

УДК 615.322:615.076.7:615.017



АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНО-СПИРТОВЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ЛИСТЬЕВ И ПОЧЕК ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR* L.)

Н.А. Рябов, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, С.Д. Колпакова, А.В. Жестков, А.В. Лямин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Получено 25.12.2020

Принята к печати 20.03.2021

Проблема поиска новых противомикробных препаратов на основе лекарственного растительного сырья в современной фармацевтической практике является по-прежнему актуальной. Интерес представляют растительные объекты, обладающие антимикробным действием благодаря содержанию в них комплекса биологически активных веществ. Дуб черешчатый – *Quercus robur* L. является перспективным растительным объектом, лекарственное растительное сырье которого может быть использовано при разработке новых антимикробных препаратов.

Цель. Проведение скрининга антимикробной активности водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого.

Материалы и методы. Определение минимальной ингибирующей концентрации проводилось методом двойных серийных разведений в питательном бульоне Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США). В качестве тестовых культур были использованы штаммы микроорганизмов Американской коллекции типовых культур (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), а также *Candida albicans* (клинический штамм). Инкубацию проводили при температуре 35°C в течение 24 часов. Параллельно проводился опыт для постановки «отрицательного» контроля. Оценку результатов проводили визуально по наличию/отсутствию роста микроорганизмов в пробирках с соответствующими разведениями исследуемых образцов.

Результаты. В ходе проведенного исследования установлено, что водно-спиртовые извлечения листьев дуба черешчатого оказывают наибольший антимикробный эффект в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Водно-спиртовые извлечения почек дуба черешчатого проявляют выраженную антимикробную активность в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*.

Выявлено, что препарат настойка листьев дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5) обладает выраженным антимикробным эффектом на штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, а при большей кратности разведения на штаммы *Escherichia coli* и *Candida albicans*. Препарат настойка почек дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5) обладает выраженным антимикробным эффектом в отношении штаммов микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans* при восьмикратном разведении. В отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa* антимикробная активность наблюдалась при 16 кратном разведении. Максимально выраженный антимикробный эффект был зафиксирован в отношении штамма *Candida albicans* при 32-кратном разведении.

В результате проведенного исследования можно сделать вывод о том, что для получения противомикробных препаратов – настойки листьев и почек дуба черешчатого, целесообразно использовать в качестве оптимального экстрагента спирт 70% в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5). При данных параметрах экстракции отмечается наибольший антимикробный эффект в отношении изучаемых штаммов микроорганизмов. Также спирт 70% обладает лучшей проникающей способностью в глубокие слои эпидермиса по сравнению с более высокими концентрациями.

Заключение. Полученные результаты скринингового анализа антимикробной активности будут использованы в качестве обоснования для внедрения антимикробных препаратов на основе листьев и почек дуба черешчатого в медицинскую и фармацевтическую практику.

Ключевые слова: Дуб черешчатый; *Quercus robur* L.; листья; почки; водно-спиртовые извлечения; настойка; минимальная ингибирующая концентрация; антимикробная активность

Список сокращений: ATCC – Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection); MRSA – Метициллин-резистентный золотистый стафилококк (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*); CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute; MRS-штаммы – Метициллин-резистентные стафилококки (Methicillin-resistant *Staphylococcus*); МИК – Минимальная ингибирующая концентрация; ГФ РФ – Государственная Фармакопея Российской Федерации; КОЕ/мл – Колониеобразующие единицы / мл; SMR-1547 – Индекс гербария Самарского государственного университета, кафедра экологии, ботаники и охраны природы, биологического факультета; МУК – Методические указания; Q. – *Quercus* L. (н-р, Q. *robur*)

Для цитирования: Н.А. Рябов, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, С.Д. Колпакова, А.В. Жестков, А.В. Лямин. Антимикробная активность водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). *Фармация и фармакология*. 2021;9(2):104-113. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-104-113

© Н.А. Рябов, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, С.Д. Колпакова, А.В. Жестков, А.В. Лямин, 2021

