



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **144151** (13) **U**  
(51) МПК (2020.01)

**C12Q 1/00**

**G01N 1/28** (2006.01)

**G01N 33/15** (2006.01)

**C12R 1/725** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2020 01128</b>	(72) Винахідник(и): <b>Лобань Галина Андріївна (UA), Ананьєва Майя Миколаївна (UA), Басараб Ярослав Олексійович (UA), Фаустова Марія Олексіївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>21.02.2020</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>11.09.2020</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.09.2020, Бюл.№ 17</b>	(73) Власник(и): <b>УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ, вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНГІЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТУ ПРОТЕФЛАЗИДУ

### (57) Реферат:

Спосіб визначення фунгіцидної активності екстракту протейфлазиду включає готування дослідних та контрольних зразків мікроорганізмів. Для антибактеріальної дії використовують робочий розчин протейфлазиду в кількості 1,0 см<sup>3</sup>, що містить не менше 0,32 мг флавоноїдів в перерахунку на рутин і не менше 0,3 мг суми карбонових кислот в перерахунку на яблучну кислоту, який за допомогою мікропіпетки зі стерильним наконечником вносять в першу пробірку, що містить 1,0 см<sup>3</sup> бульйону, ретельно перемішують і новим стерильним наконечником переносять 1,0 см<sup>3</sup> розчину в бульйоні в наступну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> бульйону, повторюючи процедуру для приготування всього необхідного ряду розведень.

UA 144151 U



Корисна модель належить до медицини, а саме до медичної мікробіології, та може бути призначена для визначення ступеня фунгіцидної активності екстракту протейфлазиду.

Інфекційні хвороби в наш час залишаються значною проблемою охорони здоров'я у всьому світі, що тягне за собою необхідність пошуку нових препаратів для зменшення її масштабів [8]. В свою чергу використання антибіотиків призвело до виникнення значної стійкості мікроорганізмів різного ступеня патогенності до антибактеріальних препаратів, що активно застосовуються при лікуванні інфекцій. У зв'язку з цим в даний час пошук нових біологічно активних речовин природного походження, в тому числі рослинного, для профілактики та лікування захворювань інфекційного характеру займає важливе місце серед фармацевтичних досліджень [1]. Особлива увага науковців до препаратів рослинного походження обумовлена їх меншою токсичністю та досить широким спектром антибактеріальної та противірусної дії [7, 4]. Оскільки виникнення асоційованих інфекцій сприяє створенню умов, за яких звичайна антибіотикотерапія є неефективною [2]. Це дає змогу розглядати препарати, діючою речовиною яких є флавоноїди екстракту протейфлазид, як перспективу пошуку нових засобів ефективного лікування інфекційних хвороб [5]. Даний екстракт отримують шляхом спиртового екстрагування (96 % -й спирт) рослинної сировини - диких злаків *Calamadrostis epigeios* та *Deschampsia caespitosa*, з яких вилучаються стійкі молекулярні комплекси трицину, апигеніну, лютеоліну та кверцитину [6]. Протейфлазид сприяє підвищенню неспецифічної резистентності організму до вірусної та бактеріальної інфекції шляхом продукції ендogenous α - і γ- інтерферонів до фізіологічно активного рівня. Крім цього він запобігає накопиченню продуктів перекисного окислення ліпідів, пригнічуючи перебіг вільнорадикальних процесів. Екстракт є модулятором апоптозу та посилює дію апоптозіндукувальних речовин, що сприяє його значній антиоксидатній активності [3].

Раніше вважалось, що дріжджоподібні гриби (переважно *Candida spp.*) викликають близько 3 % інфекційних післяопераційних ускладнень. Однак, останнім часом їх роль в розвитку захворювань важких хірургічних хворих істотно зростає. Так представники роду *Candida* є шостими серед основних госпітальних патогенів та четвертими серед збудників нозокоміальних бактеріємій.

Це пов'язано зі зростанням застосування азолів (флуконазол, ітраконазол, клотримазол та ін.), які проявляють високу фунгістатичну дію відносно *C. albicans*. в профілактиці і лікуванні післяопераційних грибкових ускладнень. У зв'язку з цим закономірно підвищення наукового інтересу щодо пошуку нових альтернативних препаратів, які володіють протигрибковою дією щодо *C. albicans*. Це дозволить підвищити ефективність профілактики і лікування кандидозів у важких хворих хірургічних, опікових відділень і відділень інтенсивної терапії. Перспективними в цьому плані вважаються препарати на основі рослинних екстрактів, які практично позбавлені побічних ефектів і мають гарну протимікробну дію.

