), оскільки дана сполука має одну з найвищих значень антиоксидантної дії серед усіх фенольних сполук, у випадку протимікробної активності - гентамицин (CID_3467), а у випадку протигрибкової дії - флуконазол (CID_3365), 3D - структура даних сполук були взяті з PubChem [7]. Комп'ютерною програмою Autodock 4.2 MGL Tools була використана для оптимізації структури ферментів шляхом видалення води, зайвих атомів, і додавання водневих груп. Потім AutoGrid визначило нативне розташування ліганду для зв'язування з активним центром ферменту шляхом розташування координати сітки (X, Y і Z). Зв'язування ліганда з ферментом проводили шляхом регулювання параметрів генетичного алгоритму (ГА), використовуючи 10 запусків критеріїв ГА. Для оцінки ефективності рівня зв'язування були використані наступні показники E (Енергія зв'язку, ккал/моль) і IC_{50} (концентрація речовини, яка інгібує 50 % ферменту, ммоль). У випадку показника E , чим менше значення, тим краще зв'язок між лігандом і ферментом.

Результати дослідження представлені у таблиці 2, 3, 4

Таблиця 2

Результати дослідження молекулярного докінгу антиоксидантної активності ціанідину-3-О-глюкозиду за ферментом НАДФН-оксиредуктазою, миєлопероксидазою, ксантин-оксиредуктазою

Сполука	НАДФН-оксиредуктаза		Миєлопероксидаза		Ксантин-оксиредуктаза	
	E , ккал/М	IC_{50} , мМ	E , ккал/М	IC_{50} , мМ	E , ккал/М	IC_{50} , мМ
Епігалокатехін-3-О-галат	-5,97	0,04237	-4,52	0,48679	-7,30	0,00445
Ціанідин-3-О-глюкозид	-7,08	0,00644	-6,51	0,01694	-6,45	0,01871

Таблиця 3

Результати дослідження молекулярного докінгу протимікробної активності ціанідину-3-О-глюкозиду за ферментом ДНК-гіразою, ДГФР, деацетилазою

Сполука	ДНК-гіраза		ДГФР		Деацетилаза	
	Е, ккал/М	IC ₅₀ , мМ	Е, ккал/М	IC ₅₀ , мМ	Е, ккал/М	IC ₅₀ , мМ
Гентаміцин	-4,08	1,03	-6,78	0,01073	-7,45	0,00346
Ціанідин-3-О-глюкозид	-9,69	0,00007834	-11,42	0,00000426	-9,74	0,00007266

Таблиця 4

Результати дослідження молекулярного докінгу протигрибкової активності ціанідину-3-О-глюкозиду за ферментом 14α-деметилазою, 1,3-β-глюкагонсинтетазою, тимидилатсинтетазою

Сполука	14α-деметилаза		1,3-β-глюкагонсинтетаза		Тимидилатсинтетаза	
	Е, ккал/М	IC ₅₀ , мМ	Е, ккал/М	IC ₅₀ , мМ	Е, ккал/М	IC ₅₀ , мМ
Флуконазол	-8,53	0,00056	-7,71	0,00554	-9,12	0,0002
Ціанідин-3-О-глюкозид	-12,75	0,000000449	-12,56	0,000000625940	-10,02	0,00004541

Приклад 4.

Вивчали протимікробну та протигрибкову активність методом дифузії в агар по відношенню до наступних мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, та *Candida albicans* ATCC 6538/885.

