

РЕЗУЛЬТАТИ ПЕРВИННОГО МІКРОБІОЛОГІЧНОГО СКРИНІНГУ МОДИФІКОВАНИХ ПОХІДНИХ КВЕРЦЕТИНУ

Осолодченко Т. П.¹, Андрєєва І. Д.¹,
Комісаренко М. А.², Рябова І. С.¹, Завада Н. П.¹

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І.
Мечникова Національної академії медичних
наук України»

²Національний фармацевтичний університет
Міністерства охорони здоров'я України

Розробка нових ефективних і малотоксичних лікарських засобів на основі рослинної сировини є актуальним завданням сучасної науки. Кверцетин є одним з найбільш відомих і добре вивчених флавоноїдів [1]. В зв'язку із широким спектром фармакодинаміки та низькою токсичністю препарати кверцетину давно привертають увагу дослідників. Кверцетин є потужним лікарським засобом, ефективну дію якого доведено при різних клінічних показаннях. Перспективними є спроби посилити лікарські властивості кверцетину шляхом його хімічних модифікацій [2].

Мета роботи – пошук модифікованих похідних кверцетину з високими протимікробними властивостями шляхом їх первинного мікробіологічного скринінгу.

Матеріали та методи

Проведено первинний мікробіологічний скринінг 315 похідних кверцетину, екстрагованого з різних рослин, а саме: з навколопліднику абрикосу звичайного (*Prúnus armeniáca*), з листя та лози винограду культурного (*Vitis vinifera*), з деревини та листя вишні звичайної (*Prunus cerasus*), з деревини та листя малини звичайної (*Rubus idaeus*), з деревини та листя смородини чорної (*Ribes nígrum*). Екстрагування кверцетину та його модифікація проведені на базі Національного фармацевтичного університету МОЗ України. Кверцетин для досліджень було отримано шляхом кислотного гідролізу рутину [3], [4]. Визначення вмісту кверцетину у витяжках проведено з використанням тонкошарової хроматографії [5]. Вивчалися зразки з вмістом кверцетину 1,0 %, 2,0 % та 5,0 % у сухому залишку. Кверцетин було модифіковано за допомогою формальдегіду (формалювання), бурштинового ангїдриду (сукцилювання) та амінокислот, які містять в аліфатичному радикалі додаткові функціональні групи, а саме аміногрупу (лізин) та гуанїдинову групу (аргїнін). Досліджено 27 зразків немодифікованого кверцетину, по 54 зразки формальованих та сукцильованих модифікацій кверцетину та 180 зразків кверцетину, модифікованого амінокислотами. Серед похідних кверцетину, модифікованих амінокислотами, було 108 зразків формальованого кверцетину (по 54 зразки з кожною амінокислотою) та 72 зразки його сукцильованих різновидів (по 36 зразки з кожною амінокислотою).

Для мікробіологічних досліджень використано набір тест-штамів, який є загальноприйнятим при первинному визначенні протимікробної дії: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. vulgaris* ATCC 4636. Протигрибкову дію речовин досліджено на референтному штамі *C. albicans* ATCC 885-653. Усі культури мікроорганізмів було одержано з лабораторії загальної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України». Антимікробну активність досліджуваних зразків визначали дифузійним методом «колодязів» з вимірюванням діаметрів зон затримки росту мікроорганізмів [6]. Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин (оптична щільність) проводили за допомогою стандарту каламутності (0,5 од. за шкалою McFarland) з використанням приладу Densi-La-Meter (виробництво PLIVALachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Суспензію готували згідно з інструкцією, що додається до приладу і інформаційного листа [7]. Мікробне навантаження становило 10^7 мікробних клітин на 1 мл середовища і встановлювалося за стандартом McFarland. Синхронізацію культур проводили за допомогою низької температури (4°C) [8]. У роботу брали 18-24-х годинну культуру мікроорганізмів. Для бактерій використовували агар Мюлера-Хінтона, для *C. albicans* – агар Сабури. При оцінці антибактеріальної активності досліджуваних речовин застосовували такі 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 помірної чутливості мікроорганізму до концентрації випробовуваної речовини; зони затримки росту, діаметр яких перевищує 25 мм, свідчить про високу чутливість мікроорганізмів до випробовуваної концентрації антимікробної речовини. При постановці дослідів додатково проводили контролі росту культури в середовищі без досліджуваних речовин у розчиннику, контролі чистоти суспензії мікроорганізму та стерильності середовища [6]. Експерименти проведені у трьох повторях. Статистичну обробку результатів проводили з використанням загальноприйнятих методів параметричної статистики [9].

