

## ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ СУКЦИЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ КВЕРЦЕТИНУ, ДОДАТКОВО МОДИФІКОВАНИХ АМІНОКИСЛОТАМИ

Осолодченко Т. П.<sup>1</sup>, Андреева І. Д.<sup>1</sup>, Комісаренко  
М. А.<sup>2</sup>, Завада Н. П.<sup>1</sup>, Рябова І. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут мікробіології та імунології ім. І. І.  
Мечникова

<sup>2</sup>Національний фармацевтичний університет

Пошук нових протимікробних засобів серед природних та синтетичних біологічно-активних речовин набуває все більшої актуальності. Все частіше фахівці звертаються до природних засобів лікування, зокрема, до рослин, що володіють антибактеріальним ефектом, та до біоструктурних речовин організму з активним та різноманітним впливом [1]. Флавоноїди – одна з найбільш різноманітних і поширених груп природних фенольних сполук. Вони беруть участь у різноманітних метаболічних процесах, що зумовлює їхню біологічну активність [2]. Природні флавоноїди малотоксичні і виявляють широкий спектр фізіологічної дії на організм людини: беруть участь в окисно-відновних процесах, реакціях імунітету, зумовлюють протизапальну, сенсibiliзуючу, протипухлинну, радіозахисну, антиоксидантну дію [3]. Кверцетин є одним з найбільш відомих флавоноїдів. В зв'язку із широким спектром фармакодинаміки та низькою токсичністю препарати кверцетину давно привертають увагу дослідників [4]. Можливості хімічного синтезу спонукають до розробки та отримання похідних кверцетину з новими властивостями. Перспективними є спроби посилити лікарські властивості кверцетину шляхом його хімічних модифікацій.

**Мета роботи** – дослідження протимікробних властивостей сукцильованих похідних кверцетину, вилученого з рослинної сировини, додатково модифікованих амінокислотами.

### Матеріали та методи

Визначено протимікробну активність модифікованих похідних кверцетину, вилученого з лози винограду культурного (*Vitis vinifera*), деревини малини звичайної (*Rubus idaeus*), деревини вишні звичайної (*Prunus cerasus*), деревини та листя смородини чорної (*Ribes nigrum*).

Кверцетин для досліджень було отримано шляхом кислотного гідролізу рутину [5], [6]. Визначення вмісту кверцетину у витяжках проведено з використанням тонкошарової хроматографії [7]. Вивчалися зразки з вмістом кверцетину 2,0 % у сухому залишку. Кверцетин було модифіковано за допомогою 2,0 % бурштинового ангідриду та 2,0 % амінокислот лізину та аргініну.

Проведено визначення спектру та рівнів протимікробної дії 10-ти сукцильованих екстрактів кверцетину, модифікованих амінокислотами, які були вилучені з рослинної сировини. Речовинами порівняння були 2,0 % екстракти немодифікованого

природного кверцетину, вилучені з відповідних частин досліджених рослин. Визначення протимікробної дії речовин виконано на 36 музейних та клінічних штамів мікроорганізмів, серед них 21 – грамполозитивний і 15 штамів грамнегативних бактерій. Використані грамполозитивні штами: 1 штам – *B. subtilis*, 1 – *E. faecalis*, 15 – *Staphylococcus spp.* та 4 – *Streptococcus spp.* Із грамнегативних бактерій в досліді використані: 4 штами *P. aeruginosa* та факультативно анаеробні грамнегативні палички різних родів родини *Enterobacteriaceae*, а саме: *E. coli* – 3 штами, *K. pneumoniae* – 2 штами, *K. oxytoca* – 1 штам, *E. cloacae* – 2 штами, *P. vulgaris* – 3 штами. Культури мікроорганізмів було одержано з лабораторії медичної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів та з колекції лабораторії біохімії та біотехнології ДУ “ІМІ НАМН”.

Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин проводили за допомогою стандарту каламутності (0,5 од. за шкалою McFarland). Використовували прилад Densi-La-Meter (виробництва PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Суспензію готували згідно з інструкцією до приладу та інформаційного листа про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 “Стандартизація приготування мікробних суспензій”, м.Київ [8]. Синхронізацію культур проводили за допомогою низької температури (4°C) [9]. У роботу брали 18-24-х годинну культуру мікроорганізмів.

Дослідження протимікробної активності речовин проводилось стандартним методом двократних серійних розведень у поживному бульйоні (макрометод) в об'ємі 1мл кожного розведення речовин з кінцевою концентрацією досліджуваного мікроорганізму приблизно ( $5 \times 10^5$ ) КУО/мл [10]. Після інкубації протягом доби пробірки з посівами переглядали у промінному світлі для визначення наявності росту мікроорганізму.

Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) встановлювалась за найменшою концентрацією досліджуваної речовини, яка пригнічувала видимий ріст культури. Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБ<sub>н</sub>К) виконували дозовані висіви на тверде поживне середовище (агар Мюллера-Хінтона) культуральної рідини з усіх пробірок, у яких не спостерігали росту мікроорганізму. За МБ<sub>н</sub>К вважали найнижчу концентрацію, яка викликала загибель не менше 99,9% бактерій.

При постановці дослідів додатково проводили контролі росту культури в середовищі без досліджуваних речовин, у розчиннику; контролі чистоти суспензії мікроорганізму (шляхом висіву на неселективні середовища) та стерильності середовища.

Статистична обробка результатів експериментальних досліджень проведена із використанням Excel (MS Office 2010, XP) та програми STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США) з визначенням медіани (*Me*) та вірогідності розбіжностей (*p*) показників груп. Для значень, закон розподілу яких відрізнявся від нормального, використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні [11].

### Результати дослідження та їх обговорення

В результаті проведених досліджень протимікробної активності сукцильованих похідних кверцетину лози винограду культурного (*Vitis vinifera*), додатково модифікованих амінокислотами лізином та аргініном, стосовно грамположитивних мікроорганізмів встановлено, що модифіковані похідні кверцетину лози винограду проявляли високу інгібуючу активність щодо штаму *B. subtilis* ATCC 6633 (МІК 15,6 мкг/мл). Бактеріцидну дію досліджені модифіковані похідні кверцетину лози винограду проявляли у концентрації 31,25 мкг/мл ( $p < 0,05$  у порівнянні з показником природного кверцетину).

Щодо *E. faecalis* ЗН бактеріостатична дія сукцильованих похідних кверцетину лози винограду, додатково модифікованих амінокислотами, була помірною (МІК 31,25 мкг/мл).

Щодо усіх досліджених представників роду *Streptococcus* бактеріостатична та бактерицидна дія модифікованих похідних кверцетину лози *Vitis vinifera* також була помірною і проявлялася у концентраціях 31,25–62,5 мкг/мл.