Метод дифузії препарату в агар проводили "колодязями". Визначення активності антибактеріальних препаратів проводили на двох шарах щільного поживного середовища, розлитого в чашки Петрі. У нижньому шарі використали "голодні" не засіяні середовища (агар-агар, води, солі). Нижній шар є підкладкою з 10 мл "голодного агару", на яку строго горизонтально встановлюють 3-6 тонкостінних циліндрів з нержавіючої сталі діаметром 8 мм і заввишки 10 мм. Навколо циліндрів заливають верхній шар, що складається з поживного агаризованого середовища, розплавленого і охолодженого до 40 °С у яке вносили відповідний стандарт добової культури тест-штамів. Заздалегідь, верхній шар добре перемішувався до утворення однорідної маси. Після застигання циліндри стерильним пінцетом витягали і в лунки, що утворилися, поміщали випробовувані препарати, для порівняння результатів взяли контрольні стандарти - гентаміцин та флуконазол у концентрації 0,005 % та 0,30 %, відповідно, зразки лікарського засобу - екстракт листя ожини у концентрації фенольних сполук - 0,54 %.

Об'єм середовища для верхнього шару коливався від 14 до 16 мл. Чашки підсушували 30-40 хв. при кімнатній температурі і ставили в термостат на 18-24 годин.

При оцінці антимікробних та протигрибкових властивостей препаратів застосовували наступні критерії:

- відсутність зон затримки росту штамів навколо лунки, а також зони затримки до 10 мм вказує на те, що штами є не чутливими до внесеного в лунку досліджуваного препарату місцевої дії;
- зони затримки росту діаметром 10-15 мм вказують на малу чутливість штамів до препарату місцевої дії;
- зони затримки росту діаметром 15-25 мм розцінюються, як показник чутливості штамів до препарату місцевої дії;
- зони затримки росту, діаметр яких перевищує 25 мм, свідчить про високу чутливість штамів до препарату місцевої дії.

Для отримання достовірних даних для здійснення висновку відносно ефективності препаратів було зроблено три незалежних випробовування (число повторів досліджень). Дані випробувань антибактеріальної та протигрибкової активності викладені у таблиці 5.

Таблиця 5

Протимікробна і протигрибкова активність засобу з плодів ожини,
одержаним за заявленим способом

Препарат	Діаметри зон затримки росту в мм число повторів досліджень n=3					
	Staphylococcus aureus ATCC 25923	Escherichia coli ATCC 25922	Proteus vulgaris ATCC 4636	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Basillus Subtilis ATCC 6633	Candida albicans ATCC 653/885
Екстракт плодів ожини	30,00±0,20	30,00±0,20	23,00±0,20	24,00±0,20	34,00±0,20	25,00±0,20
Гентаміцин	22,00±0,20	25,33±0,33	25,00±0,20	25,67±0,67	24,50±0,20	12,00±0,20
Флуконазол	18,00±0,20	14,33±0,33	12,33±0,33	10,00±0,20	12,50±0,20	20,00±0,50

Згідно до отриманих теоретичних результатів дослідження молекулярного докінга антиоксидантної активності ціанідину-3-глюкозиду з активним центром НАДФН-оксиредуктазою, було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-глюкозиду був вище на 15,7 %, ніж у стандарта порівняння епігалокатехін-3-О-галату. (Таблиця 2).

При теоретичному дослідженні інгібування фермента миелопероксидази, рівень енергії зв'язку стандарту порівняння значно поступався ціанідину-3-глюкозиду. По результатам було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-глюкозиду був вище, ніж епігалокатехіну-3-О-галату на 31 %. (Таблиця 2).

При молекулярному докінгу ціанідину-3-глюкозиду з активним центром ксантин-оксиредуктазою, було встановлено, що рівень енергії зв'язку епігалокатехіну-3-О-галату з ферментом був вище на 12 %, ніж при порівнянні з ціанідину-3-глюкозиду, відповідно. (Таблиця 2).

Наведені дані у таблиці № 1 свідчать, що рівень антиоксидантної дії екстракту з плодів ожини був вище в 5,12 разів, ніж стандарт порівняння епігалокатехін-3-О-галату. Таким чином, можна зробити висновок, що екстракт з плодів ожини має антиоксидантну дію.

Згідно до отриманих теоретичних результатів дослідження молекулярного докінга протимікробної активності ціанідину-3-глюкозиду з активним центром ДНК-гірази, було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-глюкозиду був вище на 58 %, ніж у стандарта порівняння гентаміцину. (Таблиця 3).