Результати та обговорення

При дослідженні протимікробної активності природного кверцетину усіх рослин в досліджених концентраціях встановлено його помірну дію стосовно тест-штамів *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 та *C. albicans* ATCC 653-885 (діаметри зон затримки росту у діапазоні від (15,0±0,0) мм до (22,7±0,5) мм).

Слабку чутливість виявили *P.vulgaris* ATCC 4636 і *P.aeruginosa* ATCC 27853 до 1,0 % природного кверцетину досліджених рослин, окрім 1,0 % екстрактів кверцетину з листя та деревини смородини чорної (діаметри зон затримки росту у діапазоні від (12,7±0,5) мм до (14,7±0,5) мм).

Встановлено помірну протимікробну активність переважно більшої формальованих та сукцильованих модифікацій кверцетину, екстрагованого з усіх досліджених рослин, стосовно усіх досліджених референт-штамів мікроорганізмів. Діаметри зон затримки росту тест-штамів мікроорганізмів під впливом модифікованих похідних кверцетину знаходилися у діапазоні від (15,0±0,0) мм до (24,7±0,9) мм.

При додатковій модифікації формальованих та сукцильованих зразків кверцетину навколоплідника абрикосу звичайного (*Prunus armeniaca*) амінокислотами чутливість тест-штамів грамнегативних мікроорганізмів та *C. albicans* ATCC 653/885 значно не змінювалась і залишалася помірною з діапазоном зон затримки росту від (21,3±0,5) мм до (24,7±0,5) мм. Більш чутливими до такої модифікації виявилися грампозитивні мікроорганізми. *S. aureus* ATCC 25923 проявив високу чутливість стосовно 62,5 % сукцильованих та 25,0 % формальованих похідних кверцетину

абрикосу, додатково модифікованих амінокислотами (рисунок 1). Стосовно *B.subtilis* ATCC 6633 високу активність виявили 75,0 % формальованих похідних та усі 100,0 % сукцильованих модифікацій кверцетину з амінокислотами (рисунок 2). Діаметри зон затримки росту грампозитивних мікроорганізмів знаходилися у діапазоні від (25,3±0,5) мм до (28,0±0,0) мм.

Штами грампозитивних мікроорганізмів виявилися також найбільш чутливими до формальованого і сукцильованого кверцетину з листя та лози винограду, додатково модифікованих амінокислотами. *S. aureus* ATCC 25923 проявив високу активність щодо усіх 100,0 % сукцильованих та 62,5 % формальованих похідних кверцетину з лози винограду, додатково модифікованих амінокислотами. 95,0 % зразків виявили високу активність стосовно тест-штаму *B. subtilis* ATCC 6633, зокрема 75,0 % формальованих та усі сукцильовані похідні, додатково модифіковані амінокислотами. *S. aureus* ATCC 25923 проявив високу активність щодо 50,0 % сукцильованих та 25,0 % формальованих похідних кверцетину з листя винограду, додатково модифікованих амінокислотами, *B. subtilis* ATCC 6633 – щодо 62,5 % формальованих та усі сукцильовані похідних з лози

