

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 брусниці звичайної (*Vaccinium vitis-idaea* L.).

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 поразенні 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 трьохкратної екстракції сировини гарячою водою ($t=95\text{ }^{\circ}\text{C}$) при співвідношенні сировини і екстрагенту 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.

Задачею винаходу є розробка способу одержання засобу з антиоксидантною, протимікробною та протигрибковою активністю з плодів брусниці звичайної.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі одержання засобу з антиоксидантною, протимікробною та протигрибковою дією з плодів брусниці звичайної, 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 брусниці звичайної містяться наступні фенольні сполуки: похідні антоціанів, флавоноїдів, гідроксикоричних та органічних кислот.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1.

100 г плодів брусниці звичайної 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 брусниці звичайної 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 епігалокатехін-3-О-галат.

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 брусниці звичайної додавали до електрохімічної комірки.

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./мг сух. зал.). Отримані дані при $n=3$ в кожному досліді обробляли статистично.

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

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

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;
 $E_{ethanol} = 0.0546 \cdot C\%$ - 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 $\times$ 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, ммоль/л	Антиоксидантна активність при $n=3$, ммоль-екв./г сух. ост.
Екстракт плодів брусниці	0,03	92,51 $\pm$ 1,00
Епігалокатехін-3-О-галат		30,78 $\pm$ 0,10

Приклад 3

Для теоретичної оцінки антиоксидантної, протимікробної та протигрибкової активності екстракту плодів брусниці звичайної було використано метод молекулярного докінгу. Для проведення цього дослідження було використано комп'ютерну програму Autodock 4.2 MGL Tools. Для дослідження антиоксидантної активності був вибраний - фермент нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат-оксиредуктаза (НАДФН-оксиредуктаза) (PDB ID: 5o0x), фермент миєлопероксидаза (PDB ID: 3f9p), та фермент - ксантин-оксиредуктаза (PDB ID: 1fiq), для дослідження протимікробної активності - дезоксирибонуклеїнова кислота гіраза (ДНК-гіраза) (PDB ID: 1kij), дигідрофолатредуктаза (ДФПР) (PDB ID: 1gx3), деацетилаза (утворення мембрани) (PDB ID: 3uhm), та протигрибкової дії - 14 α -деметилаза (PDB ID: 6a9b), 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-галактозид (CID_ 176457) та ціанідин-3-О-арабінозид (CID_91810602), оскільки дана сполука є головною у складі екстракту плодів брусниці звичайної, 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 - гентаміцин (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 ціанідин-3-О-галактозиду, ціанідин-3-О-арабінозиду 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-галактозид	-11,41	0,00000434	-5,48	0,09588	-8,81	0,00034752

Ціанідин-3-О-арабінозид	-13,12	0,00000023947	-6,83	0,00992	-9,55	0,00009964
-------------------------	--------	---------------	-------	---------	-------	------------

Таблиця 3

Результати дослідження молекулярного докінгу протимікробної активності ціанідин-3-О-галактозиду, ціанідин-3-О-арабінозиду за ферментом ДНК-гіразою, ДГФР, деацетилазою

Сполука	ДНК-гіраз		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-галактозид	-8,95	0,00027636	-10,32	0,00002726	-9,7	0,0000774
Ціанідин-3-О-арабінозид	-10,67	0,00001512	-11,12	0,00000709	-11,28	0,00000543

Таблиця 4

Результати дослідження молекулярного докінгу протигрибкової активності ціанідин-3-О-галактозиду, ціанідин-3-О-арабінозиду 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-галактозид	-12,42	0,00000079348	-12,05	0,00000146	-10,56	0,0000182
Ціанідин-3-О-арабінозид	-14,7	0,00000001688	-13,53	0,00000012022	-11,02	0,0000084

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 плодів брусниці звичайної у концентрації фенольних сполук - 0,52 %.

Об'єм середовища для верхнього шару коливався від 14 до 16 мл. Чашки підсушували 30-40 хв за кімнатної температури 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 випробування (число повторів досліджень). Дані випробувань антибактеріальної та протигрибкової активності викладені у таблиці 5.

