

О. І. Трембач, Н. В. Хохленкова

Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України

## Мікробіологічні дослідження у процесі розробки мазі ранозагоювальної дії

**Метою роботи є** вибір концентрації ефірної олії фенхелю звичайного як антимікробного компонента та олії амаранту як антиоксидантного компонента у складі мазі ранозагоювальної дії для терапії ран у другій та третій фазах ранового процесу.

**Матеріали та методи.** Об'єктами досліджень були модельні зразки мазі з ліпофільним екстрактом нагідків лікарських, олією амаранту та ефірною олією фенхелю звичайного. Антибактеріальну та протигрибкову активність модельних зразків мазі визначали в дослідіах *in vitro* методом дифузії в агар у модифікації «колодязів». Антиоксидантні властивості вивчали методом біотестування на біологічній моделі інфузорій *Paramecium caudatum*, які вирощували в живильному середовищі Лозина-Лозинського за температури 20-26 °С. Статистично обробляли результати за допомогою програмного забезпечення Excel для Windows.

**Результати та їх обговорення.** Результати виконаних досліджень засвідчили наявність антимікробної дії різного ступеня для всіх зразків мазі з різною концентрацією ефірної олії фенхелю. Спостерігали повільне зростання антимікробної активності мазей з підвищенням концентрації ефірної олії фенхелю. Перспективними концентраціями ефірної олії фенхелю, які здатні забезпечувати максимальну антимікробну дію у складі мазі ранозагоювальної дії, є 1,5 % та 2,0 %. З огляду на незначну різницю в зонах затримки зростання і через вимоги безпечності та економічності для подальших досліджень було обрано концентрацію ефірної олії фенхелю 1,5 %. Дослідні зразки з різною концентрацією олії амаранту проти контролю продемонстрували подовження періоду активності інфузорій під впливом отрут, що свідчить про наявність високого рівня антиоксидантної властивості.

**Висновки.** На основі результатів мікробіологічних досліджень і біотестування під час створення мазі ранозагоювальної дії для терапії у другій та третій фазах ранового процесу обґрунтовано концентрацію антимікробного та антиоксидантного компонентів: ефірної олії фенхелю – 1,5 %, олії амаранту – 8 %.

**Ключові слова:** антимікробна активність; ефірна олія фенхелю; біотестування; антиоксидантна активність; олія амаранту

О. І. Trembach, N. V. Khokhlenkova

National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine

### Microbiological studies in the development of a wound healing ointment

**Aim.** To select the concentration of fennel essential oil as an antimicrobial component and amaranth oil as an antioxidant component in the composition of a wound healing ointment for the wound therapy in the second and third phases of the wound process.

**Materials and methods.** The study objects were model samples of the ointment with the lipophilic extract of marigold, amaranth oil and fennel essential oil. The antibacterial and antifungal activity of the model samples of the ointment was determined in experiments *in vitro* by the agar diffusion method. The study of antioxidant properties was performed by biotesting on the biological model of *Paramecium caudatum* infusoria grown in the Lozin-Lozinsky nutrient medium at a temperature of 20-26 °C. The results were statistically processed using the Excel for Windows software.

**Results and discussion.** The results of the studies conducted showed the presence of the antimicrobial action of varying degrees for all ointment samples with different concentrations of fennel essential oil. There was a slow increase in the antimicrobial activity of ointments with an increase in the concentration of fennel essential oil. The promising concentrations of fennel essential oil providing the maximum antimicrobial effect in the composition of the wound healing ointment were 1.5 % and 2.0 %. Taking into account a slight difference in the growth retardation zones and the requirements of safety and cost-effectiveness 1.5 % concentration of fennel essential oil was chosen for further research. Exposure of the experimental samples with different concentrations of amaranth oil led to a prolongation of the period of activity of infusoria under the influence of poisons compared to the control, indicating the presence of a high level of antioxidant activity.

**Conclusions.** Based on the microbiological studies and biotesting, the concentration of antimicrobial and antioxidant components (fennel essential oil – 1.5 %, amaranth oil – 8 %) has been substantiated when developing a wound healing ointment for the therapy in the second and third phases of the wound process.

