

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 151661

СПОСІБ ОТРИМАННЯ КОМПОЗИЦІЇ ІНГРЕДІЄНТІВ
ФІТОБІОТИКА "РЕК-VITIS-LAK"

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі України корисних моделей
25.08.2022.

В.о. Генерального директора
Державного підприємства
«Український інститут
інтелектуальної власності»

О.В. Опанасенко



Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до мікробіології, і стосується способів отримання композицій для корекції мікробіоти організму людини, що використовуються у складі фітобіотику, який може бути застосований в умовах персистенції умовно-патогенних мікроорганізмів, в тому числі множинно антибіотикорезистентних.

5 В умовах зростаючої тенденції до формування антибіотикорезистентних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів, потреба у розробці нових способів отримання композицій та способів корекції факультативної мікробіоти організму невпинно зростає. Відомий антибактеріальний та антимікозний ефект антибіотиків і хіміопрепаратів, до яких мікробіота швидко набуває стійкості та порушує рівновагу мікробіоценозу організму людини. За таких умов актуальною є розробка способів корекції мікробіоти організму людини із використанням препаратів, що пригнічують популяційний рівень умовно-патогенних мікроорганізмів та водночас створюють умови для відновлення порушеного мікробіоценозу. Привабливими в даному аспекті можуть бути рослинні препарати, що мають певний спектр антимікробної дії, не викликають порушень у складі мікробіоти та одночасно характеризуються високими протизапальними і регенеративними властивостями, покращують місцевий імунний захист і не створюють передумови для розвитку індигенної мікрофлори та мають антиоксидантну властивість. Водночас антагоністична активність пробіотичних препаратів створює передумови для розвитку індигенної мікробіоти.

Відомо, що *Vaccinium vitis-idaea* L. має антимікробний ефект на мікроорганізми, ізольовані із ротової порожнини людей, зокрема *Streptococcus mutans* та *Fusobacterium nucleatum*. Виявлена також антимікробна дія екстрактів рослини *Matricaria recutita* L., на *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum* [1, 2, 3]. Відомим є широке використання пробіотиків (Лактовіт, Лактіале, Субалін та ін.) для корекції мікробіоти, проте їх комбінація з фітопрепаратами не застосовувалась як засіб антимікробної дії і відновлення мікробіоти при дисбіозах. Є спосіб отримання композиції для догляду за ротовою порожниною при запальних захворюваннях пародонту на основі речовин рослинного походження, що має антимікробні, антибіоплівкотвірні, антиоксидантні та протизапальні властивості і може бути використаний для тривалого використання при запальних захворюваннях пародонту [4]. Недоліком отриманої композиції, в процесі реалізації способу є вузькоспрямована дія лише на ротову порожнину при запальних захворюваннях пародонту.

Найближчим аналогом за технічною суттю та ефектом, який досягається, є композиція інгредієнтів фітобіотику "VITIS-LACT", яка забезпечує поєднання пробіотичних штамів і рослинних компонентів при створенні пробіотика, проте немає відомостей про антимікробну активність екстрактів на штами бактеріальних культур, що використовуються при розробці пробіотика [5].

Технічний результат, який забезпечує корисна модель, що заявляється - полягає у розробці способу отримання композиції інгредієнтів фітобіотику "REK-VITIS-LAK" на основі поєднання етанолового фітоекстракту *Vaccinium vitis-idaea* L. і *Matricaria recutita* L., що мають антимікробну активність, в тому числі на збудників опортуністичних інфекцій та пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), що створює передумови для відновлення індигенної мікробіоти.

Задача корисної моделі полягає в розробці способу отримання композиції інгредієнтів фітобіотику із фітоекстракту, який має антимікробні протизапальні, абсорбційні, антиоксидантні, антитоксичні й антиалергічні властивості, а також пробіотичного штаму, що характеризується антагоністичною активністю щодо умовно-патогенних мікроорганізмів.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі отримання композиції інгредієнтів фітобіотику, що включає застосування ромашки лікарської та брусниці звичайної, згідно з корисною моделлю, використовують квіти *Matricaria recutita* L. та листя *Vaccinium vitis-idaea* L., які висушують до сталої маси, беруть 10 г сухої рослинної сировини при співвідношенні 1:1 і подрібнюють до порошкоподібної маси та екстрагують у колбі Ерленмаєра 96 % етиловим спиртом при кімнатній температурі у співвідношенні сировина/екстрагент 1:20, при цьому отвір колби закривають харчовою плівкою, для того, щоб уникнути випаровування, після інкубації протягом 30 хвилин в ультразвуковій бані при температурі 35 °C проціджують через фільтрувальний папір, чистий розчин поміщають у випарувальний пристрій для отримання чистого спиртового екстракту при температурі 50 °C та з числом 82 обертів за хвилину, після випаровування спирту на дні колби залишається чистий екстракт, до якого додають 10 мл етилового спирту і 5×10^9 КУО/мл пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), при цьому склад суміші має наступне співвідношення інгредієнтів:

екстракт квітів <i>Matricaria recutita</i> L.	2,503 г;
екстракт листя <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	12,5 г;
пробіотичний штам <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	5×10 ⁹ КУО/мл;
етиловий спирт	10 мл.

Для проведення досліджень використовували типові музейні культури ATCC (American Type Culture Collection, USA) *Candida albicans* ATCC 885-653; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19615, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 та клінічні культури ізольовані із ротової порожнини людей із запальними захворюваннями пародонтиту *S. aureus*, *E.coli*, *S. pyogenes*, *E.faecalis*, *C.albicans*. Для експериментів були відібрані клінічні ізоляти, що характеризувались стійкістю до 10 та більше антибіотиків.

Чутливість мікроорганізмів до екстрактів визначали методом дифузії в агар (діаметр лунки 6 мм) [6]. Інокуляції бактерій або мікроскопічних грибів у кількості 0,1 мл у фізіологічному стерильному розчині відповідно 0,5 Mc Farland стандарту висівали на Мюллер-Хінтон агар для бактерій та Сабуро агар для грибів роду *Candida*. Досліджуваний фітопрепарат вносили в лунку у кількості 20 мкл. Облік результатів проводили через 24 години після інкубації у термостаті при температурі 35 °С для мікроскопічних грибів. Діаметр зон затримки росту вимірювали у мм, включаючи діаметр лунки. Всі досліді проводили у 3-и кратній повторності.

У дослідженні був використаний пробіотичний штам *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) [7]. Використання даного штаму обумовлено сукупністю позитивних ефектів на організм людини. Хороші технологічні характеристики мікроорганізмів *Lactobacillus rhamnosus*, а саме хороша стійкість до етанолу високих значень рН, дії температур, висушування - забезпечують можливість його застосування у виробництві.

Антагоністичну активність *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) досліджували методом відстроченого антагонізму (перпендикулярних штрихів). Оцінку результатів здійснювали за величиною зон затримки росту та здатністю пробіотичного штаму затримувати ріст тест-штамів мікроорганізмів [8].

Антиоксидантну активність досліджували методом колориметрії вільних радикалів, який ґрунтується на реакції ОРРН (2,2-дифеніл-1-пикрилгідразил, розчиненого в метанолі, з взірцем антиоксиданту (токоферол), що протікає за схемою: ОРРН*+АН→ОРРН-Н+А*. Реакція контролювалась за зміною оптичної густини методом спектрометричного аналізу із використанням спектрофотометру spectrophotometer Beckman Coulter DU 530.

На основі проведених досліджень та скринінгового відбору фітоекстрактів із врахуванням їх антимікробної активності розроблено спосіб отримання композиції інгредієнтів фітобіотику. Склад фітобіотику включає фітоекстракт *Matricaria recutita* L., *Vaccinium vitis-idaea* L. та пробіотичний штам *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103). Виготовляли етиловий екстракт квітів *Matricaria recutita* L. та листків *Vaccinium vitis-idaea* L. Брали 10 г сухої рослинної сировини при співвідношенні 1:1 та подрібнювали до стану порошкоподібної маси. В колбі Ерленмаєра змішували 10 г рослинної сировини та 200 мл 96 % етилового спирту. Отвір колби закривали харчовою плівкою для того, щоб уникнути випаровування. Після інкубації протягом 30 хвилин в ультразвуковій бані (KRAINTEK) при температурі 35 °С проціджували через фільтрувальний папір. Чистий розчин поміщали у випаровувальний пристрій [16-17/32* x 34-59/64* G 5 B, Coated Ori Ice Condenser Rotari Evaporator], для отримання чистого спиртового екстракту, при температурі 50 °С, та з числом 82 обертів за хвилину. Після випаровування спирту, на дні колби залишається чистий спиртовий екстракт, до якого додають 10 мл етилового спирту. Чистого екстракту у 10 мл (етиловий екстракт): квіти ромашки лікарської. *Matricaria recutita* L. - 2,503 г листки бруслиці звичайної *Vaccinium vitis-idaea* L. - 12,50 г.