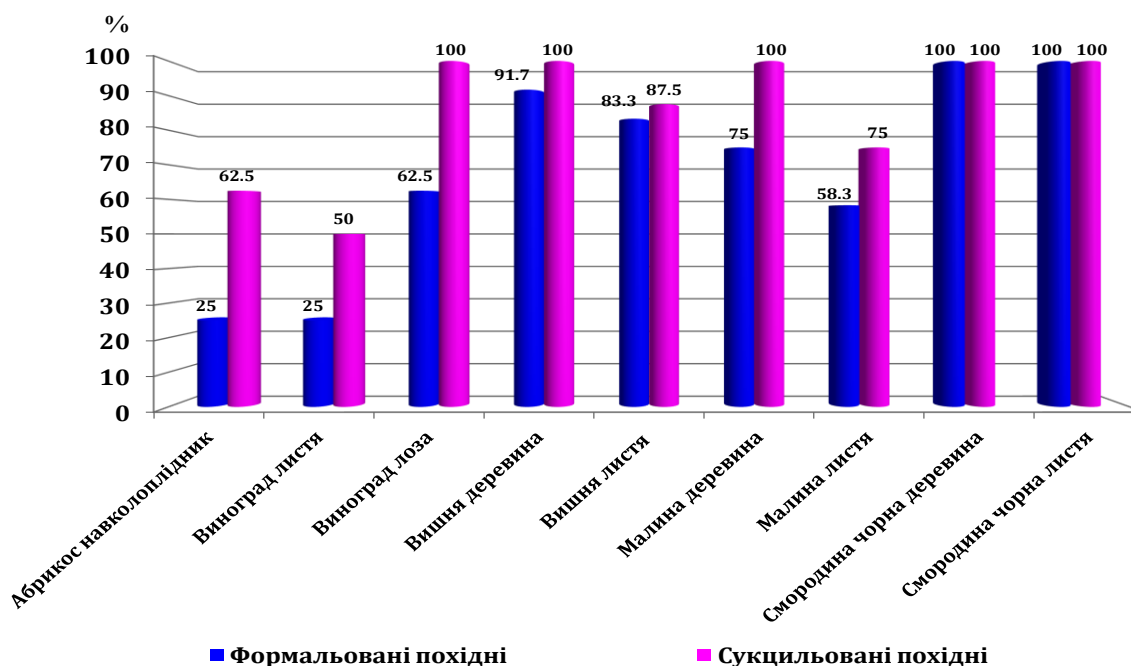


Рисунок 1 Відсоткова кількість похідних кверцетину, додатково модифікованих амінокислотами, які виявили високу протимікробну активність стосовно *S.aureus* ATCC 25923

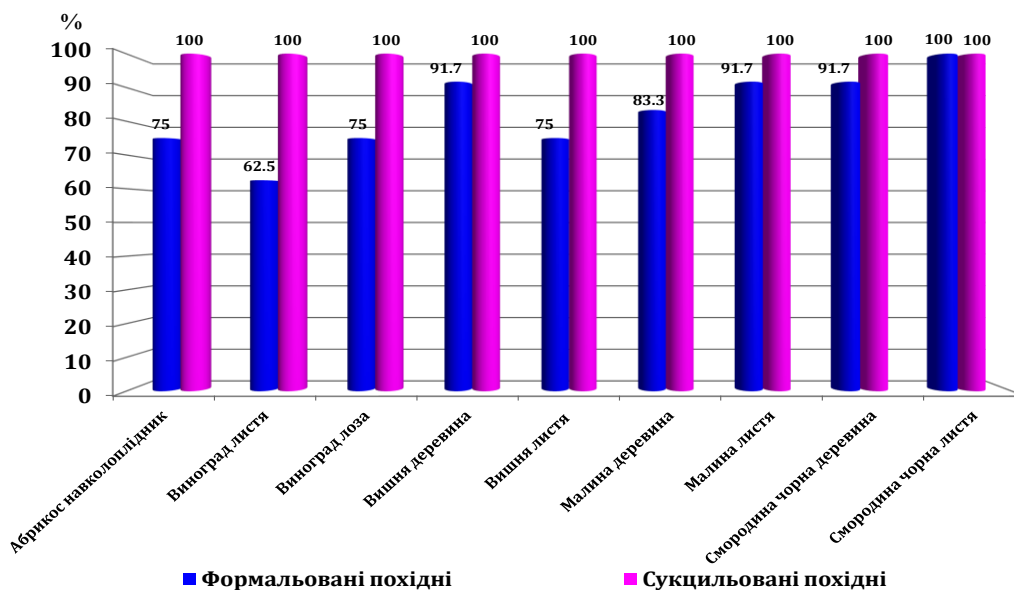


Рисунок 2 Відсоткова кількість похідних кверцетину, додатково модифікованих амінокислотами, які виявили високу протимікробну активність стосовно *B. subtilis* ATCC 6633

