

Кривцова Марина Валеріївна,
доктор біологічних наук, професор,
завідувачка кафедри
клініко-лабораторної та морфофункціональної діагностики,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0000-0001-8454-2509
м. Ужгород, Україна

Гоблик Євген Іванович,
аспірант, кафедра генетики, фізіології рослин та мікробіології,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0009-0001-8033-5745
м. Ужгород, Україна

Колесник Анжела Володимирівна,
кандидат біологічних наук, доцент,
доцент кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0009-0008-9883-1879
м. Ужгород, Україна

Саламон Іван,
професор кафедри екології,
Пряшівський університет
ORCID ID: 0000-0001-5379-3989
Пряшів, Словаччина

Мігляр Володимир Гергійович,
кандидат медичних наук,
доцент кафедри клініко-лабораторної
та морфофункціональної діагностики
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0000-0001-6133-8257
м. Ужгород, Україна

Заячук Ілля Петрович,
кандидат медичних наук,
доцент кафедри клініко-лабораторної
та морфофункціональної діагностики
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0000-0001-8032-8337
м. Ужгород, Україна

Особливості фармацевтичної сировини лікарських рослин: фітохімічні та антимікробні властивості екстрактів *Achillea millefolium* L.

Вступ. Високі темпи розвитку антибіотикорезистентності мікроорганізмів, обумовлюють актуальність вивчення антимікробних властивостей речовин рослинного походження з метою пошуку альтернативних антимікробних засобів. Перспективними є дослідження з відбору рослин із оптимальним фітохімічним складом, як джерела високоякісної фармацевтичної сировини.

Метою роботи було вивчити антимікробні, антиоксидантні властивості та основні фітохімічні характеристики екстрактів *Achillea millefolium* L.

Рослини збирали на території Великоберезнянського району Закарпатської області, Україна. Отриману сировину (суцвіття) висушували до сталої маси з наступним виготовленням етилових та метилових екстрактів.

Для дослідження антимікробних властивостей екстрактів, використані клінічні ізоляти бактерій, виділені з ротової порожнини людей з запальними захворюваннями пародонту та слизової оболонки. Встановлено, що всі ізоляти були біоплівкотвірними. Антибіоплівкотвірну здатність екстрактів вивчали у стандартних 96 лункових планшетах спектрофотометричним методом. Визначення антиоксидантної активності екстрактів лікарських рослин проводили спектрофотометричним (DPPH) методом.

Як етиловий, так і метиловий екстракти *Achillea millefolium* L. показали високу антиоксидантну активність. Встановлено помірну антимікробну активність та високі антибіоплівкотвірні властивості екстрактів *Achillea millefolium* L. Дослідження фітохімічного складу показало високий вміст танінів у екстрактах.

Встановлені закономірності вказують на перспективність подальших досліджень використання екстрактів *Achillea millefolium* L. у складі комплексних засобів при запальних процесах ротової порожнини та ротоглотки.

Ключові слова: екстракти лікарських рослин, антимікробні властивості, фітосептики, антиоксидантні властивості, антибіоплівкотвірні властивості.

Kryvtsova Maryna Valeriivna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory and Morphofunctional Diagnostics, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0001-8454-2509, Uzhhorod, Ukraine

Hoblyk Yevhen Ivanovych, PhD Student at the Department of Genetics, Plant Physiology and Microbiology, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0009-0001-8033-5745, Uzhhorod, Ukraine

Kolesnyk Anzhela Volodymyrivna, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor at the Department of Genetics, Plant Physiology and Microbiology, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0009-0008-9883-1879, Uzhhorod, Ukraine

Salamon Ivan, Professor at the Department of Ecology, University of Presov, ORCID ID: 0000-0001-5379-3989, Pysašiv, Slovakia

Mihlyas Volodymyr Herhiiiovych, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor at the Department of Clinical Laboratory and Morphofunctional Diagnostics, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0001-6133-8257, Uzhhorod, Ukraine

Zayachuk Illia Petrovych, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor at the Department of Clinical Laboratory and Morphofunctional Diagnostics, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0001-8032-8337, Uzhhorod, Ukraine

Peculiarities of pharmaceutical feedstock from medicinal plants: antimicrobial and antibiofilm-forming activity of *Achillea millefolium* L. extracts

Introduction. The high rates of development of antibiotic resistance in microorganisms determine the relevance of studying the antimicrobial properties of substances of plant origin in order to find alternative antimicrobial agents. With this respect, studies on the selection of plants with optimal phytochemical composition as a source of high-quality pharmaceutical feedstock look very promising.

