ПРОТИГРИБКОВА АКТИВНІСТЬ ЛІПОФІЛЬНИХ ФРАКЦІЙ РОСЛИН РОДУ *GALIUM*. ПОВІДОМЛЕННЯ 3

Н.В.Кашпур, О.В.Горяча*, Т.В.Ільїна*, А.М.Ковальова*, А.Ю.Волянський, Т.П.Осолодченко

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова НАМН України»
Національний фармацевтичний університет*

Ключові слова: підмаренники; ліпофільні фракції; гриби; протигрибкова активність; фенольні сполуки; терпеноїди

Досліджено протигрибкову активність хлороформних та етилацетатно-спиртових (8:2) фракцій підмаренника справжнього (Galium verum L.), підмаренника верболистого (Galium salicifolium Klok.) та підмаренника хрещатого (Galium cruciata (L.) Scop.) по відношенню до 7 тест-штамів грибів: Geotriichum candidum (Galactomyces geotrichum) Скляр 9, Zygosaccharo spp. 40 b/2, Cryptococcus neoformans 32609, Rhodoflorula glutinis F-129, Picha anomala 40, Kluveromyces lactis F 116, Aspergillus niger 704. Встановлено, що по відношенню до Zygosaccharo spp. та A. niger протигрибкову дію проявили всі досліджувані фракції. По відношенню до G. candidum активними були фракції підмаренника справжнього та підмаренника хрещатого. По відношенню до C. neoformans жодна з досліджуваних фракцій не була активною. По відношенню до Rh.glutinis, K. lactis та P. anomala незначну активність проявили етилацетатно-спиртові фракції підмаренника верболистого, підмаренника справжнього та хлороформна фракція підмаренника хрещатого відповідно. Виявлено залежність між вмістом суми основних груп БАР у досліджуваних фракціях підмаренників та рівнем їх протигрибкової активності.

Останнім часом зросла актуальність проблеми мікозів у пацієнтів різного профілю у зв'язку зі збільшенням інтенсивності впливу на організм людини зовнішніх факторів, що викликають порушення в системі антимікотичного захисту [9-12].

Продовжуючи дослідження протигрибкової активності ліпофільних фракцій підмаренників [6, 7], приводимо результати дослідження протигрибкової активності ліпофільних комплексів біологічно активних речовин (БАР), отриманих з видів роду підмаренник (*Galium* L.) родини маренові (*Rubiaceae*) відносно тест-штамів грибів, які не відносяться до роду *Candida*.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були хлороформні та етилацетатно-спиртові (8:2) фракції, отримані методом послідовної циркуляційної екстракції сировини в апараті Сокслета у порядку зростання полярності розчинників, з повітряно-сухих надземних частин підмаренника справжнього (*Galium verum* L.), підмаренника верболистого (*Galium salicifolium* Klok.) та підмаренника хрещатого (*Galium cruciata* (L.) Scop.), заготовлених у фазу цвітіння влітку 2010 р.

Протигрибкову активність отриманих фракцій вивчали на 7 тест-штамах: *Geotriichum candidum (Galactomyces geotrichum)* Скляр 9, *Zygosaccharo spp.* 40 *b*/2, *Cryptococcus neoformans* 32609, *Rhodoflorula glutinis F*-129, *Picha anomala* 40, *Kluveromyces lactis F* 116, *Aspergillus niger* 704.

Дослідження протигрибкової активності проводилось методом дифузії в агар (метод «колодязів») [8]. Ступінь чутливості грибів стосовно досліджуваних фракцій оцінювали за розміром зон затримки росту. Мікробне навантаження складало 10^7 мікробних клітин на 1 мл середовища і визначалось візуально за оптичним стандартом каламутності McFarland.

Для визначення протигрибкової активності субстанцій використовували середовище Сабуро. Кожну серію поживного середовища якісно та кількісно контролювали згідно з нормативними документами.

Як препарат порівняння використовували антимікотик групи триазолів – флуконазол (200 мг/мл), паралельно проводили дослідження протигрибкової дії хлорофіліпту (1% спиртовий розчин).

Результати досліджень статистично оброблялись за С.Гланц [1].

Результати та їх обговорення

Раніше нами було встановлено, що до складу хлороформних фракцій підмаренників входять хлорофіли, каротиноїди, жирні кислоти та терпеноїди

Н.В.Кашпур – молодший науковий співробітник лабораторії імунореабілітології ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова НАМН України» (м. Харків)

