

ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ НІЗИНУ, ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЯ, АМЛОДІПІНУ ТА ЇХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ КОМПОЗИЦІЙ ЩОДО РЕФЕРЕНТНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

Тетяна Осолодченко, Артур Мартинов, Ірина
Андрєва, Надія Завада,
Олена Батрак, Ірина Рябова

Інститут мікробіології та імунології ім. І. І.
Мечникова Національної академії медичних наук
України

Одним з перспективних методів боротьби з патогенними бактеріями є використання бактеріоцинів. Бактеріоцини мають ряд переваг, що дозволяють використовувати їх в якості альтернативи антибіотикам, а саме мають антимікробну активність, низьку токсичність, широкий і вузький спектр дії різних пептидів, дають можливість створення на їх основі біоінженерних конструкцій [1]. Найбільш відомим представником бактеріоцинів є нізин. Нізин є натуральним нетоксичним пептидом, який отримується за допомогою спеціального штаму харчової молочнокислої бактерії *Lactococcus lactis subsp. lactis* в процесі ферментації. Нізин визнаний безпечним при використанні більш ніж в 50 країнах. [2], [3], [4]. Незважаючи на наявність антибактеріальних властивостей і активне використання нізину в харчовій промисловості, його медичне застосування не виходить за рамки експериментальних досліджень і він досі не схвалений для клінічного застосування [5]. Перспективним може бути поєднання нізину з інгібіторами резистентності, які не мають прямої антимікробної дії, але тим чи іншим шляхом зв'язують фактори резистентності бактерій, відновлюючи їх чутливість до класичних антибіотиків. Інгібітори резистентності ще називають хелперними компонентами або молекулами-потенціаторами. Пошук хелперних речовин серед вже відомих та гарно вивчених субстанцій вважають перспективним напрямком боротьби з резистентністю мікроорганізмів.

Мета роботи – мікробіологічне обґрунтування доцільності створення фармацевтичних композицій на основі нізину, диклофенаку натрія та амлодіпіна для лікування інфекційних та гнійно-запальних захворювань.

Матеріали та методи

Досліджено протимікробну активність 1,0 % водяних розчинів нізину, диклофенаку натрія, амлодіпіну та їх комбінації. Модифікований нізин було отримано за допомогою біохімічних методів шляхом ацетилювання з оцтовим ангідридом. Для мікробіологічного дослідження досліджуваних речовин використані 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, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636. Протигрибкову дію речовин досліджено на референтному штамі *Candida albicans* ATCC 885-653. Культури мікроорганізмів було одержано з лабораторії медичної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ "ІМІ НАМН". Антимікробну активність досліджуваних речовин 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). 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 [7]. Синхронізацію культур проводили за допомогою низької температури (4°C) [8]. Мікробне навантаження становило 10⁷ мікробних клітин на 1 мл середовища і встановлювалося за стандартом McFarland. У роботу брали 18-24-х годинну культуру мікроорганізмів. Для бактерій використовували агар Мюллера-Хінтона. Для *Candida albicans* використовували агар Сабуро. Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів заміряли за допомогою мірної лінійки з точністю вимірювання 1,0 мм. 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. Дослідження проведені у трьох повторах. При постановці дослідів додатково проводили контролю росту культури в середовищі без досліджуваних речовин, у розчиннику; контролі чистоти суспензії мікроорганізму (шляхом висіву на неселективні середовища) та стерильності середовища.