**Key words:** antimicrobial activity; fennel essential oil; biotesting; antioxidant activity; amaranth oil

**Вступ.** Пошук ефективних і водночас безпечних методів лікування ран, що важко загоюються, є актуальною та важливою проблемою. Особливістю лікування важкозагоювальних ран є тривалість перебігу захворювання, що своєю чергою вимагає довгострокового лікування синтетичними препаратами,

які, попри високу ефективність, мають багато побічних проявів.

Як відомо, тривале застосування антимікробних препаратів сприяє резистентності мікроорганізмів, що призводить до зниження місцевої та системної імунної активності організму.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, у межах первинної медико-санітарної допомоги майже 80 % населення світу використовує лікарські препарати здебільшого на основі речовин природного походження. Це демонструє певні переваги природних препаратів у схемі лікування, а саме: широкий спектр дії, можливість індивідуального вибору в процесі лікування супутніх захворювань, гнучкий режим дозування та зниження ризику появи ускладнень.

Тому, попри динамічний розвиток медицини й активне впровадження нових препаратів для лікування ран, зокрема й антибактеріальних засобів, актуальним є розширення діапазону наукових досліджень зі створення та впровадження у виробництво і медичну практику нових засобів для лікування ран, трофічних виразок, опіків на основі сировини природного походження.

Попередніми дослідженнями нами було обґрунтовано склад мазі ранозагоювальної дії для терапії у другій та третій фазах ранового процесу й доведено доцільність поєднання ліпофільного екстракту нагідків лікарських (*Calendula officinalis* L.), олії амаранту (*amaranthum oleum*) та ефірної олії фенхелю звичайного (*Foeniculum vulgare* L.) як активних компонентів.

Обраний склад забезпечить прогнозовану антимікробну, протизапальну, антиоксидантну та репаративну дію мазі, зменшить вірогідність виникнення резистентності в патогенних мікроорганізмів, сприятиме прискоренню грануляції та епітелізації тканин [1].

**Метою роботи** є вибір концентрації ефірної олії фенхелю звичайного як антимікробного компонента та олії амаранту як антиоксидантного компонента у складі мазі ранозагоювальної дії для терапії ран у другій та третій фазах ранового процесу.

**Матеріали та методи.** Об'єктами досліджень були модельні зразки мазі з ліпофільним екстрактом нагідків лікарських, олією амаранту та ефірною олією фенхелю звичайного. Типом основи мазі є емульсійна система у вигляді емульгелю. Як гідрофобну фазу було використано обрані ліпофільні екстракти лікарських рослин, як емульгатор було обрано аристоксифлекс – синтетичний полімерний емульгатор гідрофільної природи, співполімер вінілпіролідону та акриламідометилпропансульфонової кислоти.

Антибактеріальну та протигрибкову активність модельних зразків мазі визначали в досліді *in vitro* методом дифузії в агар у модифікації «колодязів». Метод заснований на здатності активних речовин дифундувати в попередньо засіяне тест-культурою агаризоване середовище. Результати досліджень дозволяють характеризувати як антимікробну активність препарату, так і вивільнення антимікробних речовин з основи, бо зони затримки зростання мікроорганізмів утворюються внаслідок дифузії цих речовин у щільне живильне середовище [2, 3].

Оцінювали активність досліджуваних зразків на таких стандартних тест-штамах мікроорганізмів, як: грампозитивний мікроорганізм *Staphylococcus aureus*

ATCC 25293, спорова культура *Bacillus subtilis* ATCC 6633, грамнегативні культури *Escherichia coli* ATCC 25922 і *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, дріжджоподібний гриб *Candida albicans* ATCC 885-653.

У роботу брали 18-24 годинну культуру мікроорганізмів. Мікробне навантаження складало  $1 \times 10^7$  КУО/мл (колонієутворювальних одиниць в 1 мл середовища). Для досліджень використовували агар Мюллера-Хінтона (для бактеріальних культур) та агар Сабура (для гриба).