Таблиця 5

Протимікробна і протигрибкова активність засобу з плодів брусниці звичайної, одержаного 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 брусниці звичайної	30,00±0,20	28,00±0,20	20,00±0,20	25,00±0,20	30,00±0,20	22,00±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 докінгу антиоксидантної активності ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідину-3-О-арабінозиду з активним центром НАДФН-оксиредуктазою, було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідину-3-О-арабінозиду був вище на 48 % та на 54 %, ніж у стандарті порівняння епігалокатехін-3-О-галату, відповідно. (Таблиця 2)

При теоретичному дослідженні інгібування ферменту мієлопероксидази, рівень енергії зв'язку стандарту порівняння значно поступався ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідину-3-О-арабінозиду. За результатами було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідину-3-О-арабінозиду був вище, ніж епігалокатехін-3-О-галату на 18 % та 34 %, відповідно. (Таблиця 2)

При молекулярному докінгу ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідин-3-О-арабінозиду з активним центром ксантин-оксиредуктазою, було встановлено, що рівень енергії зв'язку епігалокатехін-3-О-галату з ферментом був нижче на 83 %, ніж при порівнянні з ціанідину-3-О-галактозиду, а тим часом ціанідин-3-О-арабінозид мав енергію зв'язку на 34 % вище. (Таблиця 2)

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

Згідно з отриманими теоретичними результатами дослідження молекулярного докінгу протимікробної активності ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідин-3-О-арабінозиду з активним центром ДНК-гірази, було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідин-3-О-арабінозиду був вище на 54 % та 62 %, ніж у стандарті порівняння гентаміцину, відповідно. (Таблиця 3)

При теоретичному дослідженні інгібування фермента ДГФР, рівень енергії зв'язку стандарту порівняння значно поступався ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідин-3-О-арабінозиду. По результатам було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідин-3-О-арабінозиду був вище, ніж гентаміцину на 34 % і на 39 %, відповідно. (Таблиця 3)

При молекулярному докінгу ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідин-3-О-арабінозиду з активним центром деацетилазою, було встановлено, що рівень енергії зв'язку гентаміцину з ферментом був нижче на 77 % і 66 %, ніж при порівнянні з ціанідином-3-О-галактозидом та ціанідином-3-О-арабінозидом. (Таблиця 3)

Наведені дані таблиці 5 свідчать про те, що екстракт плодів брусниці звичайної 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 брусниці звичайної виявляє протимікробну дію відповідно до грампозитивних та грамнегативних штамів бактерій.

Згідно з отриманими теоретичними результатами дослідження молекулярного докінгу протигрибкової активності ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідин-3-О-арабінозиду з активним центром 14α-деметилазою, було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідину-3-О-арабінозиду був вище на 31 % та 42 %, ніж у стандарті порівняння флуконазолу. (Таблиця 4)

При теоретичному дослідженні інгібування ферменту 1,3-β-глюкагонсинтетази, рівень енергії зв'язку стандарту порівняння поступався ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідину-3-О-арабінозиду. За

результатами було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідин-3-О-арабінозиду був вище, ніж флуконазолу на 36 % та 43 %, відповідно. (Таблиця 4)

При молекулярному докінгу ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідин-3-О-арабінозиду з активним центром тимидилатсинтетазою, було встановлено, що рівень енергії зв'язку флуконазолу з ферментом був нижче на 84 % та 83 %, ніж при порівнянні з ціанідином-3-О-галактозидом та ціанідином-3-О-арабінозидом, відповідно. (Таблиця 4)

Наведені дані таблиці 5 свідчать про те, що екстракт плодів брусниці звичайної здійснює активне пригнічення росту штаму грибів *Candida albicans* ATCC 653/885. Таким чином одержаний лікарський засіб, одержаний на основі БАР плодів брусниці звичайної виявляє протигрибкову дію відповідно до штамів грибів.

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

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

2) використання як 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 брусниці звичайної, одержаного за заявленим способом;

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

Літературні джерела

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).