

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ГЕЛЮ З МАНГІФЕРИНОМ І ВОДНИМ ВИЛУЧЕННЯМ З ЛЕСПЕДЕЦІ ДВОКОЛІРНОЇ

Яромій М.¹, Осолодченко Т.², Половко Н.¹

¹Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

²Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова
Національної академії медичних наук України, Харків, Україна

polovko.np@gmail.com

Анотація. Вивчення антимікробної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедеці двоколірної. Антимікробну активність досліджуваних зразків визначали дифузійним методом «лунок» та дисків з вимірюванням діаметрів зон затримки росту мікроорганізмів. Для мікробіологічного дослідження використовували еталонні тест-культури мікроорганізмів, які належать до різних таксонометричних груп, а також клінічні ізоляти. Експериментально встановлена помірно виражена антимікробна дія крему відносно тест-штаму *S.aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P і *Candida albicans* ATCC 885-653 та до клінічних ізолятів *Staphylococcus aureus* 16, *Staphylococcus epidermidis* 14, *Streptococcus pneumoniae* 14, *Streptococcus pyogenes* 2432 і *Staphylococcus aureus* 124, яка перевищує активність референтного препарату «Календули мазь». Мікробіологічними дослідженнями встановлена виражена антимікробна дія гелю з мангіферином і водним вилученням леспедеці двоколірної, що вказує на перспективу розробки дерматологічного засобу для терапії інфекційно-запальних процесів шкіри.

Ключові слова: гелі, дерматологія, леспедеці двоколірна, мангіферин, мікроорганізми, протимікробна активність.

Вступ. Перспективним є створення фітозасобів для терапії дерматологічних захворювань шкіри, спровокованих патогенними мікроорганізмами, які мають ряд переваг, а саме таких як широкий спектр фармакологічної активності, низьку токсичність, відсутність резистентності до більшості мікроорганізмів, що дозволяє використовувати їх як альтернативу синтетичним АФІ антибактеріальної дії [1-3].

Рослини виду *Lespedeza* володіють широким спектром фармакологічної активності. Як сировина для отримання вилучень та дослідження фармакологічної активності використовується уся наземна частина, стебла, кора,

кора кореня, квіти з яких отримують етанольні, метанольні та етилацетатної вилучення. Експериментально встановлено, що леспедеца володіє протимікробною активністю [4-7]. У сукупності отримані результати свідчать про те, що екстракти *Lespedeza sp.* можуть бути потенційним джерелом для створення нових антибактеріальних лікарських засобів.

Перспективною сировиною для створення дерматологічного засобу є мангіферин, основним промисловим джерелом якого є дерево манго (*Mangifera indica*). Мангіферин володіє численними фармакологічними ефектами, в тому числі і антибактеріальними [8]. Експериментально підтверджено, що мангіферин виявляє антибактеріальну дію проти двох видів бактерій: *Staphylococcus aureus* (грампозитивний) і *Salmonella typhi* (грамнегативний), а також протигрибкову (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. niger*, *A. flavus* і *T. aurantiacus*) та антипротозойну (*C. parvum*) дію [9, 10].

Мета дослідження. Вивчення антимікробної активності гелю з мангіферином і водним вилученням з леспедеці двоколірної.

Матеріали та методи. Досліджено протимікробну активність гелю з мангіферином і водним вилученням наземної частини леспедеці двоколірної. В дослідженні використовували еталонні тест-культури грампозитивних і грамнегативних бактерій, які належать до різних таксономічних груп: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Протигрибкову дію речовин досліджували на референтному штамі *Candida albicans* ATCC 885-653, а також клінічних ізолятах *Staphylococcus aureus* 16, *Staphylococcus epidermidis* 14, *Streptococcus pneumoniae* 14, *Streptococcus pyogenes* 2432, *Staphylococcus aureus* 124, *Enterococcus faecalis* 42, *Klebsiella pneumoniae* 18, *Enterobacter cloacae* 17, *Acinetobacter baumannii* 150, *Pseudomonas aeruginosa* 18, *Candida albicans* 69.