В табл. 1 представлена антибактеріальна активність екстрактів квітів *Matricaria recutita* L. та листків *Vaccinium vitis-idaea* L. на типові та клінічні ізоляти збудників опортуністичних інфекцій.

Таблиця 1

Результати вивчення антимікробної активності ромашки лікарської *Matricaria recutita* L., брусниці звичайної *Vaccinium vitis-idaea* L. (квіти, листки), мм, (X±S)

Тест культура	<i>Matricaria recutita</i> L. (квіти)	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. (листки)
<i>S. aureus</i> ATCC 25293	16,35±0,50	15,98±0,56
<i>S. aureus</i> клінічний	19,33±0,78	9,8±0,50
<i>S. aureus</i> MRS A	20,0±1,54	15,76±0,57
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7,33±0,86	7,16±0,46
<i>E. coli</i>	-	-
<i>E. faecalis</i>	7,58±0,81	7,13±0,78
<i>B. subtilis</i>	18,46±1,37	19,61±0,46
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	20,76±1,06	14,48±0,49
<i>C. albicans</i> ATCC 885-653	20,84±1,12	14,76±0,51

«-» відсутність затримки росту.

Показано, що екстракти квітів ромашки, так як і листків брусниці проявляли антимікробну активність на *Staphylococcus aureus*, зокрема, найвищу антимікробну дію мав етиловий екстракт квітів *Matricaria recutita* L. Слід відмітити, що екстракт квітів ромашки лікарської і листків брусниці звичайної мали антимікробну активність як на типові, так і на клінічні ізоляти *Staphylococcus aureus*, в тому числі оксацилінрезистентні. Виявлена висока антимікробна й антимікотична активність етанолового екстракту квітів ромашки лікарської *Matricaria recutita* L. на *Streptococcus pyogenes*, та *Candida albicans* ATCC 885-653. Встановлена більш низька антимікробна й антимікотична активність етанолового екстракту листків брусниці звичайної *Vaccinium vitis-idaea* L. порівняно з етаноловим екстрактом квітів ромашки лікарської *Matricaria recutita* L. на *Streptococcus pyogenes* і *Candida albicans* ATCC 885-6. Виявлено, що як етаноловий екстракт квітів ромашки лікарської, так і етаноловий екстракт листків брусниці звичайної мали середню антимікробну активність на *Enterococcus faecalis*.

Встановлено, що етанолові екстракти квітів ромашки лікарської і листків брусниці звичайної не проявляли антимікробної активності щодо пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) (табл. 2). Реєстрували повну відсутність затримки росту у випадку використання екстракту квітів ромашки і низький рівень антимікробної активності при використанні екстракту листків брусниці звичайної.

Таблиця 2

Результати вивчення антимікробної активності ромашки лікарської *Matricaria recutita* L., та брусниці звичайної *Vaccinium vitis-idaea* L. (квіти, листки) на пробіотичний штам *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), мм (X±S)

Тест культура	<i>Matricaria recutita</i> L. (квіти етанол)	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. (листки етанол)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	-	7,28±0,47

«-» відсутність затримки росту

Виявлена антагоністична активність *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) на умовно-патогенні мікроорганізми (табл. 3). Корисні властивості даного штаму обумовлені також антагоністичною дією відносно патогенних мікроорганізмів, зокрема *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, що пов'язано з продукуванням лактобацилами *L. reuteri* реутерину і реутероцикліну, що інгібують ріст патогенів [9]. Штам є непатогенним та нетоксичним резистентним до антибіотиків, фагів тощо.

Таблиця 3

Антагоністична активність *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (X±S)

Тест культури	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103
<i>S. aureus</i> ATCC 2523	21,31±0,56
<i>S. aureus</i> клінічний	11,76±0,61
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	16,81±0,74
<i>S. viridans</i> клінічний	24,11±0,57
<i>E. coli</i> ATCC 25922	18,41±0,59
<i>K. rhinoschermatis</i> клінічний	6,18±0,31
<i>C. albicans</i> ATCC 885-653	8,84±0,56
<i>C. albicans</i> клінічний	7,92±0,65

5 Виявлена не тільки висока антимікробна, але й антиоксидантна активність (табл. 4) екстрактів квітів і листків та відсутність антимікробної дії щодо пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, що має антагоністичну активність щодо умовно-патогенних мікроорганізмів, обумовлює доцільність їх комплексного застосування як основи фітобіотики. Синергізм дії рослинних компонентів та бактерій може бути обумовлений тим, що *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 продукує реутерин і реутероциклін, які інгібують ріст широкого спектра патогенів [9].