For citation: N.A. Ryabov, V.M. Ryzhov, V.A. Kurkin, S.D. Kolpakova, A.V. Zhestkov, A.V. Lyamin. Antimicrobial activity of water-ethanolic extractions from *Quercus Robur* L. leaves and buds. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(2):104-113. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-104-113

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF WATER-ETHANOLIC EXTRACTS FROM *QUERCUS ROBUR* L. LEAVES AND BUDS

N.A. Ryabov, V.M. Ryzhov, V.A. Kurkin, S.D. Kolpakova, A.V. Zhestkov, A.V. Lyamin

Samara State Medical University,
89, Chapaevskaya Str., Samara, Russia, 443099

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Received 25 Dec 2020

Accepted 20 March 2021

The problem of finding new antimicrobial drugs based on medicinal plant raw materials in modern pharmaceutical practice, is still relevant. There are interesting plant objects that have an antimicrobial action due to the content of a complex of biologically active substances in them. *Quercus robur* L. is a promising plant object, medicinal plant raw materials of which can be used for the development of new antimicrobial drugs.

The aim of the study is screening of the antimicrobial activity of water-ethanolic extractions from *Quercus robur* L. leaves and buds.

Materials and methods. The determination of the minimum inhibitory concentration was carried out by the method of double serial dilutions in Mueller-Hinton nutrient broth (Bio-Rad, USA). As test cultures, strains of microorganisms of the American Type Culture Collection (ATCC) were used: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), as well as *Candida albicans* (a clinical strain). The incubation was carried out at the temperature of 35°C for 24 hours. Simultaneously, an experiment was carried out to establish a “negative” control. The results were assessed visually by the presence / absence of the growth of microorganisms in test tubes with the corresponding dilutions of the test samples.

Results. In the course of the study, it was found out that water-ethanolic extractions of *Quercus robur* L. leaves have the greatest antimicrobial effect against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The water-ethanolic extractions of *Quercus robur* L. buds exhibit a pronounced antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* strains.

It was revealed that the preparation of *Quercus robur* L. leaves tincture in the raw material:extractant ratio of 1:5 has a pronounced antimicrobial effect on the strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and with a higher multiplicity of dilution – on the strains of *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The drug tincture of *Quercus robur* L. buds in the raw material:extractant ratio of 1:5 has a pronounced antimicrobial effect on the strains of microorganisms *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* in an eight-fold dilution. With respect to *P. aeruginosa* strains, antimicrobial activity was observed in 16-fold dilutions. The most pronounced antimicrobial effect was recorded against the *C. albicans* strain in a 32-fold dilution.

As a result of the study, it can be concluded that to obtain the antimicrobial drugs – tincture of *Quercus robur* L. leaves and buds – is advisable to use the optimal extractant – 70% alcohol in a raw material:extractant ratio of 1:5. With these parameters of extraction, the greatest antimicrobial effect is observed in relation to the studied strains of the microorganisms. 70% alcohol has also a better penetrating ability into the deep layers of the epidermis in comparison with higher concentrations.

Conclusion. The results of the screening analysis of the antimicrobial activity will be used as a justification for the introduction of antimicrobial drugs based on the leaves and buds of the *Quercus robur* L. in a medical and pharmaceutical practice.

Key words: English oak; *Quercus robur* L.; leaves; buds; water-ethanolic extractions; tincture; minimum inhibitory concentration; antimicrobial activity

List of abbreviations: ATCC – American Type Culture Collection; MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute; MRS strains – Methicillin-resistant *Staphylococcus*; MIC – Minimum inhibitory concentration; SP RF – State Pharmacopoeia of the Russian Federation; CFU / ml – Colony forming units / ml; SMR-1547 – Index Herbarium of the Samara State University, Department for Ecology, Botany and Nature Protection Faculty of Biology; G, MUK – “Guidelines”, “Methodical instructions”; Q. – *Quercus* L. (eg, *Q. robur*). – English oak

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время получение новых антимикробных препаратов на основе растительного сырья является актуальной задачей современной фармации. Распространение антимикробной резистентности представляет собой серьезную опасность, которая заключается в снижении эффективности мероприятий по профилактике и лечению инфекционных заболеваний человека [1, 2].