Приготування мікробної суспензії штамів (мікроорганізмів) проводили з використанням приладу Densi-La-Meter (виробництво PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Мікробну суспензію штамів готували згідно інструкції, яка додається до приладу, та інформаційного листа про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій», м. Київ. Синхронізацію культур штамів проводили з використанням низької температури (4 °C) [11]. Мікробне навантаження складало 10⁷ мікробних клітин на 1 мл середовища і встановлювалося за стандартом McFarland. У

дослідах використовували 18-24 годинну культуру штамів мікроорганізмів. Для культивування використовували агар Мюллера-Хинтона (Виробництво – Індія «Himedia Laboratorles Pvt. Ltd India», термін придатності середовища до XI.2025р.). Для культивування *Candida albicans* використовували агар Сабуро (Виробництво – Індія, «Himedia Laboratorles Pvt. Ltd India» термін придатності середовища до XI.2025 р.).

Визначення антибактеріальних активності досліджуваних зразків проводили методом дифузії в агар (метод «колодязів») на двох шарах щільного поживного середовища, розлитого в чашки Петрі [12]. Визначення протимікробної активності досліджуваних зразків проводили на двох шарах щільного поживного середовища, розлитого в чашки Петрі (діаметром 100 мм і висотою 15 мм). У нижньому шарі використовували «голове» незасіяне середовище (агар-агар, вода, солі). Цей шар являє собою підкладку з середовища об'ємом $(10,0 \pm 0,3)$ мл, на яку строго горизонтально встановлюють 6 тонкостінних циліндрів з нержавіючої сталі діаметром 8 мм і висотою 10 мм. Навколо циліндрів заливають верхній шар, що складається з поживного агаризованого середовища, розплавленого та охолодженого до температури $(40,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, в яке вносили відповідний стандарт добової тест-культури мікроорганізму. Попередньо верхній шар добре перемішувався до утворення однорідної маси. Після застигання циліндри стерильним пінцетом витягували і в лунки, що утворилися, поміщали досліджуваний зразок в масі 0,3 г. Обсяг середовища для верхнього шару складав $(15,0 \pm 0,5)$ мл. Чашки підсушували 30-40 хвилин при кімнатній температурі і ставили в термостат на 18-24 години. Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів заміряли за допомогою мірної лінійки з точністю вимірювання 1,0 мм.

При оцінці антибактеріальної активності досліджуваних зразків застосовували наступні критерії:

- відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також зони затримки до 10 мм вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до внесеного в лунку препарату або концентрації антимікробної речовини;
- зони затримки росту діаметром 10-15 мм вказують на малу чутливість культури до випробовуваної концентрації антимікробної речовини;
- зони затримки росту діаметром 15-25 мм розцінюються, як показник чутливості мікроорганізму до концентрації випробовуваної речовини;

- зони затримки росту, діаметр яких перевищує 25 мм, свідчить про високу чутливість мікроорганізмів до випробовуваної концентрації антимікробної речовини.

В дослідженнях також використовували метод дисків. На засіяну відповідним мікроорганізмом поверхню агару накладали диски діаметром 3 мм на який передчасно накладали невелику кількість МЛЗ. При оцінці антибактеріальної активності досліджуваних зразків застосовували такі критерії:

- відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо диска, вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до препарату або концентрації антимікробної речовини;

- зони затримки росту діаметром 5-8 мм вказують на малу чутливість культури до випробовуваної концентрації антимікробної речовини;

- зони затримки росту діаметром 9-14 мм розцінюються, як показник чутливості мікроорганізму до концентрації випробовуваної речовини;

- зони затримки росту, діаметр яких перевищує 15 мм, свідчить про високу чутливість мікроорганізмів до випробовуваної концентрації антимікробної речовини.