Визначали активність на двох шарах щільного живильного середовища, розлитого в чашки Петрі. До чашок Петрі вносили по 10 мл розтопленого «голодного» незасіяного середовища. Після застигання нижнього шару агару на його поверхні на рівній відстані один від одного та від краю чашки розміщали 3-6 тонкостінних циліндрів з неіржавкої сталі (діаметр – 8 мм, висота – 10,0 мм). Навколо циліндрів заливали верхній шар, що складався з розтопленого та охолодженого до 45 °С агару, у який вносили посівну дозу добової культури мікроорганізму. Після застигання верхнього шару середовища циліндри вилучали стерильним пінцетом, а в утворені лунки вносили досліджувані зразки з урахуванням обсягу лунок. Чашки Петрі витримували 30-40 хвилин за кімнатної температури й поміщали в термостат на 18-24 години.

Облік результатів виконували шляхом вимірювання зони пригнічення зростання мікроорганізмів, з урахуванням і діаметра лунок. Вимірювали з точністю до 1 мм, орієнтуючись на цілковиту відсутність видно зростання.

Для оцінювання активності зразків орієнтувались на такі загальноприйнятні характеристики: відсутність зон затримки зростання мікроорганізмів навколо лунки, а також зона затримки діаметром до 10 мм свідчать про те, що мікроорганізм не чутливий до внесеного у лунку зразка; зони затримки зростання діаметром 10-15 мм свідчать про низьку чутливість культури; зони затримки зростання діаметром 15-25 мм розцінювали як показник чутливості мікроорганізмів до досліджуваного зразка; зони затримки зростання діаметром понад 25 мм – як показник високої чутливості мікроорганізмів до досліджуваного зразка [4].

Антиоксидантні властивості вивчали методом біотестування на біологічній моделі інфузорій *Paramecium caudatum*, які вирощували в живильному середовищі Лозина-Лозинського за температури 20-26 °С. Для живлення парамецій використовували живі дріжджі *Rhodotorula gracilis* із додаванням пшеничного борошна [5].

Серед тест-організмів, що їх застосовують під час біотестування, інфузорії займають провідне місце. Вони є зручними об'єктами для досліджень, а отримані результати мають високий коефіцієнт кореляції з даними подібних досліджень на мишах, щурах, кроликах та інших тваринах [6, 7].

Висока чутливість інфузорій до мембранотропних речовин дозволила запропонувати інфузорії як модель для скринінгу та біологічної стандартизації

Результати антимікробної активності зразків мазі

Зразок (концентрація ефірної олії фенхелю)	Культури мікроорганізмів				
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 885-653
	Діаметри зон затримки зростання мікроорганізмів, (M ± m)* мм				
1 (0,5 %)	19,5 ± 0,3	16,7 ± 0,5	14,8 ± 0,2	12,0 ± 0,5	21,5 ± 0,7
2 (1,0 %)	20,1 ± 0,2	16,8 ± 0,2	15,0 ± 0,2	12,9 ± 0,5	24,5 ± 0,5
3 (1,5 %)	23,5 ± 0,5	17,2 ± 0,5	17,0 ± 0,4	14,1 ± 0,3	26,7 ± 0,3
4 (2,0 %)	23,5 ± 0,3	17,5 ± 0,7	17,3 ± 0,3	14,5 ± 0,5	27,0 ± 0,1

Примітка: \* M ± m – довірчий інтервал, n = 5, P = 95 %.

лікарських засобів антиоксидантного та мембрано-стабілізувального типів дії, а висока чутливість на дію різних речовин – для токсикологічного оцінювання лікарських засобів. У наших дослідженнях біотестування використано для вивчення антиоксидантної дії зразків (гострий дослід).

Біотестування виконували на основі аналізу зростання популяції інфузорій та порівняння їх реакцій на підвищені концентрації речовин у досліджуваних пробах, що містять дослідну й контрольну популяції. У досліді оцінювали вплив зразків на тривалість періоду активності інфузорій у середовищі з додаванням токсичних речовин. Як токсиканти використовували: 1 % розчин перексиду водню, який в умовах *in vitro* розщеплюється до перекисних радикалів і пошкоджує переважно ліпідну частину мембрани; 14 % етиловий спирт, який пошкоджує білки мембрани [8].

**Результати та їх обговорення.** Одним з ефектів розробленої ранозагоювальної мазі є антимікробна дія. Основним діючим компонентом, який забезпечує потенційний прояв антимікробної дії, є ефірна олія фенхелю. Тому першим етапом роботи було вивчення антимікробної активності досліджуваних зразків мазі з різною концентрацією ефірної олії фенхелю – від 0,5 % до 2,0 %.