О.В.Горяча – аспірант кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

Таблиця 1

Антимікотична активність ліпофільних екстрактів видів роду *Galium* L., *n* = 6

№ п/п	Штам грибів	Затримка росту мікроорганізмів, мм (M±m)							
		хлороформні фракції			етилацетатно-спиртові фракції			флуконазол	хлорофіліпт
		Gv	Gs	Gc	Gv	Gs	Gc		
1	*Geotriichum candidum (Galactomyces geotrichum)* Скляр 9	21,2±0,6	*	19,2±0,6	21,2±0,2	*	17,1±0,5	21,1±0,6	*
2	*Zygosaccharo spp.* 40 b/2	19,1±0,5	17,1±0,5	16,1±0,5	19,0±0,1	18,1±0,4	20,1±0,5	*	16,1±0,5
3	*Cryptococcus neoformans* 32609	*	*	*	*	*	*	19,1±0,5	*
4	*Rhodoflorula glutinis F*-129	*	*	*	*	10,0±0,1	*	*	*
5	*Picha anomala* 40	*	*	12,0±0,2	*	*	*	17,1±0,5	18,1± 0,4
6	*Kluveromyces lactis* F 116	*	*	*	10,0±0,4	*	*	17,2±0,4	*
7	*Aspergillus niger* 704	28,3±0,1	20,0±0,4	16,0±0,1	21,3±0,1	17,0±0,3	17,0±0,1	*	*

Примітки:
1) * –затримка росту відсутня;
2) *Gv – Galium verum, Gs – Galium salicifolium, Gc – Galium cruciata;*
3) *n* = 6 – кількість повторень експерименту для кожного мікроорганізму;
4) M±m – середнє значення ± похибка середнього значення.

[2-4]. При вивченні компонентного складу етилацетатно-спиртових фракцій було встановлено, що вони містять фенолкарбонові кислоти та флавоноїди [5]. Спільними для всіх фракцій є хлорогенова кислота та рутин. Сполуки терпенової природи представлені ациклічними, моноциклічними та біциклічними монотерпеноїдами [3].

Отримані дані (табл. 1) свідчать про те, що препарат порівняння флуконазол виявився неактивним по відношенню до *Zygosaccharo spp.*, *Rhodoflorula glutinis* та *Aspergillus niger.* Хлорофіліпт проявляє активність лише по відношенню до 2 штамів – *Zygosaccharo spp.* та *Picha anomala.*

Отримані нами ліпофільні фракції з підмаренників по-різному впливають на ріст використаних тест-культур грибів.

По відношенню до *Geotriichum candidum* на рівні флуконазолу діють обидві фракції підмаренника справжнього і дещо менш активні фракції підмаренника хрещатого. На *Zygosaccharo spp.* усі досліджувані фракції діють на рівні хлорофіліпту і вище. По відношенню до *Cryptococcus neoformans* жодна з досліджуваних фракцій та хлорофіліпт не проявили інгібуючого впливу на зростання. До *Rhodoflorula glutinis* слабку активність проявила етилацетатно-спиртова фракція *G. salicifolium*. До *Picha anomala* активною була хлороформна фракція *G. cruciata*. До *Kluveromyces lactis* активною виявилася лише етилацетатно-спиртова фракція *G. verum*. До *Aspergillus niger,* на відміну від препаратів порівняння, активність проявили всі досліджувані фракції, найактивнішою виявилась хлороформна фракція *G. verum.*

При порівняльному аналізі хімічного складу ліпофільних фракцій та їх протигрибкової активності виявлено як пряму, так і зворотну залежність між вмістом основних груп біологічно активних речовин (БАР) та рівнем протигрибкової дії по відношенню до ряду тест-штамів (табл. 2, 3).

Спостерігається пряма залежність (табл. 2) між вмістом суми терпенів і терпеноїдів, суми спиртів у хлороформних фракціях досліджуваних видів та ступенем їх активності по відношенню до *Geotriichum candidum (Galactomyces geotrichum)* Скляр 9; терпенових спиртів, суми терпенів і терпеноїдів, жирних кислот – до *Picha anomala* 40; аліфатичних спиртів – до *Aspergillus niger* 704 та *Zygosaccharo spp.* 40 *b*/2.

При аналізі активності етилацетатно-спиртових фракцій (табл. 3) виявлено, що існує пряма залежність між вмістом терпенів, суми терпенів і терпеноїдів, суми спиртів, аліфатичних спиртів, неофітадієнів, суми сполук з подвійним зв'яз-

Таблиця 2

Залежність між вмістом БАР у хлороформних фракціях підмаренників та рівнем їх протигрибкової активності (у коефіцієнтах кореляції)

Сума БАР	*Picha anomala*	*Aspergillus niger*	*Geotriichum candidum*	*Zygosaccharo spp.*
Терпенові спирти	0,97	*		*
Терпени і терпеноїди	0,85	*	0,84	*
Спирти	*	*	0,95	*
Аліфатичні спирти	*	0,89	*	0,89
Жирні кислоти	0,91	*	*	*

Примітка. * – коефіцієнт кореляції нижче 0,80.