В якості референтного препарату використовували «Календули мазь», виробництва ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика», м. Житомир, серія 10623.

Результати та обговорення. Результати дослідження антимікробних властивостей гелю з водним вилученням наземної частини леспедеці двоколірної і мангіферином по відношенню до штамів мікроорганізмів, наведені в таблиці.

За результатами досліджень встановлено, що гель з водним вилученням наземної частини леспедеці біколірної і мангіферином володіє вираженою антибактеріальною активністю. Тест-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P і *Candida albicans* ATCC 885-653 та клінічні ізоляти *Staphylococcus aureus* 16 *Staphylococcus epidermidis* 14 показали чутливість до дослідного зразку гелю. Клінічні ізоляти *Streptococcus pneumoniae* 14, *Streptococcus pyogenes* 2432 і *Staphylococcus aureus* 124 мають низьку чутливість до дослідного зразку гелю. Експериментально встановлено що за рівнем активності дослідний гель перевищує активність референтного препарату по відношенню до більшості мікроорганізмів. Для низки мікроорганізмів активність знаходиться на рівні активності препарату порівняння, так як отримані дані знаходяться в межах статистичної похибки.

З огляду на отримані результати і наявність вираженої чутливості тест-штамів мікроорганізмів *Staphylococcus* розроблений нами гель, який містив

мангіферин і водне вилучення леспедеці двоколірної може розглядатися як потенційний дерматологічний засіб. Стафілококи найчастіше викликають гнійно-запальні захворювання, які локалізуються у шкірі та слизових оболонках. Вони викликають виникнення фурункулів – гнійного запалення волосяного мішечка та сальної залози; карбункулів – гнійного запалення глибоких шарів шкіри та підшкірної основи; фолікуліт – гнійне запалення волосяних мішечків і піодермію – гнійне запалення шкіри.

Таблиця 1

Протимікробна активність гелю з мангіферином і водним вилученням леспедеці двоколірної відносно референтних штамів мікроорганізмів, n=3

Мікроорганізми	Метод	Діаметри зон затримки росту в мм до зразків	
		Дослідний гель	Референтний препарат
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Колодязь	18,5±0,5	15,5±0,5
	Диски	17,3±0,3	11,5±0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	Колодязь	16,5±0,5	16,5±0,5
	Диски	15,5±0,5	10,5±0,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Колодязь	15,5±0,5	13,5±0,5
	Диски	12,5±0,5	10,5±0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Колодязь	13,5±0,5	ріст
	Диски	12,5±0,5	ріст
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Колодязь	13,5±0,5	ріст
	Диски	11,5±0,5	ріст
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	Колодязь	14,5±0,5	ріст
	Диски	13,5±0,5	ріст
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Колодязь	16,5±0,5	16,5±0,5
	Диски	14,5±0,5	12,5±0,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	Колодязь	16,5±0,5	ріст
	Диски	13,5±0,5	ріст
<i>Staphylococcus aureus</i> 16	Колодязь	16,5±0,5	12,5±0,5
	Диски	12,5±0,5	10,5±0,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 14	Колодязь	15,5±0,5	14,5±0,5
	Диски	12,5±0,5	10,5±0,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 14	Колодязь	13,5±0,5	ріст
	Диски	11,5±0,5	ріст

<i>Streptococcus pyogenes</i> 2432	Колодязь	13,5±0,5	ріст
	Диски	11,5±0,5	ріст
<i>Staphylococcus aureus</i> 124	Колодязь	14,5±0,5	12,5±0,5
	Диски	11,5±0,5	8,5±0,5
<i>Enterococcus faecalis</i> 42	Колодязь	14,5±0,5	13,5±0,5
	Диски	10,5±0,5	7,5±0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 18	Колодязь	14,5±0,5	ріст
	Диски	10,5±0,5	ріст
<i>Enterobacter cloacae</i> 17	Колодязь	14,5±0,5	ріст
	Диски	11,5±0,5	ріст
<i>Acinetobacter baunani</i> 150	Колодязь	ріст	ріст
	Диски	8,5±0,5	ріст
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18	Колодязь	12,5±0,5	ріст
	Диски	9,5±0,5	ріст
<i>Candida albicans</i> 69	Колодязь	13,5±0,5	ріст
	Диски	10,5±0,5	ріст

Висновки.