Результати дослідження антимікробної активності експериментальних зразків наведено в табл. 1.

Результати досліджень (табл. 1) засвідчили наявність антимікробної дії різного ступеня для всіх зразків мазі з різною концентрацією ефірної олії фенхелю. Спостерігали повільне зростання антимікробної активності мазей із підвищенням концентрації ефірної олії. Штами *S. aureus*, *E. coli* виявилися чутливими навіть до зразка № 1 з найменшою концентрацією ефірної олії зі збільшенням зон затримки зростання для зразків № 2-4. Штами *P. aeruginosa*, *B. subtilis* оцінено як низькочутливі до зразків № 1-2, а до зразків № 3-4 штаму *P. aeruginosa* виявився чутливим, а штаму *B. subtilis* – низькочутливим. Штам *C. albicans* у нашому дослідженні виявився чутливим до зразків № 1-2 та високочутливим до зразків № 3-4.

Отже, аналіз отриманих даних дозволяє висувати, що перспективними концентраціями ефірної олії фенхелю, які здатні забезпечувати максимальну антимікробну дію у створюваному продукті, є 1,5 %

Таблиця 2

Вплив зразків мазі на тривалість збереження рухової активності клітин *Paramecium caudatum* після додавання клітинних отрут

Концентрація олії амаранту в зразках	Тривалість рухової активності парамецій, (M ± m)* хв	
	у 14 % розчині етанолу	у 1 % розчині перексиду водню
4 %	4,48 ± 0,15	3,38 ± 0,21
6 %	5,57 ± 0,20	5,03 ± 0,17
8 %	7,27 ± 0,11	6,58 ± 0,09
10 %	7,35 ± 0,24	6,13 ± 0,25
Контроль	3,08 ± 0,10	1,75 ± 0,12

Примітки: \* (M ± m) – довірчий інтервал; n = 5; P = 95 %.

та 2,0 %, а через незначну різницю в зонах затримки зростання для зразків № 3 та № 4 і вимоги безпечності й економічності для подальших досліджень з розроблення ранозагоювальної мазі обрано концентрацію ефірної олії фенхелю 1,5 %.

Наступним етапом роботи було визначення концентрації олії амаранту, яку було обрано як компонент із високими антиоксидантними властивостями. Вибір концентрації проводили за допомогою біотестування на клітинах *Paramecium caudatum*. У цій серії дослідів готували зразки мазі з різним вмістом олії амаранту – від 4 % до 10 %.

Вплив експериментальних зразків із різною концентрацією олії амаранту на тривалість збереження рухової активності парамецій після додавання клітинних отрут наведено в табл. 2.

Як бачимо, вплив дослідних зразків із різною концентрацією олії амаранту на тривалість рухової активності інфузорій суттєвий – проти контролю спостерігаємо її подовження внаслідок дії отрут, що свідчить про наявність високого рівня антиоксидантної властивості.

Найкращі результати були в разі одночасного додавання 14 % розчину етанолу та дослідного зразка з 10 % олії амаранту – тривалість рухової активності збільшувалась від 3,08 хв до 7,35 хв. Але для цього ж дослідного зразка за додавання 1 % розчину перексиду водню тривалість рухової активності інфузорій (6,13 хв) була меншою, ніж у попередній

точці – у зразка з концентрацією 8 % олії амаранту (6,58 хв). Отже, за результатами цієї серії дослідів найбільш прийнятною концентрацією олії амаранту у складі мазі є 8 %.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** На основі результатів мікробіологічних