В плане поиска новых противомикробных препаратов перспективным объектом является представитель

рода *Quercus* L., вид – дуб черешчатый (*Quercus robur* L.). В роде *Quercus* L. более 500 видов из умеренных и субтропических районов Северного полушария. В России в диком виде произрастают 19 видов, интродуцировано около 50 видов [3, 4]. Дуб является одной из важнейших лесообразующих пород Европы и европейской части России [3, 4]. Дуб черешчатый достаточно широко применяется в народной медицине в качестве средства при профилактике и лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, гинекологических заболеваний, а также при оториноларингологических

и дерматологических заболеваниях. Официальным классическим лекарственным средством, обладающим вяжущими и противовоспалительными свойствами, является отвар коры дуба черешчатого [5–7]. За последнее время было проведено большое количество исследований, посвященных изучению антимикробных свойств коры дуба, а также препаратов на ее основе [8–16]. Кора дуба черешчатого входит в состав многих комплексных препаратов, например, «Стоматофит», «Тонзилгон Н», «Дентос» и др., а также используется для получения экстрактов, используемых в медицинских и косметологических целях¹. В коре дуба помимо дубильных веществ содержатся тритерпены (фриделин, фриделинол, 3-фриделанол), флавоноиды, такие как кверцетин, кверцитрин, лейкоантоцианидин и др. [13, 17–19]. Флавоноиды как группа биологически активных соединений обладают рядом ценных фармакологических свойств, таких как противовоспалительное, диуретическое, желчегонное, спазмолитическое, противовирусное, антимикробное и др.² [18–20].

Ранее, в целях поиска новых антибактериальных средств, было проведено исследование вида *Quercus incana*, в ходе которого было выделено два вещества: 4-гидроксидекановая кислота и 4-гидрокси-3-(гидроксиметил)пентановая кислота. Выделенные соединения были протестированы на наличие противогрибковой активности против *Aspergillus niger* и *Aspergillus favus*. Антибактериальную активность выделенных соединений определяли методом диффузии в лунки агара. Соединение 4-гидроксидекановая кислота проявляло большую антимикробную активность против *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* и *Micrococcus luteus* (грамположительные). Полученные соединения проявляли антибактериальную активность против *Staphylococcus aureus* с зоной подавления 16 мм и 13 мм. Соединение 4-гидрокси-3-(гидроксиметил)пентановая кислота было умеренно активным в отношении *Bacillus subtilis* и *Micrococcus luteus* с зоной подавления 5 мм и 9 мм. Оба соединения были неактивны в отношении *Escherichia coli* и *Shigella flexneri* [11].

Было проведено исследование по изучению профиля полифенолов в экстрактах, полученных из коры *Q. robur*, *Q. macrocarpa* и *Q. acutissima*, в результате которого была выявлена антиоксидантная, антибактериальная, противогрибковая и противоопухолевая активность. *Q. robur* проявлял значительную антимикробную активность против *Pseudomonas aeruginosa* по сравнению с экстрактами других видов [13].

Проводилось исследование по определению антимикробной активности метанольного экстракта коры *Quercus robur* (раствор 80% метанола в воде), который тестировали методом диффузии в агар на штам-

мы *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* и *Candida albicans* [14]. В результате исследования была определена возможность использования экстрактов коры дуба в качестве бактерицидного средства в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и бактериостатического средства в отношении *Enterobacter aerogenes* [14]. Липофильные экстракты проявляли активность против штаммов *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* и *Candida albicans* [14].