Встановлено високу та помірну активність обох досліджених модифікованих похідних кверцетину лози *Vitis*

*vinifera* щодо *Staphylococcus spp.* Їх інгібуючі концентрації відносно штамів *S. aureus* знаходились у межах 15,6–31,25 мкг/мл, бактерицидні концентрації – 31,25–62,5 мкг/мл. Модифіковані похідні кверцетину лози *Vitis vinifera* проявляли високу пригнічуючу дію щодо 72,73 % досліджених штамів *S. aureus* (МІК 15,6 мкг/мл ( $p < 0,05$  відносно показників природного кверцетину)). Активність досліджених модифікованих похідних кверцетину лози *Vitis vinifera* щодо штамів коагулазонегативних стафілококів *S. epidermidis* та *S. haemolyticus* була помірною (МІК 31,25 мкг/мл, МБ<sub>ц</sub>К 62,5 мкг/мл).

Отже, доведено, що сукцильовані похідні кверцетину лози винограду культурного (*Vitis vinifera*), додатково модифіковані амінокислотами лізином та аргініном, володіють високою та помірною *in vitro* активністю щодо грамположитивних мікроорганізмів з показниками МІК та МБ<sub>ц</sub>К у межах 15,6–62,5 мкг/мл. Високу пригнічуючу активність проявили модифіковані похідні кверцетину лози винограду культурного стосовно *B. subtilis* ATCC 6633 та щодо 72,73 % штамів *S. aureus* (МІК 15,6 мкг/мл) (рисунк 1).

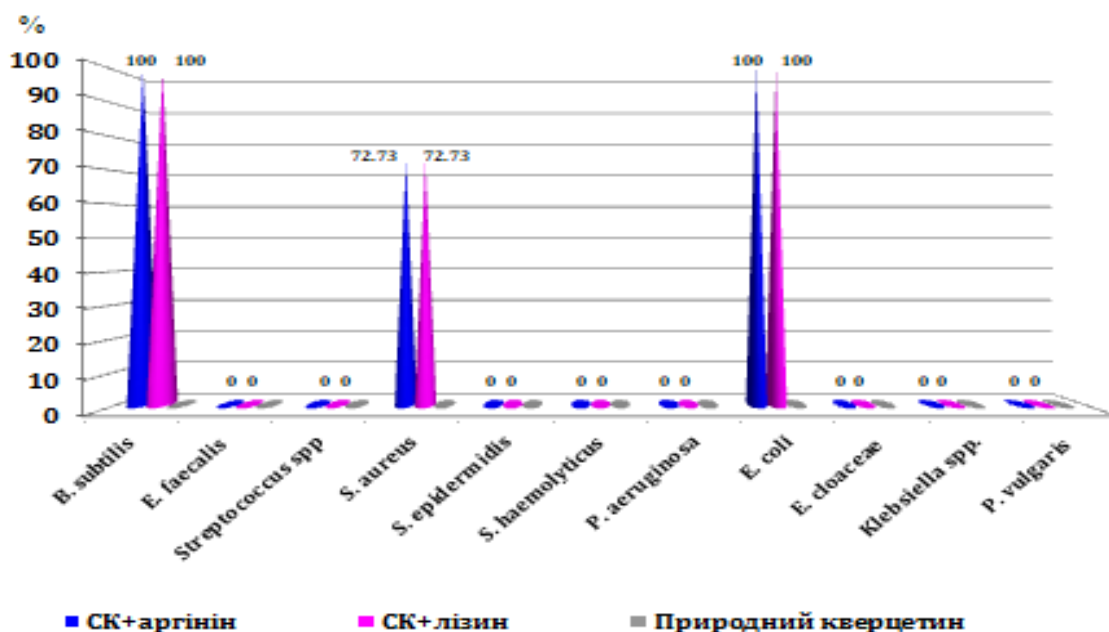


Рисунок 1 – Відсоткова кількість штамів мікроорганізмів, високо чутливих (МІК<15,6 мг/л) щодо сукцильованих похідних кверцетину (СК) лози винограду культурного (*Vitis vinifera*), додатково модифікованих амінокислотами

В результаті досліджень протимікробної активності модифікованих похідних кверцетину лози винограду культурного стосовно штамів грамнегативних мікроорганізмів було встановлено, що дія модифікованих похідних кверцетину лози винограду культурного щодо штамів *P. aeruginosa* виявилась переважно помірною (МІК 31,25–62,5 мкг/мл, МБ<sub>ц</sub>К 62,5–125,0 мкг/мл) і достовірно не

відрізнялася від такої немодифікованого кверцетину (МІК 62,5 мкг/мл, МБ<sub>ц</sub>К 125,0 мкг/мл).

Помірно чутливою до модифікованих похідних кверцетину лози винограду культурного також була переважна більшість досліджених штамів ентеробактерій. Лише до штамів *E. coli* встановлена висока бактеріостатична активність досліджуваних модифікованих сполук у концентрації 15,6 мкг/мл ( $p < 0,05$  у порівнянні з МІК немодифікованого кверцетину лози винограду 62,5 мкг/мл) (рис. 1). Бактеріцидна дія

модифікованих похідних кверцетину лози винограду стосовно усіх трьох штамів *E.coli* була помірною (МБ<sub>ц</sub>К 31,25 мкг/мл,  $p < 0,05$  у порівнянні з МБ<sub>ц</sub>К немодифікованого кверцетину лози винограду 125,0 мкг/мл). Відносно інших досліджених представників родини *Enterobacteriaceae*, а саме *E. cloacae*, *K. pneumoniae* та *P. vulgaris*, модифіковані похідні кверцетину лози винограду проявили помірну бактеріостатичну та переважно слабку бактерицидну активність. Показники МІК модифікованих похідних кверцетину лози винограду культурного щодо штамів *E. cloacae*, *K. pneumoniae* та *P. vulgaris* становили переважно 62,5 мкг/мл. Бактерицидно на зазначені штами ентеробактерій модифіковані похідні кверцетину лози винограду культурного діяли у концентрації 125,0 мкг/мл.

Отже, за результатами проведених досліджень встановлено, що сукцильовані похідні кверцетину лози винограду культурного (*Vitis vinifera*), додатково модифіковані амінокислотами лізином та аргініном, виявили високу бактеріостатичну активність стосовно штамів *E. coli* та помірну бактеріостатичну активність стосовно решти досліджених представників родини *Enterobacteriaceae* та *P. aeruginosa*.

В результаті визначення протимікробної дії сукцильованих похідних кверцетину деревини вишні звичайної (*Prunus cerasus*), додатково модифікованих амінокислотами лізином та аргініном, стосовно грампозитивних мікроорганізмів встановлено, що модифіковані похідні кверцетину деревини вишні звичайної проявляли високу інгібуючу та бактерицидну активність щодо штаму *B. subtilis* ATCC 6633 (МІК та МБ<sub>ц</sub>К відповідно 7,8 мкг/мл і 15,6 мкг/мл), достовірно вищу за таку природного кверцетину ( $p < 0,05$ ).