The aim of the study was to investigate the antimicrobial and antioxidant properties, and basic phytochemical characteristics of extracts of *Achillea millefolium* L.

The plants were collected from Velyky Berezny rayon (district), Zakarpatska oblast (Transcarpathia), Ukraine. The obtained feedstock (inflorescences) were dried to a constant weight, followed by the preparation of ethyl and methyl extracts.

To study the antimicrobial properties of the extracts, clinical isolates of bacteria isolated from the oral cavity of patients with inflammatory periodontal and mucosal diseases were used. All isolates were found to be biofilm-forming. The antibiofilm-forming ability of the extracts was studied in standard 96-well plates by the spectrophotometric method. The antioxidant activity of medicinal plant extracts was determined by the spectrophotometric (DPPH) method.

It appeared that both ethyl and methyl extracts of *Achillea millefolium* L. showed high antioxidant activity. In addition, moderate antimicrobial activity and high antibiofilm-forming properties of *Achillea millefolium* L. extracts were established during the experiments. The study of phytochemical composition revealed high contents of tannins in the extracts.

The established regularities are indicative of good prospects for further studies of the use of *Achillea millefolium* L. extracts as part of integrated remedies for inflammatory processes of the oral cavity and oropharynx.

Key words: extracts of medicinal plants, antimicrobial properties, phytoseptics, antioxidant properties, antibiofilm-forming properties.

Вступ. Зростаюча проблема формування резистентності мікроорганізмів до антибіотиків обумовлює актуальність пошуку альтернативних засобів протимікробної дії. Особлива привабливою в даному аспекті є рослинна сировина, що з давних часів використовувалась у народній медицині, володіє цілим рядом переваг, в тому числі антиоксидантною активністю, містить спектр біологічно активних речовин, мікро-та макроелементів. З огляду на здатність більшості опортуністичних штамів до формування біоплівки, що ускладнює протікання патологічного процесу та сприяє тривалій персистенції мікроорганізмів в організмі господаря, надзвичайно актуальним є вивчення антибіоплівкоутворюючих властивостей лікарських рослин.

Зокрема рослини родини *Asteraceae* традиційно використовуються у народній та офіційній медицині і є перспективними з точки зору антимікробної активності. Відомою лікарською рослиною родини *Asteraceae*, що використовується у традиційній та народній медицині є деревій звичайний *Achillea millefolium* L. Як лікарську сировину використовують суцвіття. Екстракти та настоянки характеризуються протизапальною, ранозагоювальною, антиалергічною дією. Разом з іншими рослинами у складі зборів, деревій використовують при лікуванні гастритів, стоматитів, виразковий хворобі шлунку. Широкий спектр біологічних властивостей обумовлений різноманітністю

хімічного складу рослинної сировини, зокрема вторинними метаболітами – ізопреноїдами, флавоноїдами, вітамінами [1, 2].

Особливої уваги заслуговує якість рослинної сировини як основи фітосептичних та інших препаратів на основі лікарських рослин. Варіативність фітохімічного складу рослин, зібраних у природі, її залежність від генетичних особливостей, хемотипу, ґрунтових та кліматичних умов, обумовлює актуальність вивчення та відбору кращих форм для отримання високоякісної сировини із визначеними фітохімічними властивостями, що є передумовою очікуваного терапевтичного ефекту. Відбір лікарських рослин із визначеними фітохімічними характеристиками, з наступним введенням в культуру, є перспективним напрямком досліджень сучасної фармації.

З огляду на відомі протизапальні властивості *Achillea millefolium* L., традиційне використання у медицині, актуальним є дослідження антимікробних та антибіоплівкотвірних властивостей екстрактів суцвіття на умовно патогенні бактерії.

Метою роботи було вивчити антимікробні, антиоксидантні властивості та основні фітохімічні характеристики екстрактів *Achillea millefolium* L.

Методологія та методи дослідження.

Рослини виду *Achillea millefolium* L. збирали на території Великоберезнянського району Закарпатської

області, Україна (рис. 1). Отриману сировину (суцвіття) висушували до сталої маси з наступним виготовленням етилових та метилових екстрактів.