Помимо водных извлечений коры дуба черешчатого, интерес представляют водно-спиртовые извлечения из других видов растительного сырья данного растения, таких как листья и почки дуба. На данный момент проведено достаточное количество исследований по изучению листьев дуба черешчатого как российскими, так и зарубежными учеными. Их внимание было сфокусировано на изучении морфолого-анатомических особенностей, химического состава и антимикробных свойств [21–24]. Листья представителей рода *Quercus* являются перспективными объектами для получения лекарственных препаратов с антимикробными свойствами [21–24]. Изучение почек дуба черешчатого наряду с листьями, на наш взгляд, является также актуальным направлением, потому как почки некоторых растений способны проявлять антимикробную активность и обладают ценным химическим составом [25, 26].

Одним из серьезных факторов при успешном лечении инфекционных заболеваний является снижение устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам [9, 27]. Особый интерес заслуживают стафилококки или метициллин-резистентные (MRS-штаммы), которые являются причиной внутрибольничных и внебольничных инфекций. Среди MRS-штаммов чаще всего обнаруживается золотистый стафилококк (MRSA), штаммы которого устойчивы к многим представителям группы β -лактамов антибиотиков, включая такие как пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы др. [9, 27]. Не менее опасным штаммом является грамотрицательная бактерия *E. coli*, которая присутствует в кишечнике человека и может быть причиной различных инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы [27, 28]. Изучения антимикробных свойств водно-спиртовых извлечений и препаратов на основе листьев и почек дуба черешчатого позволит расширить спектр фармакологической активности *Q. robur* и оценить возможности использования данного объекта при создании препаратов, применяемых в антибактериальной терапии.

Для объективной оценки антимикробной активности изучаемого сырья необходимо проведение скринингового анализа водно-спиртовых извлечений и определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в отношении основных клинически значимых штаммов микроорганизмов.

¹ Государственный реестр лекарственных средств. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_6283.htm

² Assessment report on *Quercus robur* L., *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Quercus pubescens* Willd., cortex EMA/HMPC/3206/2009. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en>

ЦЕЛЬ. Скрининговое изучение антимикробной активности водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.).

Задачи исследования

Проведение скринингового анализа антимикробной активности водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.);

Определение оптимальной концентрации спирта этилового для создания препаратов на основе растительного сырья дуба черешчатого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись водно-спиртовые извлечения листьев и почек дуба черешчатого на различных концентрациях спирта этилового марки ХЧ (40%, 70%, 80%, 96%) (Спирт 96%, ООО «Гиппократ», Россия, г. Самара, серия: 360917) в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50). Также были получены препарат настойка листьев дуба черешчатого и настойка почек дуба черешчатого на 70% спирте в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5), полученные методом дробной перколяции. Необходимые концентрации спирта были получены путем разведения спирта 96%, по таблице №5 приложения к ГФ РФ XIV издания [7]. Для большинства флавоноидсодержащих растений оптимальным экстрагентом является спирт 70%, поскольку данная концентрация спирта этилового позволяет максимально экстрагировать имеющуюся в растении сумму флавоноидов и обладает лучшей проникающей способностью в глубокие слои эпидермиса по сравнению с более высокими концентрациями [7, 18, 19].

Анализируемые образцы сырья

Листья *Quercus robur* L. были заготовлены в период с мая по июль 2020 г. (Самарская обл., Похвистневский р-н, с. Первомайск, 2020 г.). Почки *Quercus robur* L. заготавливались в период с марта по апрель 2020 г. (Самарская обл., Похвистневский р-н, с. Первомайск, 2020 г.).

Видовая специфичность, анализируемых объектов подтверждалась при помощи определителей средней полосы России [3, 4]. Кроме определителей использовался метод сравнения с достоверно известными образцами гербарного фонда Самарского университета. Инвентарный номер основного гербарного образца SMR-1547 (Herbarium Department for Ecology, Botany and Nature Protection Faculty of Biology, Samara University, 2021)³.

Тестовые культуры

В качестве тестовых культур были использованы штаммы Американской коллекции типовых культур (American Type Cultures Collection – ATCC):

Staphylococcus aureus (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), а также *Candida albicans* (клинический штамм).