Результати та обговорення

Результати мікробіологічних досліджень протимікробної активності 1,0 % водяних розчинів нізину, диклофенаку натрія, амлодіпіну в ізольованому вигляді та їх комбінацій наведені у таблиці 1. Встановлено помірний ступінь чутливості тест-штамів

S. aureus ATCC 6538-P та *B. subtilis* ATCC 6633 до 1,0 % водяного розчину немодифікованого нізину (діаметри зон затримки росту відповідно (22,0±0,0) мм і (17,7±0,5) мм). Чутливість тест-штаму *S. aureus* ATCC 25923 до немодифікованого нізину в ізольованому вигляді виявилась слабкою. Серед досліджених грамнегативних тест-штамів мікроорганізмів лише *P. aeruginosa* ATCC 9027 виявив помірну чутливість щодо 1,0 % водяного розчину немодифікованого нізину (діаметр зон затримки росту (16,0±0,0) мм). Для *E. coli* ATCC 25922 та *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. vulgaris* ATCC 4636, *C. albicans* ATCC 885-653 встановлена слабка протимікробна дія 1,0 % водяного розчину немодифікованого нізину (діаметри зон затримки росту у діапазоні від (13,0±0,0) мм до (13,7±0,5) мм).

Встановлено помірний ступінь чутливості усіх досліджених референтних тест-штамів грам позитивних мікроорганізмів до 1,0 % водяного розчину диклофенаку натрія в ізольованому вигляді (діаметр зон затримки росту у діапазоні від (15,0±0,0) мм до (19,0±0,0) мм). Активність 1,0 % водяного розчину диклофенаку натрія щодо переважної більшості досліджених тест-штамів грамнегативних мікроорганізмів та *C. albicans* ATCC 885-653 до 1,0 % водяного розчину диклофенаку натрія виявилась слабкою (діаметри зон затримки росту у діапазоні від (13,0±0,0) мм до (13,7±0,5) мм). Тест-штам *P. aeruginosa* ATCC 9027 виявився взагалі нечутливим до 1,0 % водяного розчину диклофенаку натрія.

Встановлено помірний ступінь чутливості тест-штамів грам позитивних мікроорганізмів до 1,0 % водяного розчину амлодіпіна (діаметри зон затримки росту в діапазоні від (16,0±0,0) мм до (17,7±0,5) мм). Серед досліджених грамнегативних мікроорганізмів помірну чутливість до 1,0 % водяного розчину амлодіпіна виявив тест-штам *E. coli* ATCC 25922 (діаметр зони затримки росту (16,0±0,0) мм). Стосовно решти досліджених тест-штамів грамнегативних мікроорганізмів і *C. albicans* ATCC 885-653 1,0 % водяний розчин амлодіпіна проявив слабку протимікробну дію (діаметри зон затримки росту від (13,0±0,0) мм до (14,0±0,0) мм).

При комбінуванні немодифікованого нізину та диклофенаку натрію встановлено помірний протимікробний ефект стосовно усіх досліджених грам позитивних і переважної більшості грамнегативних референтних штамів. Діаметри зон затримки росту тест-штамів грам позитивних мікроорганізмів перебували у діапазоні від (21,0±0,5) мм до (23,3±0,5) мм), тест-штамів *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *P. aeruginosa* ATCC 9027 – у діапазоні від (17,7±0,5) мм до (19,0±0,0) мм). Чутливість *P. vulgaris* ATCC 4636 та *C. albicans* ATCC 653/885 при комбінуванні немодифікованого нізину з диклофенаком натрія залишалася слабкою (діаметри зон затримки росту (12,7±0,5) мм).

Аналогічний ефект встановлено і при комбінуванні 1,0 % водяних розчинів нізину та амлодіпіну у

співвідношенні 1:1. Діаметри зон затримки росту тест-штамів грам позитивних мікроорганізмів перебували у діапазоні від (21,0±0,0) мм до (21,7±0,5) мм), тест-штамів *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *P. aeruginosa* ATCC 9027 – у діапазоні від (16,7±0,5) мм до (17,7±0,5) мм). Чутливість *P. vulgaris* ATCC 4636 та *C. albicans* ATCC 653/885 при комбінуванні нізину з амлодіпіном, як і при комбінуванні з диклофенаком натрія, залишалася слабкою (діаметри зон затримки росту (12,0±0,0) мм).