винограду. Діаметри зон затримки росту знаходились у діапазоні від (25,3±0,5) мм до (28,8±0,8) мм. Для 37,5 % сукцильованих модифікацій кверцетину з листя та 50,0 % сукцильованих модифікацій кверцетину з лози винограду, додатково модифікованих амінокислотами, доведено високу протимікробну дію щодо грамнегативного тест-штаму *E. coli* ATCC 25922 (рисунок 3). Діаметри зон затримки росту *E. coli* ATCC 25922 під впливом похідних кверцетину винограду культурного, додатково модифікованих амінокислотами, були у межах (25,3±0,5) мм – (25,7±0,5) мм).

Найчутливішими щодо модифікацій кверцетину з листя та деревини малини звичайної з додаванням амінокислот також виявилися тест-штами грам позитивних мікроорганізмів. Високу чутливість *S. aureus* ATCC 25923 встановлено щодо 85,0 % зразків кверцетину з деревини малини звичайної та 65,0 % зразків кверцетину з листя малини, додатково модифікованих амінокислотами, *B. subtilis* ATCC 6633 – відповідно до 90,0 % та 95,0 % зразків. Діаметри зон затримки росту грам позитивних мікроорганізмів під впливом модифікацій кверцетину з малини звичайної амінокислотами знаходились у діапазоні від (25,3±0,5) мм до (27,7±0,5) мм. 37,5 % сукцильованих похідних кверцетину з листя малини, додатково модифікованого амінокислотами, виявились високо активними щодо тест-штаму *E. coli* ATCC 25922. Стосовно решти досліджених тест-штамів грамнегативних мікроорганізмів та штаму *S. albicans* ATCC 653-885 похідні кверцетину, додатково модифіковані амінокислотами, виявили помірну протимікробну дію.

Найактивнішими щодо грам позитивних та грамнегативних мікроорганізмів виявились

формальовані та сукцильовані похідні кверцетину з листя та деревини смородини чорної, додатково модифіковані лізином та аргініном. Усі 100,0 % похідних кверцетину, додатково модифіковані амінокислотами, проявили високу протимікробну активність стосовно референт-штаму *S. aureus* ATCC 25923 та понад 95,0 % – стосовно тест-штаму *B. subtilis* ATCC 6633 (діаметри зон затримки росту у діапазоні від (25,7±0,5) мм до (29,3±0,9) мм). Тест-штам *E. coli* ATCC 25922 проявив чутливість до 45,0 %, *P. vulgaris* ATCC 4636 – до 10,0 % та *P. aeruginosa* ATCC 27853 – до 20,0 % похідних кверцетину з листя смородини чорної, додатково модифікованих амінокислотами. Високу протимікробну активність стосовно грамнегативних мікроорганізмів найчастіше проявляли сукцильовані модифікації кверцетину, додатково модифіковані амінокислотами. Четверть сукцильованих похідних кверцетину з деревини смородини чорної, додатково модифікованих амінокислотами, проявили високу протимікробну активність щодо *E. coli* ATCC 25922 та половина – щодо тест-штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 (діаметри зон затримки росту – від (25,0±0,8) мм до (25,7±0,5) мм). 75,0 % зразків сукцильованого кверцетину з листя смородини чорної, додатково модифікованих амінокислотами, були високо активними до *E. coli* ATCC 25922, 25,0 % – щодо *P. vulgaris* ATCC 4636 та 50,0 % – до *P. aeruginosa* ATCC 27853 (рисунок 4). Діаметри зон затримки росту досліджених тест-штамів грамнегативних мікроорганізмів під впливом модифікацій кверцетину з листя смородини чорної з додаванням амінокислот знаходились у діапазоні від (22,0±0,8) мм до (26,7±0,5) мм.