Таблиця 3

Залежність між вмістом БАР у етилацетатно-спиртових фракціях підмаренників та рівнем їх протигрибкової активності (у коефіцієнтах кореляції)

Сума БАР	*Rhodoflorula glutinis*	*Aspergillus niger*	*Geotriichum candidum*	*Zygosaccharo spp.*
Терпени	-0,98	1,00	*	*
Терпенові спирти	-0,98	*	1,00	*
Терпени і терпеноїди	-0,98	0,97	*	*
Спирти	-0,98	0,93	0,88	*
Аліфатичні спирти	-0,98	0,99		*
Стероїдні спирти	-0,98	x	0,97	0,87
Жирні кислоти	-0,98	x	0,96	*
Неофітадієни	-0,98	0,95	*	*
Сполуки з подвійними зв'язками	-0,98	0,97	*	*
Хлорогенова кислота	-0,90	*	0,97	*
Гідроксикоричні кислоти	-0,91	*	*	*
Рутин	*	*	*	0,92
Рутин і хлорогенова кислота	*	*	*	0,90
Флавоноїди	*	*	*	0,86
Всі фенольні сполуки	*	*	*	0,95

Примітка. * – коефіцієнт кореляції нижче 0,80.

ком та активністю по відношенню до *Aspergillus niger* 704; терпенових спиртів, суми спиртів, стероїдних спиртів, жирних кислот, хлорогенової кислоти – до *Geotriichum candidum (Galactomyces geotrichum)* Скляр 9; стероїдних спиртів, суми фенольних сполук, у тому числі хлорогенової кислоти і рутину – до *Zygosaccharo spp.* 40 *b*/2.

Зворотну залежність встановлено між вмістом у етилацетатно-спиртових фракціях суми терпеноїдних сполук, спиртів (у тому числі і аліфатичних), жирних кислот, суми гідроксикоричних кислот (у тому числі хлорогенової) та їх активністю по відношенню до *Rhodoflorula glutinis F*-129.

ВИСНОВКИ

1. Вперше досліджено протигрибкову активність етилацетатно-спиртових (8:2) фракцій підмаренника справжнього (*Galium verum* L.), підмаренника верболистого (*Galium salicifolium* Klok.) та підмаренника хрещатого (*Galium cruciata* (L.) Scop.) по відношенню до *Geotriichum candidum, Zygosaccharo spp., Cryptococcus neoformans, Rhodoflorula glutinis, Picha anomala, Kluveromyces lactis, Aspergillus niger.*

2. Встановлено, що по відношенню до *Zygosaccharo spp.* та *Aspergillus niger* протигрибкову дію проявили всі досліджувані фракції. По відношенню до *Geotriichum candidum* активними були фракції підмаренника справжнього та підмаренника хрещатого. По відношенню до *Rhodoflorula glutinis, Picha anomala* та *Kluveromyces lactis* незначну активність проявили етилацетатно-спиртова фракція підмаренника верболистого, хлороформна фракція підмаренника хрещатого та етилацетатно-спиртова фракція підмаренника справжнього відповідно. По відношенню до *Cryptococcus neoformans* жодна з досліджуваних фракцій не була активною.

3. Виявлено залежність між вмістом суми основних груп БАР у досліджуваних фракціях підмаренників та рівнем їх протигрибкової активності по відношенню до ряду використаних тест-культур грибів.

4. Отримані результати свідчать про перспективність подальшого вивчення ліпофільних фракцій трави підмаренників справжнього, хрещатого та верболистого з метою створення на їх основі протигрибкових засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. – М.: Практика, 2001. – 459 с.*
2. *Горяча О.В., Кашпур Н.В. // Актуальні питання сучасної медицини: Тези Міжнар. наук. конф. студ. і молодих учених (Харків, 24-26 березня 2011 р.). – Х., 2011. – С. 55-56.*
3. *Ільїна Т.В., Ковальова А.М., Горяча О.В. // Укр. біофармац. журн. – 2009. – №5 (5). – С. 31-36.*
4. *Ільїна Т.В., Гриценко О.М., Горяча О.В., Ковальова А.М. // Зб. праць КМАПО. – 2008. – Вип. 11, кн. 1. – С. 718-724.*
5. *Ильина Т.В., Ковалева А.М., Горячая О.В. // VII Междунар. симпозиум по фенольным соединениям: фундаментальные и прикладные аспекты: Матер. доклад., 19-23 октября 2009 г. – М.: Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, 2009. – С. 105-107.*
6. *Кашпур Н.В., Горяча О.В., Ільїна Т.В. та ін. // Клінічна фармація. – 2011. – Т. 15, №4. – С. 50-53.*
7. *Кашпур Н.В., Горяча О.В., Ільїна Т.В. та ін. // Клінічна фармація. – 2012. – Т. 16, №1. – С. 48-51.*
8. *Решедько Г.К., Стецюк О.У. // Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3, №4. – С. 348-355.*
9. *Goldman D.L., Lee S.C., Mednick A.J. et al. // Infect. Immunol. – 2000. – Vol. 68. – P. 832-838.*
10. *Lin X., Heitman J. // Ann. Rev. Microbiol. – 2006. – Vol. 60. – P. 69-105.*
11. *Patterson T.F. // Med. Mycol. – 2009. – №51, Suppl. 1. – P. 255-260.*
12. *Vonberg R.P., Gastmeier P. // J. Hosp. Infect. – 2006. – Vol. 63, №3. – P. 246-254.*

Адреса для листування: 61168, м. Харків,
вул. Блюхера, 4. Тел. (572) 67-92-08.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 18.04.2012 р.