Бактеріостатична дія модифікованих похідних кверцетину деревини *Prunus cerasus* щодо штамів *E. faecalis*, *S. pneumoniae* та *S. pyogenes* була помірною, проявлялася у концентраціях 31,25–62,5 мкг/мл та вірогідно не відрізнялась від бактеріостатичної активності природного кверцетину деревини вишні. Бактерицидну дію стосовно зазначених штамів мікроорганізмів модифіковані похідні кверцетину деревини *Prunus cerasus* проявляли у концентраціях 62,5–125,0 мкг/мл. Стосовно 50,0 % досліджених штамів роду *Streptococcus* встановлено помірну бактерицидну дію сукцильованих похідних кверцетину деревини вишні звичайної, додатково модифікованих амінокислотами, у концентрації 62,5 мкг/мл.

За результатами експериментів встановлена вища в порівнянні з природним кверцетином активність модифікованих похідних кверцетину деревини *Prunus cerasus* щодо *Staphylococcus spp.* Інгібуючі концентрації досліджених речовин відносно штамів *S. aureus* знаходились у межах 7,8–62,5 мкг/мл, бактерицидні – у межах 15,6–125,0 мкг/мл. Щодо 72,73 % досліджених штамів *S. aureus* модифіковані похідні кверцетина деревини вишні звичайної проявили високу бактеріостатичну дію (МІК у межах 7,8–15,6

мкг/мл ( $p < 0,05$  відносно показників природного кверцетину деревини вишні звичайної). Високою бактерицидною активністю модифіковані похідні кверцетину деревини *Prunus cerasus* володіли стосовно третини (36,36 %) досліджених штамів *S. aureus*. Бактеріостатична активність досліджених речовин щодо штамів коагулазонегативних стафілококів *S. epidermidis* та *S. haemolyticus* проявлялась у концентраціях 31,25–62,5 мкг/мл, бактерицидна – у концентраціях 62,5–125,0 мкг/мл.

Отже, за результатами проведених досліджень встановлено, що сукцильовані похідні кверцетину деревини вишні звичайної (*Prunus cerasus*), додатково модифіковані амінокислотами лізином та аргініном, володіють високою та помірною *in vitro* активністю щодо грампозитивних мікроорганізмів з показниками МІК у межах 15,6–62,5 мкг/мл. Високу пригнічуючу активність модифіковані похідні кверцетину деревини вишні звичайної проявили стосовно *B. subtilis* ATCC 6633 та 72,73 % штамів *S. aureus* (МІК у межах 7,8–15,6 мкг/мл) (рис.2).

Досліджено протимікробну активність сукцильованих похідних кверцетину деревини вишні звичайної, додатково модифікованих амінокислотами, стосовно 15 штамів грамнегативних мікроорганізмів. Встановлено, що бактеріостатична дія модифікованих похідних кверцетину деревини вишні звичайної щодо штамів *P. aeruginosa* проявлялася у концентраціях 15,6–62,5 мкг/мл. При цьому стосовно 50,0 % штамів *P. aeruginosa* досліджуваних речовин проявили високу активність з МІК 15,6 мкг/мл та МБ<sub>ц</sub>К 31,25 мкг/мл, що достовірно ( $p < 0,05$ ) перевищувало показники природного кверцетину деревини вишні звичайної (рис. 2).

Помірно чутливою до модифікованих похідних кверцетину деревини *Prunus cerasus* була переважна більшість досліджених штамів ентеробактерій. До 66,67 % штамів *E.coli* встановлена їх висока бактеріостатична активність у концентрації 15,6 мкг/мл ( $p < 0,05$  у порівнянні з МІК природного кверцетину деревини вишні звичайної 62,5 мкг/мл) (рис. 2). Бактерицидна дія модифікованих похідних кверцетину деревини вишні стосовно усіх досліджених штамів *E.coli* була помірною (МБ<sub>ц</sub>К 31,25–61,5 мкг/мл,  $p < 0,05$  у порівнянні з МБ<sub>ц</sub>К природного кверцетину деревини вишні звичайної 125,0 мкг/мл). Близькими за ступенем чутливості до модифікованих похідних кверцетину деревини вишні звичайної виявились штами *P. vulgaris*. Показники МІК модифікованих похідних кверцетину деревини вишні стосовно *P. vulgaris* становили 31,25 мкг/мл. Бактерицидно на зазначені штами ентеробактерій досліджуваних речовин діяли у концентрації 62,5 мкг/мл. Відносно інших досліджених представників родини *Enterobacteriaceae*, а саме *E. cloacae* та *K. pneumoniae*, модифіковані похідні кверцетину деревини вишні звичайної проявили помірну бактеріостатичну та слабку бактерицидну активність (МІК 62,5 мкг/мл, МБ<sub>ц</sub>К 125,0 мкг/мл).