Методы исследования

Определение МИК проводили методом двойных серийных разведений в бульоне (пробирочный, макрометод) в соответствии с методиками, описанными в МУК 4.2.1890-04 [27, 29]. Метод двойных серийных разведений по сравнению с диффузионными методами позволяет качественно оценить наличие антимикробного эффекта путем визуальной оценки в сравнении со стандартом и определения минимальной ингибирующей концентрации изучаемого образца, которая обеспечивает замедление роста исследуемых штаммов микроорганизмов [27, 29]. В качестве питательной среды использовался питательный бульон Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США) [29].

Методика

Тестирование исследуемых образцов проводилось в объеме 1 мл каждого разведения образца водно-спиртового извлечения.

Приготовление рабочего раствора

Для определения чувствительности питательный бульон разливался по 0,5 мл в каждую пробирку. Помимо количества пробирок, необходимых для разведения образца, одна пробирка использовалась для постановки «отрицательного» контроля. Рабочий раствор тестируемого образца готовили из основного раствора с использованием жидкой питательной среды (питательный бульон Мюллера-Хинтона). Концентрация рабочего раствора рассчитывали исходя из необходимой максимальной концентрации в ряду серийных разведений, с учетом фактора разбавления препарата при последующей инокуляции [27].

Рабочий раствор в количестве 0,5 мл при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносили в первую пробирку, содержащую 0,5 мл бульона. Затем тщательно перемешивали и новым стерильным наконечником переносят 0,5 мл раствора тестируемого образца в бульоне во вторую пробирку, содержащую первоначально 0,5 мл бульона. Процедуру повторяли до тех пор, пока не будет приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последней пробирки 0,5 мл бульона удаляли. Таким образом, получали ряд пробирок с растворами тестируемых образцов водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого, концентрации которых отличаются в соседних пробирках в 2 раза. Одновременно готовили дополнительные ряды серийных разведений образцов для тестирования контрольных штаммов [27].

Приготовление инокулюма

Для инокуляции использовали стандартную микробную взвесь, эквивалентную 0,5 по стандарту

³ Herbarium Department for Ecology, Botany and Nature Protection Faculty of Biology, Samara University. SMR-1547. Available online: <http://sweetgum.nybg.org/science/vh/collection-index/collection-index-details/?irn=124749>

МакФарланда, разведенную в 100 раз на питательном бульоне, после чего концентрация микроорганизма в ней составит примерно 10^6 КОЕ/мл. По 0,5 мл инокулюма вносили в каждую пробирку, содержащую по 0,5 мл соответствующего разведения тестируемого образца, и в одну пробирку с 0,5 мл питательного бульона без образца («отрицательный» контроль). Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке достигала необходимой концентрации около 5×10^5 КОЕ/мл. Инокулюм вносился в пробирки с разведениями образца не позднее 15–30 мин с момента его приготовления [27].

Пробирки закрывали стерильными ватно-марлевыми пробками и все пробирки с тестируемыми штаммами, кроме пробирки с «отрицательным» контролем, инкубировали при температуре 35°C в течение 20–24 ч. Пробирка с «отрицательным» контролем помещается в холодильник при 4°C, где хранится до учета результатов [27].

Оценка роста микроорганизмов

Для определения наличия роста микроорганизма пробирки с посевами просматриваются в проходящем свете. Рост культуры в присутствии тестируемого образца проводился при сравнении с пробиркой «отрицательного» контроля, содержащей исходный инокулюм и хранившейся в холодильнике. МИК определялось по наименьшей концентрации тестируемого образца, которая подавляет видимый рост микроорганизма [27].