1. Експериментально встановлена наявність вираженої антимікробної дії гелю відносно тест-штамів *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P і *Candida albicans* ATCC 885-653 та клінічних ізолятів *Staphylococcus aureus* 16 і *Staphylococcus epidermidis* 14.

2. Встановлено, що за рівнем активності дослідний гель перевищує активність референтного препарату по відношенню до дослідних тест-штамів та клінічних ізолятів більшості мікроорганізмів.

3. Отримані результати, які підтверджують наявність вираженої чутливості тест-штамів мікроорганізмів, вказують на перспективи подальших досліджень з розробки дерматологічного засобу з мангіферином і водним вилученням леспедеці двоколірної у формі гелю.

Література

1. Дербенцева Н.А., Бондаренко А.С. Антимікробні властивості лікарських рослин. Фармацевтичний журнал: зб. наукових праць. 1999. № 4. С.5-6.
2. Сучасна фітотерапія: навч. посібник. Гарна, С. В. та ін. Харків: Мадридська друкарня. 2016. 580 с.
3. Чекман І. С. Клінічна фітотерапія. Київ: А.С.К. Видавництво. 2013. 552 с.

4. Antibacterial and antifungal activities of Lespedeza cuneata extract against Candida albicans. /Hee-Jin Hong, Na-Ra Son, Wang-Yong Yang et al. *Biomedical Research*. 2018. Vol. 29 (20). doi: 10.4066/biomedicalresearch.29-18-1080.
5. Nam S.H. Evaluation of the anti-caries effect of Lespedeza cuneata extract against Streptococcus mutans. *Georgian Med News*. 2023. Vol. 3 (38). P.19–22. PMID: 37419465.
6. Nam Antibacterial and Antioxidative Activity of Lespedeza cuneata G. Don Extracts / Lee Hye-Jin, Lim Gyu-Nam, Park Min-A et al. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 2011. Vol. 39(1). P.63–69.
7. Antibacterial and immuno-modulatory activity of ethanol extracts from Lespedeza sp. During Helicobacter pylori infections /Yang J.K., Yeo H.D., Baik S.C. et al. *Biotechnol Bioproc.* 2010. Vol. 15. P.1077–1083. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-3115-z>
8. Benard O, Chi, Y. Medicinal Properties of Mangiferin, Structural Features, Derivative Synthesis. *Pharmacokinetics and Biological Activities. Mini reviews in medicinal chemistry.* 2015. Vol.15 (7), P.582–594. <https://doi:10.2174/1389557515666150401111410>.
9. Stoilova, I., Gargova, S, Stoyanova A, Ho L. Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. *Herba Pol.*, 2005. Vol. 51. P.37–44.
10. Singh, S.K., Tiwari, R.M., Sinha, S.K., Danta, C.C., Prasad, S.K. (2012) Antimicrobial evaluation of mangiferin and its synthesized analogues. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (2), 884–887. [https://doi:10.1016/S2221-1691\(12\)60329-3](https://doi:10.1016/S2221-1691(12)60329-3).
11. Волянський Ю. Л., Мироненко Л. Г., Калініченко С. В. та ін. Стандартизація приготування мікробних суспензій: Інформаційний бюлетень про інновації в охороні здоров'я. 2006. № 163-2006. МОЗ України / К.: Укрмедпатентінформ. С.10.
12. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів. Ю.Л. Волянський, В.П. Ширококов, С.В. Бірюкова та ін. Метод. рекомендації МОЗ України. К., 2004. 38 с.