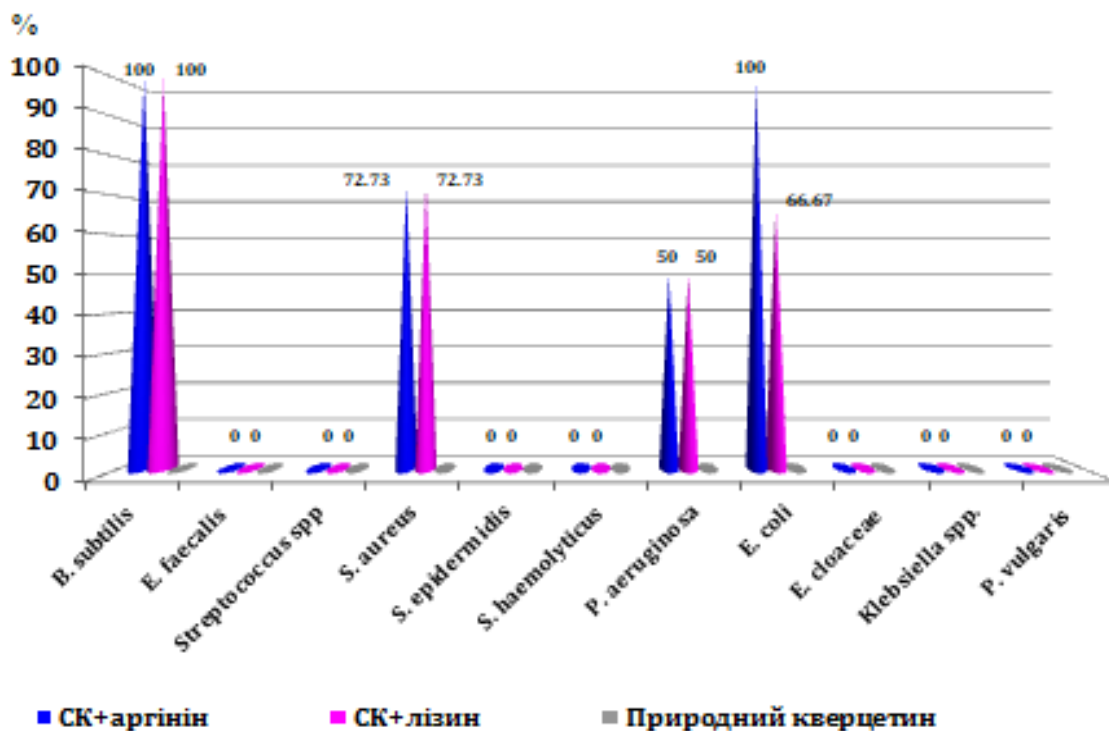


Рисунок 2 – Відсоткова кількість штамів мікроорганізмів, високо чутливих (МІК<15,6 мг/л) щодо сукцильованих похідних кверцетину (СК) деревини вишні звичайної, додатково модифікованих амінокислотами

Отже, за результатами проведених досліджень встановлено, що сукцильовані похідні кверцетину деревини *Rubus cerasus*, додатково модифіковані амінокислотами, виявили високу бактериостатичну дію стосовно 50,0 % штамів *P. aeruginosa* і 66,67 % досліджених штамів *E.coli* та помірну бактериостатичну активність стосовно решти досліджених представників родини *Enterobacteriaceae*.

Модифіковані похідні кверцетину деревини малини звичайної (*Rubus idaeus*) проявили високу інгібуючу активність щодо штаму *B. subtilis* ATCC 6633 (МІК 15,6 мг/мл), вищу за таку природного немодифікованого кверцетину деревини малини звичайної ( $p < 0,05$ ). МБ<sub>ц</sub>К модифікованих похідних кверцетину деревини *Rubus idaeus* була 31,25 мг/мл, що також було вірогідно ( $p < 0,05$ ) краще за показники не модифікованого кверцетину деревини малини.

Бактериостатична дія як природного кверцетину деревини малини звичайної, так і його модифікованих похідних щодо *E. faecalis* 3Н була помірною і проявлялася у концентрації 62,5 мг/мл. Бактерицидна активність нових речовин та препарату порівняння виявилася слабкою (МБ<sub>ц</sub>К 125,0 мг/мл).

Модифіковані похідні кверцетину деревини *Rubus idaeus* проявили високу бактериостатичну та помірну бактерицидну активність стосовно музейного тест-штаму *S. pneumoniae* ATCC 49619 (МІК та МБ<sub>ц</sub>К відповідно 15,6 мг/мл та 31,25 мг/мл). Проте клінічні

ізоляти виявилися до них менш чутливими та здебільшого проявляли помірний бактериостатичний та слабкий бактерицидний ефект (МІК та МБ<sub>ц</sub>К відповідно 62,5 мг/мл та 125,0 мг/мл).

За результатами експериментів встановлена вища або співвідносна з показниками природного кверцетину активність модифікованих похідних кверцетину деревини *Rubus idaeus* щодо *Staphylococcus spp.* Інгібуючі концентрації досліджених похідних відносно штамів *S. aureus* знаходились у межах 15,6–31,25 мг/мл. Бактерицидні концентрації перевищували бактериостатичні на одне розведення і становили 31,25–62,5 мг/мл. Стосовно 72,73 % досліджених штамів *S. aureus* модифіковані похідні кверцетину деревини *Rubus idaeus* проявили високу бактериостатичну та помірну бактерицидну дію у концентраціях відповідно 15,6 мг/мл та 31,25 мг/мл ( $p < 0,05$  відносно показників немодифікованого кверцетину деревини малини звичайної) (рис. 3).

Активність досліджених речовин щодо штамів коагулазонегативних стафілококів *S. epidermidis* та *S. haemolyticus* проявлялася у концентраціях 15,6–62,5 мг/мл. Найвищу активність виявив сукцильований кверцетин деревини малини звичайної, додатково модифікований аргініном, МІК та МБ<sub>ц</sub>К якого відповідно дорівнювали 15,6 мг/мл та 31,25 мг/мл ( $p < 0,05$  у порівнянні з показниками немодифікованого кверцетину).

Отже, сукцильовані похідні кверцетину деревини малини звичайної (*Rubus idaeus*), додатково модифіковані амінокислотами лізином та аргініном, володіють високою та помірною *in vitro* активністю щодо грампозитивних мікроорганізмів з показниками

МІК у межах 15,6–62,5 мкг/мл. Високу пригнічуючу активність модифіковані похідні кверцетину деревини малини звичайної проявили стосовно *B. subtilis* ATCC 6633, *S. pneumoniae* ATCC 49619 та 72,73 % штамів *S. aureus* (МІК у межах 7,8–15,6 мкг/мл).

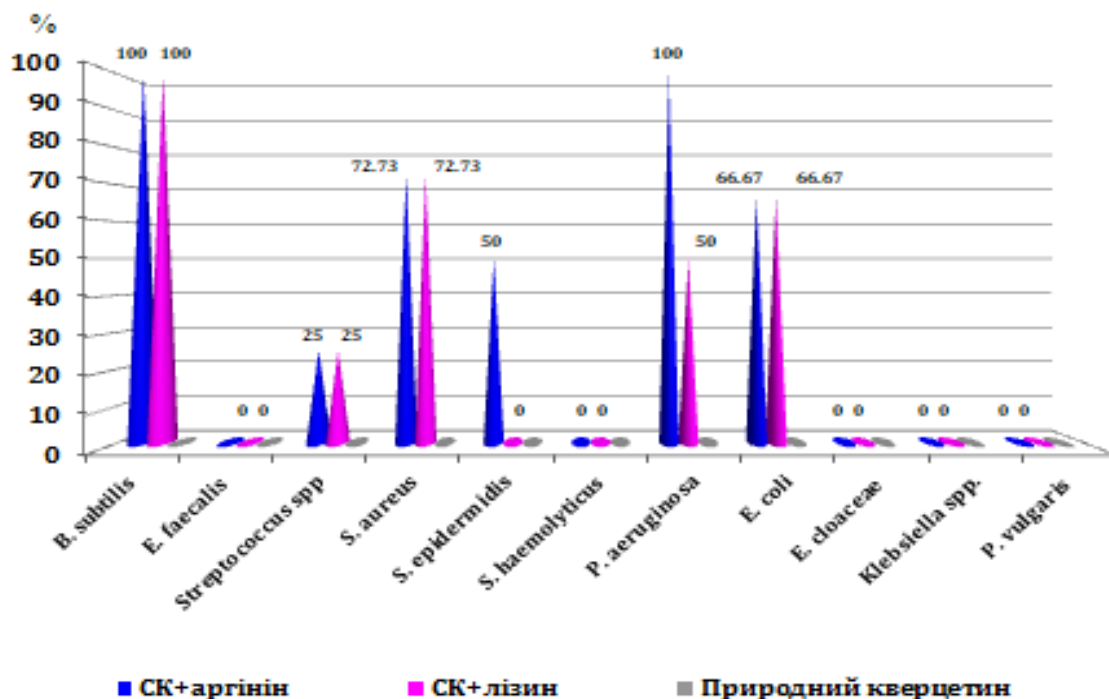


Рисунок 3 – Відсоткова кількість штамів мікроорганізмів, високо чутливих (МІК<15,6 мг/л) щодо сукцильованих похідних кверцетину (СК) деревини малини звичайної (*Rubus idaeus*), додатково модифікованих амінокислотами