Таблиця 4

Антиоксидантна активність етанолового екстракту *Matricaria recutita* L. та *Vaccinium vitis-idaea* L. (квітів, листків), %

Рослина	Оптична густина	%
<i>Matricaria recutita</i> L. (квіти)	0,491	97,16
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. (листки)	0,072	82,7

10 Корисна модель може використовуватись в медицині як засіб для корекції мікробіоти організму людини.

Джерела інформації:

1. Karcheva-Bahehevaska D. Therapeutic effects of anthocyanins from *Vaccinium* genus L. / D. Karcheva-Bahehevaska, P. Lukova, M. Nikolova, R. Mladenov, 15 *International Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences*, 2017-P.1-9. DOI:10.5281/zenodo.89201.
2. Laslo E. Phenol Content and Antimicrobial Activity of Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) from Several Areas in the Eastern Carpathians // E. Laslo, Z. Kobolkuti, A. Total // *Naturale Scientia Biological*, 2017. - № 9(1). - P.77. DOI:10.15635/nsb.9110035.
3. Кобзар А.Я. Фармакогнозія в медицині. - К.: Медицина, 2007. - 544 с.
4. Пат. 149894 UA, МПК А61К 36/00, А61Q 11/00. Спосіб отримання композиції для догляду за ротовою порожниною при запальних захворюваннях пародонту/ Кривцова Марина Валеріївна (UA); Саламон Іван (SK); Костенко Євген Якович (UA); Співак Микола Якович (UA). - № U202101123; заяв. 09.03.2021, опуб. 15.12.2021, Бюл. № 50.
5. Пат. 135936 А, UA МПК А61К 131/00 (2006.01) Композиція інгредієнтів фітобіотики "VITIS-LACT" /Кривцова М.В., Тимошок І.О., Співак М.Я., Калиниченко С.В. - № u201901612; заяв. 18.02.2019, опуб. 25.07.2019, Бюл. № 14. - Найближчий аналог.
6. Baloniri M/ Methods for in Vitro evaluating antimicrobial activity: A review. / M. Baloniri, M. Sadiki, 30 *S.K. / busonda //Journal of pharmaceutical analysis*, DOI:10.1016/J. Jpha. 2015, 11 005.
7. Лактіале GG: інструкція по застосуванню, <https://com-penolium.com.ua/dec>.
8. Иркитова А.Н. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий. Известия Алтайского государственного университета, 2012. - С. 41-44.
9. Стрільчук Л. Мікробіом порожнини рота та його роль у підтриманні загального і стоматологічного здоров'я // Медична газета "Здоров'я України 21 сторіччя" - 2021. - № 4 (497).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб отримання композиції інгредієнтів фітобіотику, що включає застосування ромашки лікарської та брусниці звичайної, який відрізняється тим, що використовують квіти *Matricaria recutita* L. та листя *Vaccinium vitisidaea* L., які висушують до сталої маси, беруть 10 г сухої рослинної сировини при співвідношенні 1:1 і подрібнюють до порошкоподібної маси та екстрагують у колбі Ерленмасра 96% етиловим спиртом при кімнатній температурі у співвідношенні сировина/екстрагент 1:20, при цьому отвір колби закривають харчовою плівкою для того, щоб уникнути випаровування, після інкубації протягом 30 хвилин в ультразвуковій бані при температурі 35 °С проціджують через фільтрувальний папір, чистий розчин поміщають у 10 випаровувальний пристрій для отримання чистого спиртового екстракту при температурі 50 °С та з числом обертів 82 за хвилину, після випаровування спирту на дні колби залишається чистий екстракт, до якого додають 10 мл етилового спирту і 5×10^9 КУО/мл пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), при цьому склад суміші має наступне співвідношенні
- 15 інгредієнтів:
- | | |
|--|------------------------|
| екстракт квітів <i>Matricaria recutita</i> L. | 2,503 г |
| екстракт листя <i>Vaccinium vitisidaea</i> L. | 12,5 г |
| пробіотичний штам <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103) | 5×10^9 КУО/мл |
| етиловий спирт | 10 мл. |