Референт-штами грам позитивних мікроорганізмів виявились високо чутливими до

більшості зразків кверцетину з листя та деревини вишні звичайної, додатково модифікованих амінокислотами. Обидва грамположитивних штами виявилися високо чутливими стосовно 91,7 % формальованих та щодо усіх 100,0 % сукцильованих похідних кверцетину з деревини вишні, додатково модифікованих амінокислотами. *S. aureus* ATCC 25923 проявив високу чутливість стосовно 83,3 % формальованих та 87,5 % сукцильованих, *B. subtilis* ATCC 6633 – відповідно щодо 75,0 % та 100,0 % похідних кверцетину з листя

вишні звичайної, додатково модифікованих амінокислотами. Діаметри зон затримки росту грамположитивних мікроорганізмів під впливом модифікацій кверцетину з амінокислотами знаходились у діапазоні від (25,3±0,5) мм до (28,7±0,5) мм. Серед грамнегативних мікроорганізмів високу чутливість проявив тест-штам *E. coli* ATCC 25922 щодо 37,5 % зразків формальованих та до усіх 100,0 % сукцильованих різновидів

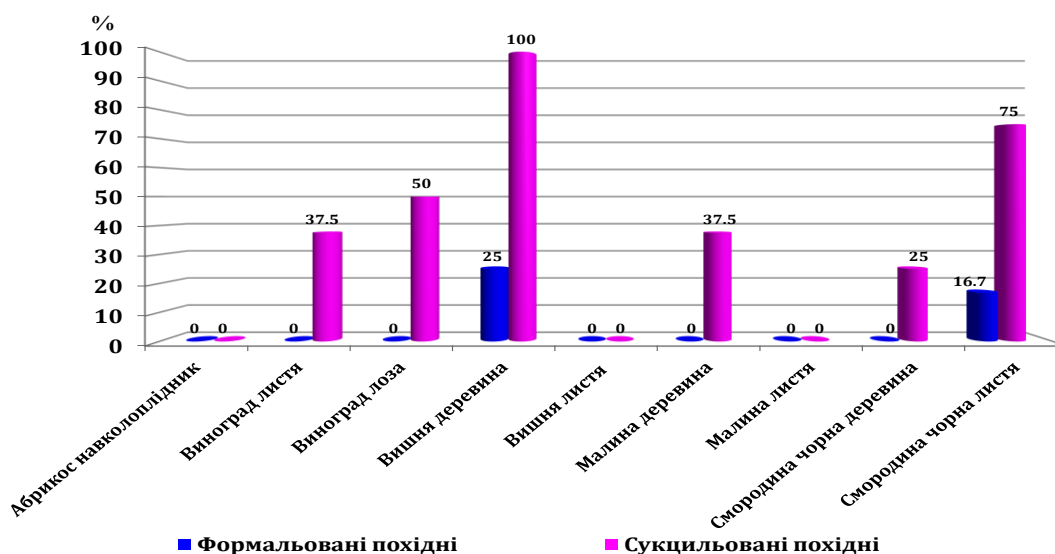


Рисунок 3 Відсоткова кількість похідних кверцетину, додатково модифікованих амінокислотами, які виявили високу протимікробну активність стосовно *E. coli* ATCC 25922