Виготовлення екстрактів. Для виготовлення екстрактів сировину висушували до сталої маси, подрібнювали до порошкоподібної маси та екстрагували у колбі Ерленмеєра 96 % етанолом та метанолом (Sigma, Germany) відповідно до вимог Європейської Фармакопеї (співвідношення сировина/екстрагент 1:10) [3]. Отвір колби закривали харчовою плівкою, щоб уникнути випаровування. Після інкубації в ультразвуковій бані (Kraintek) при температурі 35 °C проціджували через фільтрувальний папір No. 1. Чистий розчин поміщали в випаровувальний пристрій (16-17/32" x 34-59/64" G5B, Coated Dry Ice Condenser Rotary Evaporator) для отримання чистого спиртового екстракту при температурі 50 °C, 82 обертів за хвилину. Після випаровування спирту на дні колби залишається чистий екстракт. Концентрація спирту після випаровування становила <1 %.

Дослідження антимікробних властивостей екстрактів. Чутливість мікроорганізмів до рослинних препаратів визначали методом дифузії в агар та визначенням мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) [4]. Для визначення МІК виготовляли розведення розчинів екстрактів рослин у м'ясо-пептонному агарі (МПА) з концентрацією від 100; 75; 50; 25; 22,5; 20; 17,5; 15; 12,5; 10; 7,5; 5; 2,75; 2,5; 2,25; 2 мг/мл. У кожну пробірку вносили бактеріальну суспензію у кількості 100 мкл, що відповідає 0,5 стандарту МакФарланда ($1,5 \times 10^8$ КУО/мл) із 24-годинної культури мікроорганізмів у стерильному фізіологічному розчині. Пробірки інкубували при 37 °C протягом 24 год. при культивуванні бактерій та 35 °C протягом 48 год. при культивуванні мікроскопічних грибів. Після інкубації проводили висів із кожної пробірки на м'ясо-пептонний агар (МПА). При визначенні МІК враховували останнє розведення, де не спостерігали росту культури. Негативні контролю: бактеріальна суспензія+диметилсульфоксид; бактеріальна суспензія+ відповідний спирт.

У якості тест культур були використані референтні штами та культури ізольовані з ротової порожнини

людей із запальними захворюваннями пародонту. У дослідженні використані ізоляти із множинною резистентністю до антибіотиків.

Вивчення деструкції бактеріальної біоплівки під впливом речовин рослинного походження. Здатність до деструкції бактеріальної біоплівки проводили у 96-лункових мікропланшетах (Greiner-BioOne, Austria) згідно методики [5].

Визначення антиоксидантної активності. Визначення антиоксидантної активності екстрактів лікарських рослин та ефірних олій проводили спектрофотометричним (DPPH) методом. Визначення танінів здійснювали спектрофотометрично [6]. Загальну кількість флавоноїдів визначена алюмінієм хлорид спектрофотометричним методом [7].

Для статистичної обробки результатів експерименту використовували статистичне програмне забезпечення Microsoft Office-Excel (2013) з обчисленням значення середнього, похибки та стандартного відхилення.

Виклад основного матеріалу дослідження. Визначення фітохімічного складу екстрактів проводили за вмістом танінів і флавоноїдів. Визначення даних показників показало вищий рівень танінів у етиловому екстракті. Вміст флавоноїдів складав 0,03 % на 100 г екстракту і не відрізнявся за вмістом у етиловому та метиловому екстрактах. В то же час за рівнем флавоноїдів екстракти не відрізнялись. Встановлена висока антиоксидантна активність обох екстрактів (табл. 1), яка була статистично достовірно вищою у метиловому екстракті.

Високий рівень танінів обумовлює перспективність застосування екстрактів у складі засобів із в'язучим, протизапальним та антиоксидантним ефектом.

Антимікробну активність визначали методом дифузії в агар та визначенням МІК екстрактів. Відмічали помірний рівень антимікробної активності щодо грам-позитивних та грамнегативних бактерій, що характеризуються високим рівнем резистентності до антибіотиків (одночасна стійкість до цефалоспоринових, макролідів та карбапенемів) та мають біоплівкотвірну здатність (табл. 2). Антимікотичної активності екстрактів нами не виявлено. Найвиразнішу дію екстрактів спостері-



Рис. 1. Популяція та суха маса *Achillea millefolium* L.