Оценка результатов эксперимента

Оценка результатов проводилась визуально по наличию/отсутствию роста микроорганизмов в пробирках с соответствующими разведениями исследуемых образцов [27]. Минимальной ингибирующей концентрацией являлась самая низкая концентрация изучаемого образца, которая полностью подавляла рост штамма микроорганизмов. При этом, согласно требованиям Методических указаний (МУК 4.2.1890-04)⁴ по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, а также рекомендациям Стандарта производительности для тестов на чувствительность к антимикробным препаратам (CLSI)⁵, наличие мутности, и обнаружение незначительного количества микроорганизмов (одна колония) не учитывались при регистрации результата эксперимента. Количество повторений каждого эксперимента было равным трем [27, 29].

⁴ Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические рекомендации. МУК 4.2.1890-04. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2004;6(4):306-359. Методические указания утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации – Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г.Г. Онищенко, 4 марта 2004 г.

⁵ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th ed. CLSI standard M02. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В ходе проведения скрининга антимикробной активности извлечений листьев и почек дуба черешчатого были получены следующие результаты.

При тестировании 40% водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого наблюдалась антимикробная активность в отношении штамма *P. aeruginosa* при четырехкратном разведении, а также в отношении микроорганизмов *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при восьмикратном разведении (табл. 1). При сравнении 40% водно-спиртового извлечения с «отрицательным» стандартом (минимальной подавляющей концентрацией для 40% водного спирта) отличий антимикробной активности между исследуемым образцом и образцом сравнения не наблюдалось (табл. 2). Что говорит об отсутствии вклада имеющегося в экстракте комплекса биологически активных соединений в фармакологический эффект при данной концентрации извлечения.

Для 70% водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого антимикробная активность была выраженной в отношении *P. aeruginosa* в восьмикратном разведении; в отношении *S. aureus* при разведении в 32 раза; для штамма *C. albicans* – при восьмикратном разведении. Подавление роста штамма *E. coli* наблюдалось при двукратном разведении (табл. 1).

Антимикробная активность 80% водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого была выраженной в отношении *E. coli* при разведении в 64 раза; в отношении *S. aureus*, *C. albicans* и *P. aeruginosa* при разведении в 16 раз (табл. 1). Для водно-спиртового извлечения листьев на 80% спирте наблюдается максимальная задержка роста микроорганизмов. При сравнении с «отрицательным» стандартом спирта этилового в концентрации 80% наблюдается значительное подавление роста микроорганизмов (табл. 1; табл. 2).

Антимикробная активность 96% водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого была выраженной в отношении всех штаммов при восьмикратном разведении; в отношении *S. aureus*, *C. albicans* и *E. coli* при разведении в 16 раз; в отношении *E. coli* наблюдалась наибольшая активность при 32 разовом разведении (табл. 1). Показатели «отрицательного» контроля для 96% концентрации спирта этилового были значительно меньше по сравнению с исследуемым образцом (табл. 2).

Анализ 40% водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого дает меньший антимикробный эффект в сравнении с 40% водно-спиртовым извлечением листьев дуба черешчатого (табл. 1; табл. 2). В частности, извлечение почек в данной концентрации спирта этилового является выраженной в отношении штаммов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при восьмикратном разведении; наряду с прочими штаммами при 32-кратном разведении наблюдалась более выраженная активность в отношении штамма *C. albicans* (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты тестирования извлечений
листьев и почек дуба черешчатого (*Q. robur L.*)