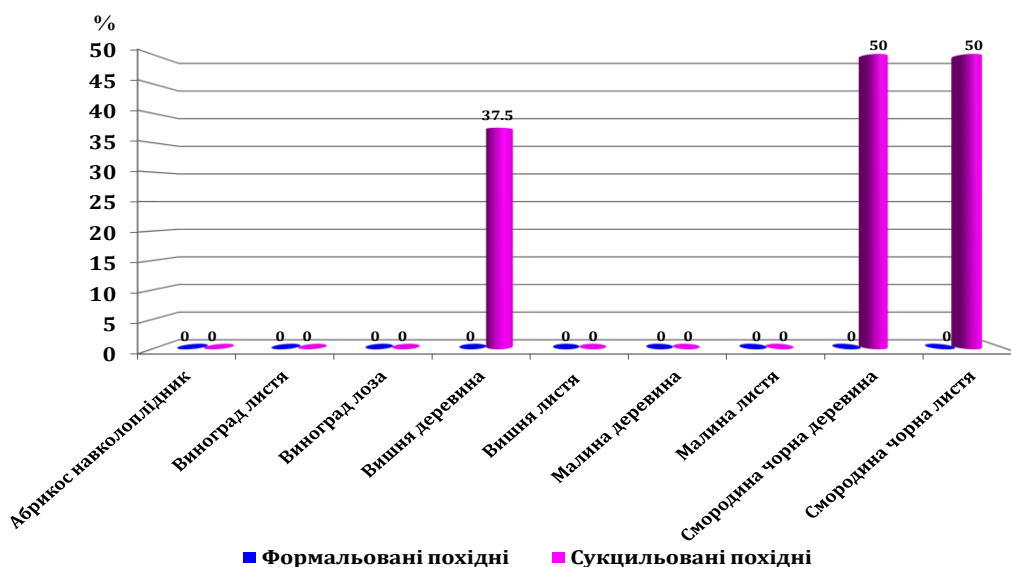


Рисунок 4 Відсоткова кількість похідних кверцетину, додатково модифікованих амінокислотами, які виявили високу протимікробну активність стосовно *P. aeruginosa* ATCC 27853

кверцетину деревини вишні, додатково модифікованих амінокислотами. Діаметри зон

затримки росту *E. coli* ATCC 25922 при цьому коливались від (25,0±0,8) мм до (26,0±0,8) мм). Понад третини з досліджених сукцильованих модифікацій кверцетину деревини вишні, додатково модифікованих амінокислотами, виявилися високо активними щодо тест-штаму *P.aeruginosa* ATCC 27853 (діаметри зон затримки росту – від (25,3±0,5) мм до (25,7±0,5) мм). Додаткова модифікація формальованих та сукцильованих похідних кверцетину вишні звичайної амінокислотами значно не впливала на чутливість *P. vulgaris* ATCC 4636 та *C.albicans* ATCC 653-885, яка залишалася помірною з діапазоном зон затримки росту у межах від (20,3±0,5) мм до (25,0±0,0) мм.

Висновки

1. За результатами первинного мікробіологічного скринінгу 315 зразків кверцетину та його модифікованих похідних встановлено переважно помірну чутливість досліджених тест-штамів грампозитивних, грамотригативних мікроорганізмів і тест-штаму *C. albicans* ATCC 653-885 стосовно немодифікованого, формальованого та сукцильованого кверцетину різних концентрацій.
2. Найактивнішими за протимікробною дією виявились різновиди модифікованого кверцетину, додатково модифіковані амінокислотами лізином та аргініном.
3. Переважна більшість досліджених екстрактів кверцетину, додатково модифікованих амінокислотами, проявила високу протимікробну активність стосовно тест-штамів грампозитивних мікроорганізмів.
4. Стосовно грамотригативних мікроорганізмів найактивнішими виявились сукцильовані екстракти кверцетину, модифіковані амінокислотами, вилучені з листя та лози винограду культурного, деревини малини звичайної, деревини вишні звичайної, деревини та листя смородини чорної.
5. Встановлено помірну антикандидозну активність усіх досліджених зразків кверцетину та його модифікованих похідних.
6. Результати проведеного дослідження доводять перспективність і доцільність подальшого поглибленого дослідження спектру та ступеню протимікробної активності обраних речовин з метою розробки на їх основі нових протимікробних засобів.

Results of primary microbiological screening of modified quercetin derivatives

Osolodchenko T. P., Andreieva I. D., Komisarenko M. A., Ryabova I. S., Zavada N. P.