Таблиця 1

Фітохімічний аналіз та антиоксидантна активність екстрактів *Achillea millefolium* L., $\bar{x} \pm SD$

Етиловий екстракт	Метиловий екстракт
Таніни, % на 100 г екстракту	
1,26±0,1	0,76±0,3
Флавоноїди, % на 100 г екстракту	
0,03±0,001	0,03±0,002
Антиоксидантна активність, %	
86,62±0,4 ^c	79,52±1,0

Таблиця 2

Антимікробна активність екстрактів *Achillea millefolium* L. методом дифузії в агар, зони затримки росту, мм, діаметр лунки 6 мм (n=3, $\bar{x} \pm SD$)

Тест культури	Етиловий екстракт	Метиловий екстракт
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	10,33±0,58*	10,67±0,58*
<i>S.aureus</i> CCM 4223	9,33±0,58*	9,83±0,29*
<i>S.aureus</i> MRSA клінічний ізолят	9,50±0,5*	10,33±0,29*
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	8,33±0,58*	8,67±0,58*
<i>Streptococcus pyogenes</i> клінічний ізолят	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12,17±0,29*	12,33±0,58*
<i>Escherichia coli</i> клінічний ізолят	9,17±0,29*	9,33±0,58*
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	12,67±0,58*	12,33±0,58*
<i>Enterococcus faecalis</i> клінічний ізолят	13,67±0,58*	12,33±0,58*
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	-	-
<i>Candida albicans</i> клінічний ізолят	-	-

Примітка:

* дані статистично достовірні у порівнянні з контролем ($P < 0,05$);

«-» зона затримки зони відсутня;

у якості контролю використовували екстрагент (етанол або метанол);

контроль етанолу – зона затримки росту відсутня;

контроль метанолу – зона затримки росту відсутня;

Таблиця 3

Антимікробна активність екстрактів *Achillea millefolium* L. щодо референтних штамів мікроорганізмів, $\bar{x} \pm SD$, мг/мл

<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>C. albicans</i> ATCC 885-653
Етиловий екстракт				
14,17±2,10	14,3±1,60	9,17±1,40	14,7±2,10	17,5 ± 0,50
Метиловий екстракт				
17,42±0,38	12,42±0,14	20,25±0,10	20,25±0,25	15,41 ± 0,22

Примітка: «-» – відсутність інгібуючого ефекту; дані статистично достовірно відрізняються у порівнянні з контролем етанол та метанол ($P < 0,05$);

гали щодо ізолятів *Enterococcus faecalis*. Не виявлено достовірної різниці між впливом метилового та етилового екстрактів.

Аналогічні тенденції були встановлені й при визначенні мінімальних інгібуючих концентрацій екстрактів щодо референтних та клінічних штамів мікроорганізмів (табл. 3-4). Нижчі концентрації МІК екстрактів встановлені для референтних штамів, водночас МІК для клінічних штамів був вищим. До прикладу, МІК етилового екстракту щодо референтного штаму *S. aureus* становив 14,17±2,1 мг/мл, а щодо клінічного 20,17±0,29 мг/мл. Найвиразніший антимікробний ефект етилового екстракту *Achillea millefolium* L. встановлено щодо *E. faecalis*, *S. pyogenes*.

Виявлено високу антибіоплівкоформуєчу активність етилового екстракту *Achillea millefolium* L. (табл. 5). Так внесення 0,1 % розчину екстракту знижувало формування біоплівки на 92 %. Із зниженням концентрації екстракту антибіоплівкотвірна здатність поступово знижувалась. Аналогічну тенденцію реєстрували для метилового екстракту, проте його активність була дещо нижчою. Так 0,1% розчин екстракту знижував інтенсивність утворення біоплівки на 80,42% (табл. 5). Отже виявлена висока антибіоплівкотвірна активність екстрактів *Achillea millefolium* L. При цьому етиловий екстракт проявляв вищу активність ніж метиловий. Виявлені тенденції обумовлюють перспективу застосування екстрактів *Achillea millefolium* L. у складі

**Антимікробна активність етилових екстрактів екстрактів *Achillea millefolium* L.
щодо клінічних ізолятів мікроорганізмів, $\bar{x} \pm SD$, мг/мл**

<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>C.albicans</i>
Етиловий екстракт				
20,17±0,29	24,17±1,44	10,83±1,44	15,17±0,29	17,33 ± 0,08
Метиловий екстракт				
17,5±0,29	17,25±0,43	-	-	15,41 ± 0,38

Примітка: «-» – відсутність інгібуючого ефекту; дані статистично достовірно відрізняються у порівнянні з контролем етанол та метанол ($P < 0,05$);

**Антибіоплівкотвірна здатність екстрактів *Achillea millefolium* L.,
% декструкції біоплівки клінічних штамів *S.aureus***

Екстракт	Концентрації екстрактів, %		
	0,01	0,05	0,1
<i>Achillea millefolium</i> L. етиловий екстракт	22,00	52,69	92,00
<i>Achillea millefolium</i> L. метиловий екстракт	60,00	76,00	80,42

комплексних антимікробних препаратів з антибіоплівкотвірною активністю.