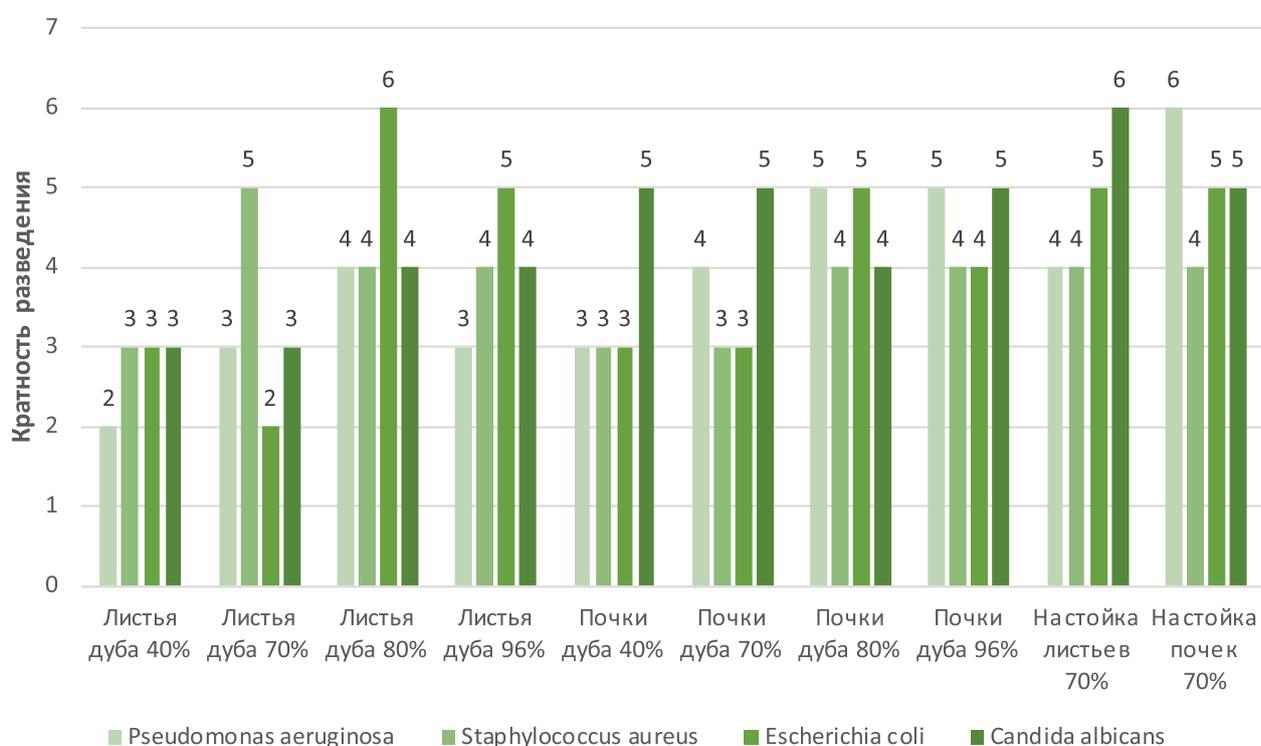
Объект/ Микроорганизм	Кратность разведения*						
	1 1:2	2 1:4	3 1:8	4 1:16	5 1:32	6 1:64	7 1:128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
Листья дуба 40%	–	–	+	+	+	+	+
Листья дуба 70%	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 80%	–	–	–	–	+	+	+
Листья дуба 96%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 70%	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 80%	–	–	–	–	–	+	+
Почки дуба 96%	–	–	–	–	–	+	+
Настойка листьев 70%	–	–	–	–	+	+	+
Настойка почек 70%	–	–	–	–	–	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>							
Листья дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 70%	–	–	–	–	–	+	+
Листья дуба 80%	–	–	–	–	+	+	+
Листья дуба 96%	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 70%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 80%	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 96%	–	–	–	–	+	+	+
Настойка листьев 70%	–	–	–	–	+	+	+
Настойка почек 70%	–	–	–	–	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>							
Листья дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 70%	–	–	+	+	+	+	+
Листья дуба 80%	–	–	–	–	–	–	+
Листья дуба 96%	–	–	–	–	–	+	+
Почки дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 70%	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 80%	–	–	–	–	–	+	+
Почки дуба 96%	–	–	–	–	+	+	+
Настойка листьев 70%	–	–	–	–	–	+	+
Настойка почек 70%	–	–	–	–	–	+	+
<i>Candida albicans</i>							
Листья дуба 40%	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 70%	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 80%	–	–	–	–	+	+	+
Листья дуба 96%	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 40%	–	–	–	–	–	+	+
Почки дуба 70%	–	–	–	–	–	+	+
Почки дуба 80%	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 96%	–	–	–	–	–	+	+
Настойка листьев 70%	–	–	–	–	–	–	+
Настойка почек 70%	–	–	–	–	–	+	+