Відносно усіх досліджених штамів *P. aeruginosa* сукцильовані похідні кверцетину деревини *Rubus idaeus*, додатково модифіковані амінокислотою аргініном, та щодо 50,0 % штамів *P. aeruginosa* – сукцильовані похідні кверцетину деревини малини звичайної, додатково модифіковані амінокислотою лізином, здійснювали високу бактеріостатичну дію у концентрації 15,6 мкг/мл, що достовірно ( $p < 0,05$ ) перевищувало показники природного кверцетину (рис. 3). Бактерицидна дія модифікованих похідних кверцетину деревини малини звичайної стосовно усіх досліджених штамів *P. aeruginosa* виявилася помірною (МБ<sub>н</sub>К у межах 31,25–62,5 мкг/мл).

Помірно чутливими до модифікованих похідних кверцетину деревини малини звичайною була переважна більшість досліджених штамів ентеробактерій. Найактивнішими досліджувані речовини виявились стосовно штамів *E. coli*. Модифіковані похідні кверцетину деревини *Rubus idaeus* стосовно 66,67 % досліджених штамів *E. coli* проявили високу бактеріостатичну дію (МІК 15,6 мкг/мл). Бактерицидну активність модифікованих похідних кверцетину деревини *Rubus idaeus* стосовно усіх досліджених штамів *E. coli* спостережено у

концентраціях 31,25–62,5 мкг/мл. Щодо представників роду *Proteus* модифіковані похідні кверцетину деревини малини звичайної проявили помірні бактеріостатичну та бактерицидну активність (МІК та МБ<sub>н</sub>К відповідно 31,25 мкг/мл та 62,5 мкг/мл).

Ступінь бактеріостатичної активності модифікованих похідних кверцетину деревини *Rubus idaeus* щодо представників родів *Klebsiella* та *Enterobacter* був помірним, співвідносився із показниками контролю та перебував у концентраціях 31,25–62,5 мкг/мл. Бактерицидно щодо зазначених штамів досліджувані речовини діяли у концентраціях в діапазоні 62,5–125,0 мкг/мл.

Отже, за результатами проведеного дослідження встановлено високу бактеріостатичну активність сукцильованих похідних кверцетину деревини малини звичайної (*Rubus idaeus*), додатково модифікованих амінокислотами, стосовно 66,67 % штамів *E. coli* (МІК 15,6 мкг/мл). Високу бактеріостатичну активність сукцильовані похідні кверцетину деревини *Rubus idaeus* проявили при додатковій модифікації аргініном стосовно 100,0 % та лізином – стосовно 50,0 % штамів *P. aeruginosa*.

Модифіковані похідні кверцетину деревини смородини чорної (*Ribes nigrum*) проявили високу

інгібуючу активність щодо штаму *B. subtilis* ATCC 6633 (МІК у межах 7,8–15,6 мкг/мл), достовірно вищу за таку немодифікованого природного кверцетину ( $p < 0,05$ ) (рис. 4). МБ<sub>ц</sub>К досліджуваних речовин знаходилась у межах 15,6–31,25 мкг/мл, що також було вірогідно ( $p < 0,05$ ) краще за показники препарату порівняння. Стосовно штаму *E. faecalis* ЗН модифіковані похідні кверцетину деревини *Ribes nigrum* проявили помірний бактериостатичний і слабкий бактерицидний ефекти (МІК та МБ<sub>ц</sub>К відповідно 62,5 мкг/мл та 125,0 мкг/мл). Майже аналогічну дію здійснювали модифіковані похідні кверцетину деревини *Ribes nigrum* і на стрептококи (МІК у межах 31,25–62,5 мкг/мл, МБ<sub>ц</sub>К у межах 62,5–125,0 мкг/мл).

За результатами експериментів встановлена висока та помірна активність модифікованих похідних кверцетину деревини *Ribes nigrum* щодо *Staphylococcus*

*spp.* Інгібуючі концентрації досліджених речовин відносно штамів *S. aureus* знаходились у межах 7,8–62,5 мкг/мл. Бактерицидні концентрації більшості речовин становили 15,6–125,0 мкг/мл. Модифіковані похідні кверцетину деревини смородини чорної проявили високу бактериостатичну активність стосовно 63,64 % досліджених штамів *S. aureus* (МІК у межах 7,8–15,6 мкг/мл). Сукцильована похідна кверцетину деревини смородини чорної, додатково модифікована аргініном, також здійснювала високу бактерицидну дію стосовно 27,27 % досліджених штамів *S. aureus* у концентрації 15,6 мкг/мл. Стосовно штамів коагулазонегативних стафілококів *S. epidermidis* та *S. haemolyticus* модифіковані похідні кверцетину деревини смородини чорної виявили помірний бактериостатичний та переважно слабкий бактерицидний ефекти (МІК у межах 31,25–62,5 мкг/мл, МБ<sub>ц</sub>К у межах 62,5–125,0 мкг/мл).