Introduction. The development of new effective and low-toxic drugs based on herbal raw materials is an urgent task of modern science. Quercetin is one of the most well-known and well-studied flavonoids. Attempts to enhance the medicinal properties of quercetin by its chemical modifications are promising. The aim of the work is to search for modified quercetin derivatives with high antimicrobial properties by their primary microbiological screening. **Materials & methods.**

Primary microbiological screening of antimicrobial activity of 315 quercetin derivatives extracted from different plants was performed. Quercetin for research was obtained by acid hydrolysis of rutin. Determination of quercetin content in the extracts was performed using thin layer chromatography. For the primary screening standard test cultures of gram-positive and gram-negative bacteria were used that belonged to different taxonomic groups: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636. Antifungal activity of the compounds was studied for the reference strain of *Candida albicans* ATCC 885-653. Determination of antimicrobial and anticandidal activity of the new compounds was carried out with the help of the diffusion method of "wells" with the measurement of the diameters of the zones of growth retardation of microorganisms. **Results & discussion.** In the study of antimicrobial activity of natural quercetin of all plants in the studied concentrations found its moderate effect on test strains of *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 and *C. albicans* ATCC 653-885. Moderate antimicrobial activity of the vast majority of formalized and succylated modifications of quercetin extracted from all studied plants against all reference strains of microorganisms was found. With additional modification of formalized and succylated samples of amber apricot quercetin with amino acids, the sensitivity of test strains of gram-negative microorganisms and *C. albicans* ATCC 653/885 did not change significantly and remained moderate. *S. aureus* ATCC 25923 showed high sensitivity to 62.5% of succylated and 25.0% of formalized apricot quercetin derivatives, further modified with amino acids. *S. aureus* ATCC 25923 showed high activity against all 100.0% of succylated and 62.5% of formalized quercetin derivatives from grapevine, additionally modified with amino acids. 95.0% of the samples showed high activity against the test strain of *B. subtilis* ATCC 6633, in particular 75.0% of formalized and all succylated derivatives, further modified with amino acids. *S. aureus* ATCC 25923 showed high activity against 50.0% of succylated and 25.0% formalized quercetin derivatives from grape leaves, additionally modified with amino acids, *B. subtilis* ATCC 6633 - against 62.5% of formalized and all succylated derivatives from grapevine. For 37.5% of succylated modifications of quercetin from grapes, additionally modified with amino acids, a high antimicrobial effect against the gram-negative test strain of *E. coli* ATCC 25922 was proved. High sensitivity of *S. aureus* ATCC 25923 was found for 85.0% of quercetin samples from raspberry wood and 65.0% of quercetin samples from raspberry leaves, additionally modified with amino acids, *B. subtilis* ATCC 6633 - respectively 90.0% and 95.0 % of samples. 37.5% of succylated quercetin derivatives from raspberry leaves, additionally modified with amino acids, were highly active against the test strain of *E. coli* ATCC 25922. The most active against gram-positive and gram-