При потрібному комбінуванні 1,0 % водяних розчинів немодифікованого нізину, диклофенаку натрія та амлодіпіну у співвідношенні 1:1:1 ступінь чутливості усіх досліджених референтних штамів мікроорганізмів збільшувався несуттєво і залишався помірним для грам позитивних та грамнегативних бактерій і слабким – для *C. albicans* ATCC 653-885. Діаметри зон затримки росту грам позитивних мікроорганізмів коливались у межах від (22,7±0,0) мм до (23,7±0,5) мм, грамнегативних – від (15,7±0,0) мм до (20,0±0,0) мм, *C. albicans* ATCC 653-885 – (14,7±0,5) мм.

При комбінуванні диклофенаку натрія і амлодіпіна з ацетильованим нізином (1,0 % водяні розчини в співвідношенні 1:1) спостерігалось деяке збільшення чутливості, однак у межах помірної, до подвійних комбінацій тест-штамів грам позитивних та грамнегативних мікроорганізмів. При комбінуванні ацетильованого нізину з диклофенаком натрія діаметри зон затримки росту грам позитивних мікроорганізмів були (24,7±0,5) мм, грамнегативних – коливались від (17,7±0,5) мм до (21,7±0,5) мм. При комбінуванні ацетильованого нізину з амлодіпіном діаметри зон затримки росту грам позитивних мікроорганізмів знаходились у межах від (23,7±0,5) мм до (24,7±0,5) мм, грамнегативних – від (17,0±0,0) мм до (20,7±0,5) мм. Чутливість *C. albicans* ATCC 653-885 до подвійних комбінацій ацетильованого нізину як з диклофенаком натрія, так і з амлодіпіном залишалась слабкою.

При потрібному комбінуванні 1,0 % водяних розчинів ацетильованого нізину, диклофенаку натрія та амлодіпіну у співвідношенні 1:1:1 ступінь чутливості тест-штамів грам позитивних мікроорганізмів збільшився до високого (діаметри зон затримки росту у межах від (25,7±0,0) мм до (26,7±0,5) мм) і залишався помірним для грамнегативних бактерій (діаметри зон затримки росту від (19,7±0,5) мм до (23,0±0,0) мм). Також досліджено помірну протигрибкову дію потрібної комбінації ацетильованого нізину з диклофенаком натрія і амлодіпіном щодо тест-штаму *C. albicans* ATCC 653-885 (діаметр затримки росту (15,3±0,5) мм).

Таблиця 1 – Протимікробна активність нізину, диклофенаку натрія, амлодіпіну та їх комбінацій стосовно референтних штамів мікроорганізмів

№ п/п	Речовина	Діаметр зони затримки росту, (M±m) мм, (n=3)							
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. vulgaris</i> ATCC 4636	<i>P.aerugi nosa</i> ATCC 27853	<i>P.aerugi nosa</i> ATCC 9027	<i>C.albicans</i> ATCC 653-885
1	Нізін 1,0 % водяний розчин	14,0±0,0	22,0±0,0	17,7±0,5	13,0±0,0	13,0±0,0	13,7±0,5	16,0±0,0	13,0±0,0
2	Диклофенак натрія 1,0 % водяний розчин	15,0±0,0	19,0±0,0	17,0±0,0	13,7±0,5	13,0±0,0	13,7±0,5	зростання	13,0±0,0
3	Амлодіпін 1,0 % водяний розчин	16,0±0,0	17,7±0,5	17,7±0,5	16,0±0,0	13,0±0,0	14,0±0,0	14,0±0,0	13,0±0,0
4	Нізін 1,0 % + диклофенак натрія 1,0 %	21,0±0,5	23,3±0,5	22,7±0,5	18,0±0,0	12,7±0,5	19,0±0,0	17,7±0,5	12,7±0,5
5	Нізін 1,0 % + амлодіпін 1,0 %	21,0±0,0	21,7±0,5	21,7±0,5	16,7±0,5	12,0±0,0	17,7±0,5	16,7±0,5	12,0±0,0
6	Нізін 1,0 % + диклофенак натрія 1,0 % + амлодіпін 1,0 %	22,7±0,5	23,0±0,0	23,7±0,5	19,7±0,5	15,7±0,5	20,0±0,0	19,3±0,5	14,7±0,5
7	Ацетильований нізін 1,0 % + диклофенак натрія 1,0 %	24,7±0,5	24,7±0,5	24,7±0,5	21,7±0,5	17,7±0,5	19,0±0,0	18,0±0,0	14,3±0,5
8	Ацетильований нізін 1,0 % + амлодіпін 1,0 %	23,7±0,5	24,7±0,5	24,0±0,0	20,7±0,5	17,0±0,0	18,7±0,5	17,7±0,5	14,7±0,5
9	Ацетильований нізін 1,0 % + диклофенак натрія 1,0 % + амлодіпін 1,0 %	25,7±0,5	26,0±0,8	26,7±0,5	23,0±0,0	19,7±0,5	21,0±0,0	20,7±0,5	15,3±0,5