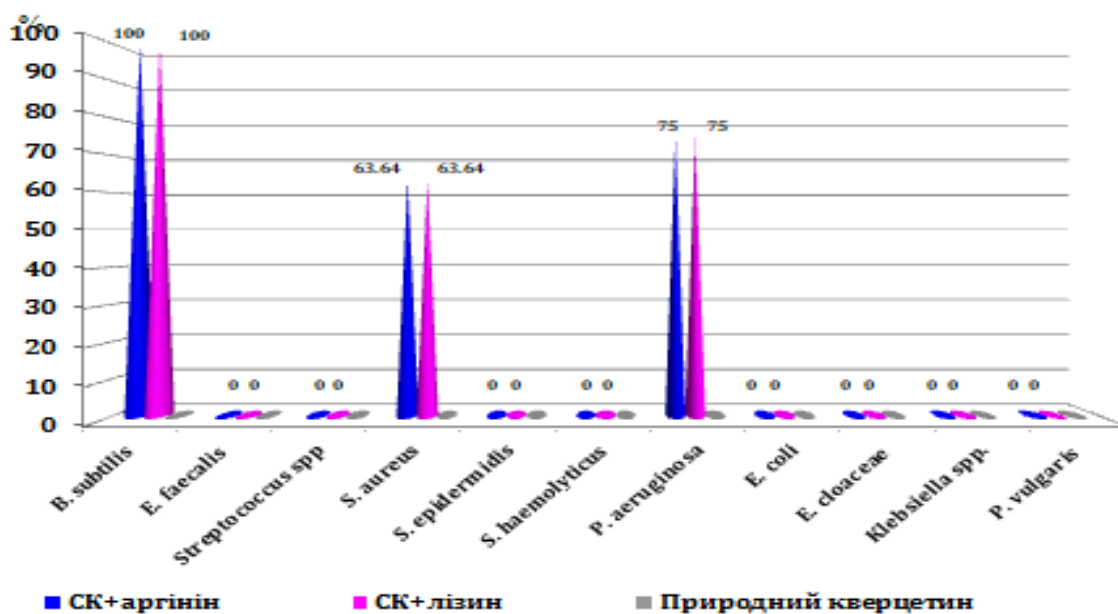


Рисунок 4 – Відсоткова кількість штамів мікроорганізмів, високо чутливих (МІК<15,6 мг/л) щодо сукцильованих похідних кверцетину (СК) деревини смородини чорної (*Ribes nigrum*), додатково модифікованих амінокислотами

Отже, за результатами проведених досліджень доведено, що сукцильовані похідні кверцетину деревини *Ribes nigrum*, додатково модифіковані амінокислотами лізином та аргініном, володіють високою та помірною *in vitro* активністю щодо грампозитивних мікроорганізмів з показниками МІК у межах 7,8–125,0 мкг/мл. Високу пригнічуючу активність модифіковані похідні кверцетину деревини *Ribes nigrum* проявили стосовно *B. subtilis* ATCC 6633 та 63,64 % штамів *S. aureus* (МІК у межах 7,8–15,6 мкг/мл). Високу бактерицидну дію здійснювала сукцильована похідна кверцетину деревини смородини чорної, додатково модифікована аргініном,

стосовно 27,27 % досліджених штамів *S. aureus* (МБ<sub>ц</sub>К 15,6 мкг/мл).

Встановлено, що бактериостатична дія модифікованих похідних кверцетину деревини *Ribes nigrum* щодо штамів *P. aeruginosa* проявлялася у концентраціях 15,6–31,25 мкг/мл. 75,0 % усіх досліджених штамів синьогнійної палички проявили високу чутливість стосовно модифікованих похідних кверцетину деревини *Ribes nigrum* (МІК 15,6 мкг/мл,  $p < 0,05$  в порівнянні з показниками немодифікованого кверцетину) (рис. 4). Бактерицидна дія модифікованих похідних кверцетину деревини *Ribes nigrum* стосовно усіх досліджених штамів *P. aeruginosa* була помірною (МБ<sub>ц</sub>К у межах 31,25–62,5 мкг/мл,  $p < 0,05$  в порівнянні з показниками немодифікованого кверцетину).

Стосовно усіх досліджених штамів ентеробактерій модифіковані похідні кверцетину деревини *Ribes nigrum* виявили помірний бактериостатичний ефект у концентраціях 31,25–62,5 мкг/мл. В той же час помірний бактерицидний ефект (МБ<sub>ц</sub>К 62,5 мкг/мл) досліджуваних речовин спостережено лише стосовно штамів *E.coli* та *P. vulgaris*. Стосовно решти досліджених представників родини *Enterobacteriaceae*, а саме представників родин *Klebsiella* та *Enterobacter*, модифіковані похідні кверцетину деревини смородини чорної виявили слабкий бактерицидний ефект (МБ<sub>ц</sub>К).

Отже, за результатами проведеного дослідження встановлено високу бактериостатичну активність сукцильованих похідних кверцетину деревини смородини чорної (*Ribes nigrum*), додатково модифікованих амінокислотами, стосовно 75,0 % штамів *P. aeruginosa* (МІК 15,6 мкг/мл) та помірний

бактериостатичний ефект стосовно усіх досліджених представників родини *Enterobacteriaceae*. Стосовно *E.coli* та *P. vulgaris* спостережено помірний бактерицидний ефект досліджених модифікованих похідних кверцетину деревини смородини чорної.

Модифіковані похідні кверцетину з листя смородини чорної (*Ribes nigrum*) проявили достатньо високу бактериостатичну активність щодо штаму *B. subtilis* ATCC 6633 (МІК у межах 15,6–31,2 5мкг/мл), вищу за таку природного кверцетину з листя смородини чорної ( $p < 0,05$ ) (рис. 5). Досліджено високу бактерицидну дію сукцильованих похідних кверцетину з листя смородини чорної при додатковій модифікації амінокислотою аргініном, та повільну – у разі додавання амінокислоти лізину (МБ<sub>ц</sub>К відповідно 15,6 мкг/мл та 31,25 мкг/мл,  $p < 0,05$  у порівнянні з показниками природного кверцетину).

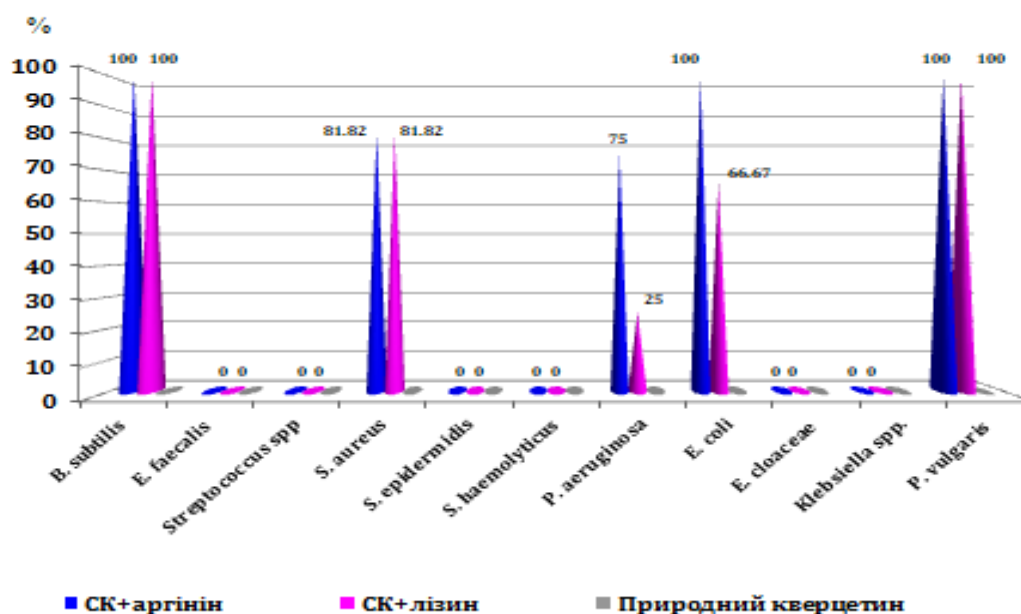


Рисунок 5 – Відсоткова кількість штамів мікроорганізмів, високо чутливих (МІК<15,6 мг/л) щодо сукцильованих похідних кверцетину (СК) з листя смородини чорної (*Ribes nigrum*), додатково модифікованих амінокислотами

Встановлено помірну бактериостатичну та слабку бактерицидну активність сукцильованих похідних кверцетину з листя *Ribes nigrum*, додатково модифікованих амінокислотами, стосовно *E. faecalis* ЗН (МІК 62,5 мкг/мл, МБ<sub>ц</sub>К 125,0 мкг/мл), які за своїм ступенем достовірно не відрізнялися від такої природного кверцетину.