Серед тих, що відомі, є спосіб інгібування активності біоплівки грибів *Candida albicans* шляхом застосування ліпосомальної форми антимікотиків, який відрізняється тим, що для інгібування активності біоплівки грибів *Candida albicans* як антигрибковий засіб застосовують тербінафін на основі лецитину в органічних розчинах у співвідношенні тербінафін: лецитин 1:5-1:20 з концентрацією ліпідів 1-2 % та розміром ліпосом 160-180 нм. Пат. На корисну модель 72274 Україна. МПК А61Р 31/10. СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ АКТИВНОСТІ БІОПЛІВОК ГРИБІВ *CANDIDA ALBICANS* /Мавров Геннадій Іванович (UA); Іванова Ніна Миколаївна(UA). - № u 201203547; Заявл. 25.10.2012; Опубл. 25.10.2012, бюл. № 20.

Також відомий спосіб фунгіцидного впливу світлодіодного випромінювання апаратів Medolight на *Candida albicans*, що включає опромінення мікроорганізмів світлодіодним випромінюванням на твердому поживному середовищі, який відрізняється тим, що опромінення мікрофлори здійснюють світлодіодним випромінюванням червоно-інфрачервоного (λ=630 та 880 нм) та синьо-інфрачервоного (λ=470 та 880 нм) діапазонів апаратів Medolight-Red та Medolight-Blu-Doc з щільністю потужності 26 мВт/см<sup>2</sup> при частотах 0, 10, 600, 3000 та 8000 Гц з відстані 1 см, після пересіву на чашки Петрі 16-24-годинної агарової культури, доведеної до оптичної густини 0,5 за Мак-Фарландом та розведеної в 160 тис., разів, далі чашки з мікроорганізмами поміщають в термостат і витримують при температурі 37 °С протягом 24 год., отримані результати порівнюють із контрольними (неопроміненими) культурами, при цьому фунгіцидна дія найбільш виражена при світлодіодному випромінюванні червоно-інфрачервоного спектра з тривалістю експозиції понад 20 хвилин при частоті 8000 Гц... Пат. На корисну модель 125047 Україна, МПК С12М 1/42 (2006.01), С12Q 1/06 (2006.01). С12R 1/725 (2006.01). СПОСІБ ФУНГІЦИДНОГО ВПЛИВУ СВІТЛОДІОДНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ АПАРАТІВ MEDOLIGHT НА *CANDIDA ALBICANS* /Автори: Пантьо Валерій Вачерійович (UA); Коваль Галина Миколаївна (UA); Данко Ельвіра Михайлівна (UA); заявник та патентовласник:

ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ", вул. Підгірна, 46, м. Ужгород, 88000 (UA). - № у 201712247; Заявл. 11.12.2017; Опубл. 25.04.2018, бюл. № 8/2018.

5 Найближчим аналогом є спосіб інгібування активності грибів *Candida albicans*, що включає застосування антимікотика, який відрізняється тим, що на клінічний штам *Calbicans* в обсязі 0,5 см<sup>3</sup> розведення з кінцевої концентрацією культури мікроорганізму 106 КУО/ см<sup>3</sup> як антимікотик використовують спиртовий розчин хлорофіліпту в кількості 1,0 мл, який містить 10,0 мг сухої речовини хлорофіліпту екстракту густого в перерахунку на 100 %. Пат. На корисну модель 131144 Україна, МПК А61В 17/00, А61Р 31/10(2006.01). СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ АКТИВНОСТІ ГРИБІВ *CANDIDA ALBICANS* /Автори: Лобань Галина Андріївна (UA); Ананьєва Майя Миколаївна (UA); Басараб Ярослав Олексійович (UA); Фаустова Марія Олексіївна (UA); Аветіков Давид Соломонович (UA); заявник та патентовласник: ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава. 36011 (UA). - № у 201806528; Заявл. 11.06.2018; Опубл. 10.01.2019, бюл. № 1/2019.

15 В основу корисної моделі поставлена задача вивчення фунгіцидної активності екстракту протейфлазиду щодо *Candida albicans*.