Висновки

1. Встановлено, що 1,0 % водянї розчини немодифікованого нізину, диклофенаку натрія та амлодіпіну в ізольованому вигляді здійснювали помірний протимікробний ефект переважно на грампозитивні мікроорганізми та при їх комбїнуванні – на грампозитивні та грамнегативні мікроорганізми.
2. Модифікація нізину шляхом ацетилювання призводила до підвищення його протимікробного ефекту в комбїнаціях з диклофенаком натрія і амлодіпіном.
3. Найвищий протимікробний ефект виявила потрійна комбїнація 1,0 % водяних розчинів ацетильованого нізину, диклофенаку натрія та амлодіпіна стосовно референтних штамів грампозитивних мікроорганізмів.

Antimicrobial activity of nisin, diclofenac sodium, amlodipine and their pharmaceutical compositions regarding reference strains of microorganisms Tetyana Osolodchenko, Artur Martynov, Iryna Andreyeva, Nadiya Zavada, Olena Batrak, Iryna Ryabova

Introduction. One of the promising methods of combating pathogenic bacteria is the use of bacteriocins. The most famous representative of bacteriocins is nisin. It may be promising to combine nisin with resistance inhibitors, which do not have a direct antimicrobial effect, but somehow bind the resistance factors of bacteria, restoring their sensitivity to classical antibiotics. The search for helper substances among already known and well-studied substances is considered a promising direction in the fight against the resistance of microorganisms. **The aim of the work** is the microbiological substantiation of the feasibility of creating pharmaceutical compositions based on nisin, diclofenac sodium and amlodipine for the treatment of infectious and purulent-inflammatory diseases.

Materials & methods. The antimicrobial activity of 1.0% aqueous solutions of nisin, diclofenac sodium, amlodipine and their combinations was studied. Modified nisin was obtained using biochemical methods by acetylation with acetic anhydride. 8 reference test cultures of microorganisms belonging to different taxonomic groups were used for microbiological research of the studied substances. The antimicrobial activity of the studied substances was determined by the diffusion method of "wells" with the measurement of the diameters of the growth retardation zones of microorganisms. **Results & discussion.** A moderate degree of sensitivity of the test strains *S. aureus* ATCC 6538-P and *B. subtilis* ATCC 6633 to 1.0 % aqueous solution of unmodified nisin was established. Among the studied gram-negative test strains of microorganisms only *P.aeruginosa* ATCC 9027 showed moderate sensitivity to 1,0 % aqueous solution of unmodified nisin. For *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC

27853, *P. vulgaris* ATCC 4636 and *C. albicans* ATCC 885-653 a weak antimicrobial effect of 1,0 % aqueous solution of unmodified nisin was established. A moderate degree of sensitivity of all investigated reference test strains of gram-positive microorganisms to 1.0 % aqueous solution of diclofenac sodium in isolated form was established. The activity of 1.0 % aqueous solution of diclofenac sodium against the vast majority of tested test strains of gram-negative microorganisms and *C. albicans* ATCC 885-653 to 1.0 % aqueous solution of diclofenac sodium was weak. The test strain *P.aeruginosa* ATCC 9027 was completely insensitive to 1.0 % aqueous solution of diclofenac sodium. A moderate degree of sensitivity of the test strains of gram-positive microorganisms to 1.0 % aqueous solution of amlodipine was established. Among the examined gram-negative microorganisms, the test strain *E. coli* ATCC 25922 showed moderate sensitivity to a 1.0% aqueous solution of amlodipine. Regarding the rest of the examined test strains of gram-negative microorganisms and *C. albicans* ATCC 885-653, the 1.0 % aqueous solution of amlodipine showed weak antimicrobial activity. When combining unmodified nisin and diclofenac sodium, a moderate antimicrobial effect was established against all tested gram-positive and the vast majority of gram-negative reference strains. A similar effect was established when combining 1.0 % aqueous solutions of nisin and amlodipine. With the triple combination of 1.0 % aqueous solutions of unmodified nisin, diclofenac sodium and amlodipine in a ratio of 1:1:1, the degree of sensitivity of all investigated reference strains of microorganisms increased insignificantly and remained moderate for gram-positive and gram-negative bacteria and weak for *C. albicans* ATCC 653-885. When diclofenac sodium and amlodipine were combined with acetylated nisin (1.0 % aqueous solutions in a 1:1 ratio), there was some increase in sensitivity, but within moderate limits, to double combinations of test strains of gram-positive and gram-negative microorganisms. Susceptibility of *C.albicans* ATCC 653-885 to double combinations of acetylated nisin with both diclofenac sodium and amlodipine remained weak. With a triple combination of 1.0 % aqueous solutions of acetylated nisin, diclofenac sodium and amlodipine in a ratio of 1:1:1, the degree of sensitivity of test strains of gram-positive microorganisms increased to high and remained moderate for gram-negative bacteria. The moderate antifungal effect of the triple combination of acetylated nisin with diclofenac sodium and amlodipine against the test strain *C.albicans* ATCC 653-885 was also investigated. **Conclusion.** 1. It was established that 1.0 % aqueous solutions of unmodified nisin, diclofenac sodium and amlodipine in isolated form exerted a moderate antimicrobial effect mainly on gram-positive microorganisms and, when combined, on gram-positive and gram-negative microorganisms. 2. Modification of nisin by acetylation led to an increase in its

antimicrobial effect in combinations with diclofenac sodium and amlodipine. 3. The triple combination of 1.0 % aqueous solutions of acetylated nisin, diclofenac sodium, and amlodipine showed the highest antimicrobial effect against reference strains of gram-positive microorganisms.

Key words: nisin, diclofenac sodium, amlodipine, pharmaceutical compositions, microorganisms, antimicrobial activity

References

1. Paul D. Cotter, R. Paul Ross, Colin Hill. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Micro.* 2012. №11. P. 95–105.
2. Burov A. M. Experimental justification of the use of a multicomponent gel with nisin for the prevention and therapy of wound infection: dissertation. ... doctor of philosophy: 03.00.07 – 222 "Medicine" / A. M. Burov; Kharkiv National Medical University. Kharkiv, 2021. 176 p.
3. Kudryashov V. L., Alekseev V. V., Fursova N. A. Nisin and natamycin are effective food microbiological preservatives. *Food industry.* 2020. No. 2 (44). P. 67–71.
4. Bisenova G.N., Sarmurzyna Z.S., Almagambetov K.Kh., Toryna A.K., Borybaeva A.Zh. Study of bacteriocin-producing activity of isolates and collection cultures of lactic acid bacteria. *Science news of Kazakhstan.* 2016. No. 1, (127). P.86–98.
5. Knysh, O. V., & Martynov, A. V.. Microbiological substantiation of the use of synergistic polymyxin-nisin combinations (review). *Annals of mechnikov institute.* 2023. No.2. P. 17–25.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.8046043>.
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. : St Ent Sc Ph C 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.