Стосовно усіх досліджених представників родини *Streptococcus* модифіковані похідні кверцетину з листя *Ribes nigrum* проявили помірну протимікробну дію (МІК 31,25 мкг/мл, МБ<sub>ц</sub>К 62,5 мкг/мл).

За результатами експериментів встановлена висока або помірна дія модифікованих похідних щодо *Staphylococcus spp*. Стосовно 81,82 % досліджених штамів *S. aureus* модифіковані похідні кверцетину з

листя смородини чорної проявили високу бактериостатичну (рис. 5) та стосовно 45,45 % – високу бактерицидну активність (МІК у межах 7,8–15,6 мкг/мл, МБ<sub>ц</sub>К 15,6 мкг/мл). Бактериостатична дія досліджених речовин щодо усіх штамів коагулазонегативних стафілококів *S. epidermidis* та *S. haemolyticus* була поміною і проявлялась концентраціях 31,25–62,5 мкг/мл. Стосовно 75,0 % штамів коагулазонегативних стафілококів досліджені модифіковані похідні кверцетину з листя смородини чорної також виявили помірну бактерицидну дію (МБ<sub>ц</sub>К 62,5 мкг/мл).

Отже, за результатами проведених досліджень встановлено, що сукцильовані похідні кверцетину з листя смородини чорної (*Ribes nigrum*), додатково модифіковані амінокислотами лізином та аргініном,

володіють високою та помірною *in vitro* активністю щодо грампозитивних мікроорганізмів з показниками МІК у межах 7,8–62,5 мкг/мл. Високу бактеріостатичну активність модифіковані похідні кверцетину з листя смородини чорної проявили стосовно *B. subtilis* ATCC 6633 та 81,82 % штамів *S. aureus*, високу бактерицидну дію – стосовно 45,45 % штамів *S. aureus*. Щодо коагулозонегативних стафілококів протимікробна дія сукцильовані похідні кверцетину з листя смородини чорної, додатково модифіковані амінокислотами, була переважно помірною.

Досліджено високу бактеріостатичну дію сукцильованих похідних кверцетину з листя смородини чорної (*Ribes nigrum*) при додатковій модифікації аргініном щодо 75,0 % штамів *P. aeruginosa* та при додатковій модифікації лізином – стосовно 25,0 % досліджених штамів синьогнійної палички (МІК 15,6 мкг/мл,  $p < 0,05$  в порівнянні з показниками немодифікованого кверцетину) (рис. 5). Бактерицидна дія модифікованих похідних кверцетину з листя смородини чорної стосовно усіх досліджених штамів *P. aeruginosa* була помірною (МБ<sub>н</sub>К у межах 31,25–62,5 мкг/мл,  $p < 0,05$  в порівнянні з показниками немодифікованого кверцетину 125,0 мкг/мл).

У випадку додаткової модифікації сукцильованих похідних кверцетину з листя смородини чорної аргініном високу чутливіми до них були усі 100,0 % штамів *E. coli*, при додатковій модифікації лізином – 66,67 % штамів *E. coli* (МІК 15,6 мкг/мл,  $p < 0,05$  в порівнянні з показниками немодифікованого кверцетину 62,5 мкг/мл). Бактерицидна дія модифікованих похідних кверцетину з листя смородини чорної стосовно усіх досліджених штамів *E. coli* виявилася помірною (МБ<sub>н</sub>К у межах 31,25–62,5 мкг/мл,  $p < 0,05$  в порівнянні з показниками немодифікованого кверцетину 125,0 мкг/мл).

Стосовно усіх досліджених представників родини *Proteus* модифіковані похідні кверцетину з листя *Ribes nigrum* виявили високий бактеріостатичний та помірний бактерицидний ефекти (МІК та МБ<sub>н</sub>К відповідно 15,6 мкг/мл та 31,25 мкг/мл). Стосовно досліджених штамів *K. pneumoniae* та усіх досліджених представників роду *Enterobacter* з боку модифікованих похідних кверцетину з листя *Ribes nigrum* досліджено помірний бактеріостатичний та слабкий бактерицидний ефекти (МІК та МБ<sub>н</sub>К відповідно 62,5 мкг/мл та 125,0 мкг/мл), співвідносні з такими показниками природного кверцетину. Щодо штаму *K. oxytoca* ЮШ модифіковані похідні кверцетину з листя смородини чорної виявили помірну протимікробну активність (МІК та МБ<sub>н</sub>К відповідно 31,25 мкг/мл та 62,5 мкг/мл).

Отже, за результатами проведеного дослідження встановлено високу та помірну протимікробну активність досліджених модифікованих похідних кверцетину з листя смородини чорної (*Ribes nigrum*) стосовно грамнегативних мікроорганізмів. Високу бактеріостатичну дію (МІК 15,6 мкг/мл) стосовно досліджених штамів *P. aeruginosa* та *E. coli* частіше спостережено при додатковій модифікації

сукцильованих похідних кверцетину з листя смородини чорної амінокислотою аргініном (75,0 % штамів *P. aeruginosa* та 100,0 % штамів *E. coli*), ніж лізином (25,0 % штамів *P. aeruginosa* та 66,67 % штамів *E. coli*) (рис. 5).

## Висновки

1. Встановлено значну та помірну бактеріостатичну активність модифікованих похідних кверцетину, вилученого з рослинної сировини, стосовно досліджених 36 штамів грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів.

2. Сукцильовані похідні кверцетину, додатково модифіковані амінокислотами, виявили високу бактеріостатичну активність стосовно *B. subtilis* ATCC 6633, переважної більшості штамів *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *E. coli* (МІК у межах 7,8–15,6 мкг/мл).

3. Стосовно коагулозонегативних стафілококів, *E. faecalis* та *Streptococcus spp.*, а також представників родів *Proteus*, *Klebsiella* та *Enterobacter* ступінь бактеріостатичної дії досліджених модифікованих похідних кверцетину, вилученого з рослинної сировини, був помірним (МІК у межах 31,25–62,5 мкг/мл).