Поставлена задача вирішується тим, що створенням способу визначення фунгіцидної активності екстракту протейфлазиду, що включає готування дослідних та контрольних зразків мікроорганізмів, згідно з корисною моделлю, для фунгіцидної дії використовують робочий розчин протейфлазиду в кількості 1,0 см<sup>3</sup>, що містить не менше 0,32 мг флавоноїдів в перерахунку на рутин і не менше 0,3 мг суми карбонових кислот в перерахунку на яблучну кислоту, який за допомогою мікропіпетки зі стерильним наконечником вносять в першу пробірку, що містить 1,0 см<sup>3</sup> бульйону, ретельно перемішують і новим стерильним наконечником переносять 1,0 см<sup>3</sup> розчину в бульйоні в наступну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> бульйону, повторюючи процедуру для приготування всього необхідного ряду розведень.

25 Для інокуляції використовують мікробну суспензію, еквівалентну 1,0 за стандартом МакФарланда, розведена в 100 разів у фізіологічному розчині, після чого концентрація мікроорганізмів в ній становить  $3 \times 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>, по 0,1 см<sup>3</sup> інокулюма вносять в кожну пробірку, що містить по 1,0 см<sup>3</sup> відповідних розведень робочого розчину, і в одну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> поживного бульйону без екстракту, як "негативний контроль", далі пробірки закривають стерильними пробками і інкубують в звичайній атмосфері при температурі 37 °С протягом 20-24 год., з подальшим визначенням мінімальної концентрації протейфлазиду шляхом посіву мікроорганізмів з поживного бульйону на поживний агар, далі посіви інкубують в звичайній атмосфері при температурі 35 °С протягом 20-24 год.

35 Спосіб здійснюється наступним чином: в розчині 1 мл протейфлазиду знаходиться екстракт (1:1), що містить не менше 0,32 мг, флавоноїдів в перерахунку на рутин і не менше 0,3 мг, суми карбонових кислот в перерахунку на яблучну кислоту; допоміжна речовина - спирт етиловий 96 %. Робочий розчин в кількості 1,0 см<sup>3</sup> за допомогою мікропіпетки зі стерильним наконечником вносять в першу пробірку, що містить 1,0 см<sup>3</sup> бульйону. Ретельно перемішують і новим стерильним наконечником переносять 1,0 см<sup>3</sup> розчину в бульйоні в наступну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> бульйону. Цю процедуру повторюють для приготування всього необхідного ряду розведень. З останньої пробірки 1,0 см<sup>3</sup> бульйону видаляють. Таким чином, отримують ряд пробірок з розчинами протейфлазиду, концентрації яких відрізняються в сусідніх пробірках в 2 рази.

45 Для інокуляції використовують мікробну суспензію еквівалентну 1,0 за стандартом МакФарланда, розведена в 100 разів у фізіологічному розчині, після чого концентрація мікроорганізмів в ній становить  $3 \times 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>. По 0,1 см<sup>3</sup> інокулюма вносять в кожну пробірку, що містить по 1,0 см<sup>3</sup> відповідних розведень робочого розчину, і в одну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> поживного бульйону без екстракту, як "негативний контроль". Інокулюм вносять в пробірки з розведеннями одразу після приготування.

50 Пробірки закривають стерильними пробками і інкубують в звичайній атмосфері при температурі 37 °С протягом 20-24 год. Бактерицидна мінімальна концентрація протейфлазиду визначається шляхом посіву мікроорганізмів з поживного бульйону на поживний агар виробництва Державного дослідного підприємства Інституту продовольчих ресурсів НААН України. Посіви інкубують в звичайній атмосфері при температурі 35 °С протягом 20-24 год. Для визначення наявності росту мікроорганізму пробірки з посівами не переглядають у прохідному світлі, в порівнянні з "негативним" контролем, оскільки при змішуванні поживного бульйону та розчину, що містить флавоноїди, утворюється помутніння. Враховуючи цей факт, визначається виключно бактерицидна мінімальна концентрація (МБК) та мінімальна фунгіцидна концентрація (МФК) протейфлазиду, шляхом посіву мікроорганізмів з поживного бульйону на поживний агар.

У результаті, штами культур *S. albicans*, виявили відсутність видимого росту грибів цього роду при концентрації флавоноїдів 0,04 мкг/мл, що свідчить про його виражену фунгіцидну дію.