negative microorganisms were formalized and succylated derivatives of quercetin from the leaves and wood of black currant, additionally modified with lysine and arginine. All 100.0% of quercetin derivatives, additionally modified with amino acids, showed high antimicrobial activity against the reference strain of *S. aureus* ATCC 25923 and more than 95.0% - against the test strain of *B. subtilis* ATCC 6633. The test strain of *E. coli* ATCC 25922 showed high sensitivity up to 45.0%, *P. vulgaris* ATCC 4636 - up to 10.0% and *P.aeruginosa* ATCC 27853 - up to 20.0% of quercetin derivatives from black currant leaves, additionally modified with amino acids. High antimicrobial activity against gram-negative microorganisms was most often shown by succylated modifications of quercetin, additionally modified with amino acids. A quarter of the succylated quercetin derivatives from black currant wood, additionally modified with amino acids, showed high antimicrobial activity against *E. coli* ATCC 25922 and half - against the test strain *P.aeruginosa* ATCC 27853. 75.0% of samples of succylated quercetin from black currant leaves, additionally modified with amino acids, against *E. coli* ATCC 25922, 25.0% - against *P. vulgaris* ATCC 4636 and 50.0% - to *P.aeruginosa* ATCC 27853 were highly active. *S. aureus* ATCC 25923 showed high sensitivity to 83.3% of formalized and 87.5% of succyllates, *B. subtilis* ATCC 6633 - respectively to 75.0% and 100.0% of quercetin derivatives from cherry leaves, additionally modified with amino acids. Among gram-negative microorganisms, the test strain of *E. coli* ATCC 25922 showed high sensitivity to 37.5% of samples of formalized and up to 100.0% of succyllated varieties of cherry wood quercetin, additionally modified with amino acids. More than a third of the investigated succylated modifications of cherry quercetin, additionally modified with amino acids, were highly active against the test strain of *P.aeruginosa* ATCC 27853. Additional modification of formalized and succylated derivatives of cherry quercetin with conventional amino acids did not significantly affect the sensitivity of *P. vulgaris* ATCC 4636 and *C. albicans* ATCC 653-885, which remained moderate. **Conclusion.**

1. The results of primary microbiological screening of 315 samples of quercetin and its modified derivatives showed mostly moderate sensitivity of the tested test strains of gram-positive, gram-negative microorganisms and test strain *C. albicans* ATCC 653-885 to unmodified concentrated, formalized and succylated quercetin of various concentrations. **2.** Varieties of modified quercetin, additionally modified with the amino acids lysine and arginine, were the most active in terms of antimicrobial action. **3.** The vast majority of the studied extracts of quercetin, further modified with amino acids, showed high antimicrobial activity against test strains of gram-positive microorganisms **4.** With regard to gram-negative microorganisms, the most active were succulent extracts of quercetin, modified with amino acids, extracted from the leaves and vines of grapes, raspberry wood, cherry wood, wood and black currant leaves. **5.** Moderate anticandidal activity of all investigated samples of quercetin and its modified

derivatives was established. **6.** The results of the study prove the prospects and feasibility of further in-depth study of the spectrum and degree of antimicrobial activity of selected substances in order to develop new antimicrobial agents based on them.

Keywords: antimicrobial activity, modified quercetin derivatives

References

1. Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine / Tarakhovsky Yu.S., Kim Yu. A., Abdrasilov B.S., Muzafarov E.N.; [ed. E. I. Mayevsky]. Pushchino: Sunchrobook, 2013. 310 p.
2. Gregory S., Kelly N.D. Quercetin. AMR. 2011. V 16. № 2. P. 172-194.
3. Karimova E. R., Baltina L. A., Abdullin MI. Production of quercetin by acid hydrolysis of rutin Bulletin of Bashkir University. 21. 1. 2016. 78-80.
4. Dmitrienko S.G., Kudrinskaya V.A., Apyari V.V. Methods of isolation, concentration and determination of quercetin Journal of Analytical Chemistry. 2012. 67. 4. 340-353.
5. Kartsova L. A., Alekseeva A. V. Chromatographic and electrophoretic methods for the determination of polyphenolic compounds. Journal of Analytical Chemistry. 2008. 63. 11. 1126-1136.
6. The study of the specific activity of antimicrobial drugs: a method. recommendations / Y. L. Volyanskiy, I. S. Gritsenko, V. P. Shyrokobokov et al. K. StEntScPhC Ministry of Helthcare of Ukraine. 2004. 38 p.
7. Standardization of the preparation of microbial suspensions : Newsletter of innovations in health care № 163-2006. Ministry of Health Care of Ukraine / Y. L. Volyanskiy, L. G.Mironenko, S. V.Kalinichenko and others. K. : Ukrmedpatentinform. 2006. 10 p.
8. Basnakyan I. A. Cultivation of microorganisms with desired properties. M. Medicine. 1992. P. 29-59.
9. Lapach S. M., Chubenko A. V., Babich P. M. Statistical methods in biomedical research using Excel. K. Morion. 2000.320 p.