4. Доведено доцільність та експериментально обґрунтовано перспективність пошуку нових оригінальних протимікробних лікарських засобів на основі сукцильованих похідних кверцетину, додатково модифікованих амінокислотами лізином та аргініном.

## Antimicrobial activity of succillated quercetin derivatives additionally modified by amino acids

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

**Introduction.** Quercetin is one of the most famous flavonoids. Possibilities of chemical synthesis encourage the development and production of quercetin derivatives with new properties. Attempts to enhance the medicinal properties of quercetin by its chemical modifications are promising. **The aim of the work** is to study the antimicrobial properties of succylated quercetin derivatives extracted from plant raw materials, additionally modified with amino acids. **Materials and methods.** The antimicrobial activity of modified quercetin derivatives extracted from cultivated grapes, raspberry wood, cherry wood, wood and black currant leaves was determined. Samples with a quercetin content of 2.0% in the dry residue, which was modified with 2.0% of amber anhydride and 2.0% of the amino acids lysine and arginine, were studied. Substances of comparison were 2.0% extracts of unmodified natural quercetin extracted from the relevant parts of these plants. Studies of antimicrobial activity of substances were performed on 36 museum and clinical strains of microorganisms. Bacteriological studies were performed by the standard method of double serial dilutions. The minimum inhibitory concentration (MIC) was set at the lowest concentration of test substance that inhibited visible culture growth. The minimum bactericidal concentration (MBCC) was considered to be the lowest concentration that caused the death of at least 99.9% of bacteria.



**Results & discussion.** Succylated quercetin derivatives of grapevine, additionally modified with the amino acids lysine and arginine, showed high inhibitory activity against *B. subtilis* ATCC 6633 and 72.73% of *S. aureus* strains (MIC 15.6 µg / ml), *E. coli* strains and moderate bacteriostatic activity against the rest of the studied members of the family *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, members of the genus *Streptococcus* and coagulase-negative staphylococci. Modified quercetin derivatives of cherry wood showed high in vitro activity against *B. subtilis* ATCC 6633 and 72.73% of *S. aureus* strains (MIC in the range of 7.8–15.6 µg / ml), 50.0% of *P. aeruginosa* strains and 66.67% of the studied *E. coli* strains. Succillated quercetin derivatives of raspberry wood, additionally modified with the amino acids lysine and arginine, showed a high inhibitory effect on *B. subtilis* ATCC 6633, *S. pneumoniae* ATCC 49619 and 72.73% of *S. aureus* strains (MIC in the range of 7.8–15 µg / ml), 66.67% of *E. coli* strains (MIC 15.6 µg / ml). High bacteriostatic activity of succillated quercetin derivatives of raspberry wood was shown with additional modification by arginine in relation to 100.0% and lysine in relation to 50.0% of *P. aeruginosa* strains. High inhibitory activity of succillated quercetin derivatives of black currant wood, additionally modified with amino acids, was shown in relation to 75.0% of *P. aeruginosa* strains (MIC 15.6 µg / ml), *B. subtilis* ATCC 6633 and 63.64% *S. aureus* strains (MIC in the range of 7.8–15.6 µg / ml). High bactericidal action was carried out by succillated quercetin derivative of black currant wood, additionally modified with arginine, in relation to 27.27% of the studied strains of *S. aureus* (MBCC 15.6 µg / ml). For all studied members of the family *Enterobacteriaceae* for modified quercetin derivatives of black currant wood moderate bacteriostatic, and for *E. coli* and *P. vulgaris* also moderate bactericidal effect. Succulated quercetin derivatives from black currant leaves, additionally modified with amino acids, showed high bacteriostatic activity against *B. subtilis* ATCC 6633 and 81.82% of *S. aureus* strains, high bactericidal activity against 45.45% of *S. aureus* strains. For coagulase-negative staphylococci, their antimicrobial activity was mostly moderate. High bacteriostatic effect (MIC of 15.6 µg / ml) on the studied strains of *P. aeruginosa* and *E. coli* was more often observed with additional modification of succinate quercetin derivatives from currant leaves with the black amino acid arginine (75.0% of *P. aeruginosa* strains and 100.0% strains of *E. coli* strains) than lysine (25.0% of *P. aeruginosa* strains and 66.67% of *E. coli* strains). **Conclusion**

1. Significant and moderate bacteriostatic activity of modified quercetin derivatives extracted from plant raw materials in relation to the studied 36 strains of gram-positive and gram-negative microorganisms was found.
2. Succilated quercetin derivatives, additionally modified with amino acids, showed high bacteriostatic activity against *B. subtilis* ATCC 6633, the vast majority of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* strains (MIC in the range of 7.8–15.6 µg / ml).
3. With regard to coagulase-negative staphylococci, *E. faecalis* and *Streptococcus* spp., as well as representatives of the genera *Proteus*, *Klebsiella* and *Enterobacter*, the degree of bacteriostatic

action of the studied modified derivatives of quercetin extracted from plant raw materials was moderate (MIC in the range of 31.25 µg / ml). 4. The expediency and prospects of searching for new original antimicrobial drugs based on succylated quercetin derivatives, additionally modified with the amino acids lysine and arginine, have been proved and experimentally substantiated.

**Keywords:** succilated quercetin derivatives, amino acids, antimicrobial activity

## References

1. Khameneh B., Iranshahy M., Soheili. V., Fazly Bazzaz B. S. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2019. № 8. (118).
2. Voytsehivska O. V., Sitar O. V., Taran N. Yu. Phenolic compounds: diversity, biological activity, prospects of using The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University Series Biology. 2015. Vol. 1 (34). P.104–119.
3. 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.
4. Gregory S., Kelly N.D. Quercetin. *AMR.* 2011. V 16. № 2. P. 172-194.
5. Karimova E. R., Baltina L. A., Abdullin MI. Production of quercetin by acid hydrolysis of rutin Bulletin of Bashkir University. 2016. V. 21, № 1. P. 78-80.
6. Dmitrienko S.G., Kudrinskaya V.A., Apyari V.V. Methods of isolation, concentration and determination of quercetin *Journal of Analytical Chemistry.* 2012. V. 67, № 4. P. 340-353.
7. Kartsova L. A., Alekseeva A. V. Chromatographic and electrophoretic methods for the determination of polyphenolic compounds. *Journal of Analytical Chemistry.* 2008. V. 63, №11. P. 1126-1136.
8. 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.
9. Basnakyan I. A. Cultivation of microorganisms with desired properties. M. : Medicine, 1992. - P. 29-59.
10. 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.
11. Gubler E. V., Genkin A. A. Application of non-parametric criteria of statistics in biomedical research. L.: Medicine, 1973. 141 p.