Отримані дані розширяють уявлення про чутливість еталонних штамів мікроорганізмів *S. albicans* до дії екстракту протекфлазиду. Тому використання отриманих результатів в медицині та пошук нових препаратів на основі флавоноїдів є досить перспективним для подальших досліджень. Оскільки при використанні екстракту протекфлазиду у комплексній терапії вірусних інфекцій може попереджувати розвиток вторинної грибкової інфекції.

Джерела інформації:

1. Богоявленский А.П. Противовирусные препараты растительного происхождения /А.П. Богоявленский, А.С. Турмагамбетова, В.Э. Березин //Биологические науки. Фундаментальные исследования. - 2013. - № 6. - С. 1141-1145.
2. Вовк И.Б. Использование флавоноидов в комплексном лечении женщин с воспалительными заболеваниями гениталий вирусно-бактериальной этиологии /И.Б. Вовк. О.О. Ревенко, О.И. Данилюк //Здоровье женщины. - 2002. - № 4 (12). - С. 43-45.
3. Годлевська Н.А. Ефективність системного та місцевого застосування препарату Протекфлазид у лікуванні патології шийки матки, спричиненої папіломатозною інфекцією /Н.А. Годлевська, А.В. Старовір //Здоровье женщины.- 2012. - № 3 (69). - С. 155-159.
4. Оценка эффективности препарата Протекфлазид при лечении папилломавирусной инфекции: мета-анализ результатов многолетних клинических исследований /В.В. Каминский. М.Н. Шалько, В.С. Михайлов [и др.] //Медицинские аспекты здоровья женщины. - 2015. - № 6 (92). - С. 5-14.
5. Протекфлазид: специфическая активность в отношении вируса гепатита С в доклинических исследованиях; эффективность и безопасность при лечении гепатитов В и С в клинической практике (систематический обзор) /А.Н. Печенка, А.И. Гриневич, Т.А. Кручко [и др.] //Клиническая инфектология и паразитология. - 2015. - № 2 (13). - С. 78-97.
6. Протигрипозний ефект N-стеароїлетаноламіну /Н.М. Гула, А.А. Чумак, С.Л. Рибалко. Д.Б. Старосила [та ін.] //Журнал національної академії медичних наук України. - 2014. - Т. 20. № 4.- С. 393 401.
7. Balunas M.J. Drug discovery from medicinal plants /M.J. Balunas, A.D. Kinghorn //Life Sci. - 2005. - Vol. 78. - P. 431-441.
8. Global trends in emerging infectious diseases /K.E. Jones, N.G. Patel. M.A. Levy [et al.] //Nature. - 2008. Vol. 451, № 71. - P. 990-993.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб визначення фунгіцидної активності екстракту протекфлазиду, що включає готування дослідних та контрольних зразків мікроорганізмів, який **відрізняється** тим, що для антибактеріальної дії використовують робочий розчин протекфлазиду в кількості 1,0 см<sup>3</sup>, що містить не менше 0,32 мг флавоноїдів в перерахунку на рутин і не менше 0,3 мг суми карбонових кислот в перерахунку на яблучну кислоту, який за допомогою мікропіпетки зі стерильним наконечником вносять в першу пробірку, що містить 1,0 см<sup>3</sup> бульйону, ретельно перемішують і новим стерильним наконечником переносять 1,0 см<sup>3</sup> розчину в бульйоні в наступну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> бульйон, повторюючи процедуру для приготування всього необхідного ряду розведень.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для інокуляції використовують суспензію, еквівалентну 1,0 за стандартом МакФарланда, розведена в 100 разів у фізіологічному розчині, після чого концентрація мікроорганізмів в ній становить  $3 \times 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>, по 0,1 см<sup>3</sup> інокулюма вносять в кожен пробірку, що містить по 1,0 см<sup>3</sup> відповідних розведень робочого розчину, і в одну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> поживного бульйону без екстракту, як "негативний контроль", далі пробірки закривають стерильними пробками і інкубують в звичайній атмосфері при температурі 37 °С протягом 20-24 год., з подальшим визначенням мінімальної концентрації протекфлазиду шляхом посіву мікроорганізмів з поживного бульйону на поживний агар, далі посіви інкубують в звичайній атмосфері при температурі 35 °С протягом 20-24 год.

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601