Виявлена дія екстрактів щодо біоплівки клінічних ізолятів бактерій, які ізольовані із ротової порожнини людей з запальними захворюваннями пародонту, вказує на перспективність їх використання для створення засобів догляду за ротовою порожниною. Антибіоплікоутворюючі властивості екстрактів є особливо привабливими для профілактики запальних захворювань пародонту, оскільки більшість мікроорганізмів ротової порожнини є біоплівкотвірними. Висока антиоксидантна активність екстрактів у поєднанні з антибіоплівкотвірними та антимікробними властивостями є надзвичайно цінними для лікування запальних процесів слизової оболонки.

Виявлений високий вміст танінів у екстрактах також привертає увагу до екстракту *Achillea millefolium* L. як перспективного засобу з проти-запальними та протизапальними властивостями за умов впливу на слизову оболонку. Аспекти використання танінів у медицині зумовлені, в першу чергу, їх в'язучою, протизапальною та антимікробною дією. Запропоновані різні механізми пояснення протимікробної активності таніну, включаючи інгібуючу дію

позаклітинних мікробних ферментів, прямий вплив на мікробний метаболізм через інгібування окисного фосфорилування та механізм, пов'язаний із зв'язуванням заліза [8]. Флавоноїди, є цінними при використанні у медицині як засоби, що володіють антиоксидантною активністю [9].

У наших попередніх дослідженнях була показана антимікробна, антибіоплівкотвірна активність інших речовин рослинного походження на ізоляти ротової порожнини, що обумовлює перспективу створення комплексних препаратів на основі лікарських рослин [10, 11].

Висновки з дослідження. Показано високу антибіоплівкотвірну здатність екстрактів лікарських рослин *Achillea millefolium* L. з високим вмістом танінів та антиоксидантною активністю щодо біоплівки, сформованої клінічними біоплівкотвірними ізолятами. Висока антиоксидантна активність екстрактів, вміст танінів та флавоноїдів обумовлює перспективу застосування екстрактів *Achillea millefolium* L. із вказаними фітохімічними характеристиками у складі фітосептичних засобів з антимікробними та протизапальними властивостями за умов запальних процесів слизової оболонки ротової порожнини та тканин пародонту.

REFERENCES

1. El-Kalamouni C, Venskutonis P, Zebib B, Merah O, Raynaud C, Talou T. Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oil of *Achillea millefolium* L. Grown in France. *Medicines*, 2017;4(2):30. doi:10.3390/medicines4020030
2. Antibacterial Activity of Water and Alcoholic Crude Extract of Flower *Achillea millefolium* L. *Rafidain Journal of Science*. 2011;22(5):11-20. doi: 10.33899/rjs.2011.6518
3. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11th Edition (Books (11.0 – 11.1- 11.2), ISBN: 978-92-871-9105-2, Language: English).
4. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2016;6(2):71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
5. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments*, 2011;47. doi: 10.3791/2437
6. Galvão MAM, Arruda AO de, Bezerra ICF, Ferreira MRA, Soares LAL. Evaluation of the Folin-Ciocalteu method and quantification of total tannins in stem barks and pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) L. P. Queiroz. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2018;61. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018170586>

-
7. Koolen HHF, da Silva FMA, Gozzo FC, de Souza AQL, de Souza ADL. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L.) by UPLC–ESI-MS/MS. *Food Research International*, 2013; 51(2): 467-473. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.039>
 8. Ekambaram SP, Perumal SS, Balakrishnan A. Scope of Hydrolysable Tannins as Possible Antimicrobial Agent. *Phytotherapy Research*. Wiley, 2016;30(7):1035-1045. doi: 10.1002/ptr.5616
 9. Joshi B, Panda SK, Jouneghani RS, Liu M, Parajuli N, Leyssen P, Neyts J, Luyten W. Antibacterial, antifungal, antiviral, and anthelmintic activities of medicinal plants of nepal selected based on ethnobotanical evidence. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020:1043471.
 10. Kryvtsova MV, Trush K, Eftimova J, Koščová J, Spivak M.J. Antimicrobial, antioxidant and some biochemical properties of *Vaccinium vitis-idea* L. *Mikrobiolohichni Zhurnal*. 2019;3:40-52. <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.03.040>
 11. Kryvtsova MV, Kostenko YeYa, Salamon I. Compositions of essential oils with antimicrobial properties against isolates from oral cavities of patients with inflammatory diseases of parodontium. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2018;9(4):491-494. doi: 10.15421/021873