досліджень та біотестування у межах розроблення мазі ранозагоювальної дії для терапії у другій та третій фазах ранового процесу обґрунтовано концентрацію антимікробного та антиоксидантного компонентів: ефірної олії фенхелю – 1,5 %, олії амаранту – 8 %.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Трембач О. І., Хохленкова Н. В. Теоретичне обґрунтування складу мазі ранозагоювальної дії з діючими компонентами рослинного походження / *Вісник фармації*. 2022. № 1 (103). С. 48-54. DOI: <https://doi.org/10.24959/nphj.22.81>.
2. Державна фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Доп. 5. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2021. 424 с.
3. Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST disk diffusion method. 2015. Version 5.0 January 2015. 21 p. URL: [http://www.infection-control.org.ua/wp-content/uploads/2016/03/7-Manual\\_v\\_5.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test.pdf](http://www.infection-control.org.ua/wp-content/uploads/2016/03/7-Manual_v_5.0_EUCAST_Disk_Test.pdf).
4. Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» : Наказ МОЗ України від 05.04.2007 р. № 167. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07#Text>.
5. Кордон Т. І. Використання одноклітинних водоростей як індикаторних тест-систем для визначення цитотоксичності. *Науковий вісник Ужгородського університету: Серія: Біологія*. 2012. Вип. 32. С. 172–175.
6. Степченко Л. М., Крива О. А., Чумак В. О. Рівень безпечності Гуміліду, визначений біотестуванням на інфузоріях. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2020. Vol. 7, № 4. С. 210-214. DOI: 10.32819/2019.74037.
7. Ecotoxicity assessment using ciliate cells in millifluidic droplets / R. Illing et al. *Biomicrofluidics*. 2016. Vol. 10, № 2. P. 024115. DOI: 10.1063/1.4944869.
8. Федоровська М. І., Половко Н. П., Стрілець О. П. Вивчення антиоксидантних властивостей дерматокосметичних засобів з рослинними субстанціями на біологічній моделі *Paramecium caudatum*. *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 2 (55). С. 22-25. DOI: <https://doi.org/10.24959/ubphj.18.165>.

### REFERENCES

1. Trembach, O. I., Khokhlenkova, N. V. (2022). *Visnyk farmatsii, 1 (103)*, 48-54. doi: <https://doi.org/10.24959/nphj.22.81>.
2. DP «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv». (2021). *Derzhavna farmakopeia Ukrainy*. (2<sup>nd</sup> ed.). (Dop. 5). Kharkiv, 424.
3. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. (2015). Version 5.0. Available at: [http://www.infectioncontrol.org.ua/wp-content/uploads/2016/03/7-Manual\\_v\\_5.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test.pdf](http://www.infectioncontrol.org.ua/wp-content/uploads/2016/03/7-Manual_v_5.0_EUCAST_Disk_Test.pdf).
4. MOZ Ukrainy. (2007). «Pro zatverdzhennia metodychnykh vkazivok «Vyznachennia chutlyvosti mikroorhanizmiv do antybakterialnykh preparativ»: Nakaz vid 05.04.2007 r. № 167. [zakon.rada.gov.ua](https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07#Text). Available at: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07#Text>.
5. Kordon, T. I. (2012). *Naukovyi visnyk Uzhhorodskoho universytetu: Serii: Biolohiia*, 32, 172–175.
6. Stepchenko, L. M., Kryva, O. A., Chumak, V. O. (2020). *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 7 (4), 210-214. doi: 10.32819/2019.74037.
7. Illing, R., Burkart, C., Pfitzner, D., Jungmann, D., Baraban, L., Cuniberti, G. (2016). Ecotoxicity assessment using ciliate cells in millifluidic droplets. *Biomicrofluidics*, 10 (2), 024115. doi: 10.1063/1.4944869.
8. Fedorovska, M. I., Polovko, N. P., Strilets, O. P. (2018). *Ukrainskyi biofarmatsevtichnyi zhurnal*, 2 (55), 22-25. doi: <https://doi.org/10.24959/ubphj.18.165>.

#### Відомості про авторів:

Трембач О. І., аспірант кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України.

E-mail: [alex.trembach.ua@gmail.com](mailto:alex.trembach.ua@gmail.com)

Хохленкова Н. В., докторка фармац. наук, професорка, завідувачка кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет

Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: [hohnatal@gmail.com](mailto:hohnatal@gmail.com). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1676-7591>

#### Information about authors:

Trembach O. I., postgraduate student of the Department of Biotechnology, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine.

E-mail: [alex.trembach.ua@gmail.com](mailto:alex.trembach.ua@gmail.com)

Khokhlenkova N. V., Doctor of Pharmacy (Dr. habil.), professor, head of the Department of Biotechnology, National University of Pharmacy

of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: [hohnatal@gmail.com](mailto:hohnatal@gmail.com). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1676-7591>

Надійшла до редакції 24.01.2023 р.