При теоретичному дослідженні інгібування фермента ДГФР, рівень енергії зв'язку стандарту порівняння значно поступався ціанідину-3-глюкозиду. По результатам було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-глюкозиду був вище, ніж гентаміцину на 40,6 %. (Таблиця 3).

При молекулярному докінгу ціанідину-3-глюкозиду з активним центром деацетилазою, було встановлено, що рівень енергії зв'язку гентаміцину з ферментом був нижче на 76 %, ніж при порівнянні з ціанідином-3-глюкозидом. (Таблиця 3).

Наведені дані таблиці 5 свідчать про те, що екстракт плодів ожини здійснює активне пригнічення росту штамів: Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, Proteus vulgaris ATCC 4636, та Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853. Таким чином одержаний лікарський засіб, одержаний на основі БАР плодів ожини виявляє протимікробну дію відповідно до грам-позитивних та грам-негативних штамів бактерій.

Згідно до отриманих теоретичних результатів дослідження молекулярного докінга протигрибкової активності ціанідину-3-глюкозиду з активним центром 14α-деметилагою, було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-глюкозиду був вище на 33 %, ніж у стандарта порівняння флуконазолу. (Таблиця 4).

При теоретичному дослідженні інгібування фермента 1,3-β-глюкагонсинтетази, рівень енергії зв'язку стандарту порівняння поступався ціанідину-3-глюкозиду. По результатам було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-глюкозиду був вище, ніж флуконазолу на 40,6 %. (Таблиця 4).

При молекулярному докінгу ціанідину-3-глюкозиду з активним центром тимидилатсинтетазою, було встановлено, що рівень енергії зв'язку флуконазолу з ферментом був нижче на 81 %, ніж при порівнянні з ціанідином-3-глюкозидом. (Таблиця 4). Таким чином одержаний лікарський засіб, одержаний на основі БАР плодів ожини виявляє протигрибкову дію відповідно до штамів грибів.

Таким чином, заявлений спосіб одержання засобу антиоксидантною, протимікробною та протигрибковою дією з плодів ожини має наступні переваги:

1) простота та можливість проведення на стандартному обладнанні у промислових умовах України;

2) використання в якості екстрагента розчину етанолу, що робить спосіб доступним, екологічно безпечним, дешевим, таким що не вимагає роботи з отруйними та шкідливими для здоров'я людини реактивами;

3) наявність вираженої антиоксидантної, протимікробної та протигрибкової активності екстракту з

плодів ожини, одержаного за заявленим способом;

4) перспективність використання одержаного екстракту як лікарської субстанції для одержання різних лікарських форм.

Джерела інформації:

1. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019/Kevin S. Ikuta [et al.]/The Lancet. - 2022. - Mode of access: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)02185-7) (date of access: 05.04.2024).

2. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision / Felix Bongomin [et al.] // Journal of Fungi. - 2017. - Vol. 3, no. 4. - P. 57. - Mode of access: <https://doi.org/10.3390/jof3040057> (date of access: 05.04.2024).

3. Засіб з протизапальною та антимікробною дією: пат. 8568 Україна: А61К 36/49, А61К 9/08, А61Р 29/00, А61Р 31/00. № u200500032; заявл. 04.01.2005; опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8. 2 с.

4. Спосіб одержання суми поліфенолів з антимікробною та протизапальною дією з трави гравілату міського: пат. 94600 Україна: А61К 36/73, А61Р 31/04. № u201404265; заявл. 22.04.2014; опубл. 25.11.2014, Бюл. № 22. 4 с.

5. RCSB PDB: Homepage. RCSB PDB: Homepage. URL: <https://www.rcsb.org/> (date of access: 22.01.2022).

6. CASTp 3.0: Computed Atlas of Surface Topography of proteins. URL: <http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html?2011> (date of access: 22.01.2022).

7. PubChem. PubChem. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (date of access: 22.01.2022).