Примечание: + наличие роста микроорганизма; – отсутствие роста микроорганизма

Таблица 2 – Минимальные подавляющие концентрации спирта этилового («отрицательный» контроль)

Объект/ Микроорганизм	Кратность разведения*						
	1 1:2	2 1:4	3 1:8	4 1:16	5 1:32	6 1:64	7 1:128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
Этиловый спирт 40%	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 70%	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 80%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 96%	–	–	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>							
Этиловый спирт 40%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 70%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 80%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 96%	–	–	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>							
Этиловый спирт 40%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 70%	–	–	–	–	+	+	+
Этиловый спирт 80%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 96%	–	–	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>							
Этиловый спирт 40%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 70%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 80%	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 96%	–	–	–	+	+	+	+

Примечание: + наличие роста микроорганизма; – отсутствие роста микроорганизма.

Рисунок 1 – Сравнительная диаграмма антибактериальной активности спиртовых извлечений листьев и почек *Q. robur* L. (по оси абсцисс – порядковый номер разведения)

В ходе тестирования 70% водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого отмечалась выраженная антимикробная активность в отношении штаммов микроорганизмов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при восьмикратном разведении. В отношении штаммов *P. aeruginosa* антимикробная активность наблюдалась при 16-кратном разведении. Максимально выраженный антимикробный эффект был зафиксирован в отношении штамма *C. albicans* при 32 кратном разведении (табл. 1).

Антимикробная активность 80% водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого отмечалась в отношении штамма *E. coli* при разведении в 32 раза, а также в отношении штамма *S. aureus*, *C. albicans* и *P. aeruginosa* при разведении в 16 и 32 раз соответственно (табл. 1). При сравнении с «отрицательным» стандартом спирта этилового в концентрации 80% наблюдается значительное подавление роста микроорганизмов (табл. 1; табл. 2).

Исследование антимикробной активности 96% водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого дало следующие результаты: заметно выраженная антимикробная активность в отношении всех штаммов при 16 кратном разведении; в отношении *P. aeruginosa* и *C. albicans* также наблюдалась активность при 32 кратном разведении (табл. 1).

В процессе проведения скринингового анализа водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого были определены условия получения лекарственной формы настойки. В качестве экстрагента для изготовления настойки на листьях дуба черешчатого и настойки на почках дуба черешчатого был выбран 70% спирт этиловый, поскольку данная концентрация является оптимальными экстрагентом для сырья, содержащего комплекс биологически активных веществ группы флавоноидов, обеспечивающих антимикробный эффект препарата⁶ [15, 20].

Тестируемый препарат настойка листьев дуба черешчатого на 70% спирте этиловом показал следующие результаты. Антимикробный эффект наблюдался в отношении всех указанных штаммов. В частности, при шестнадцатикратном разведении наблюдается антимикробная активность в отношении штамма *P. aeruginosa* и штамма *S. aureus*; при разведении в 32 раза – в отношении *E. coli* и при разведении в 64 раза – в отношении *C. albicans* (табл. 1).

В ходе тестирования препарата настойки почек дуба черешчатого на 70% спирте этиловом получены следующие результаты: антимикробный эффект наблюдался штамма *P. aeruginosa* при разведении в 64 раза; при шестнадцатикратном разведении наблюдается антимикробная активность в отношении штамма *S. aureus*; при разведении в 32 раза – в отношении *E. coli* и *C. albicans* (табл. 1).

Таким образом, проведено скрининговое исследование по изучению антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и листьев и почек дуба черешчатого, в результате чего в условиях *in vitro* обнаружено антимикробное действие на ряд патогенных штаммов микроорганизмов: *P. aeruginosa*; *S. aureus*; *E. coli*; *C. albicans*.

По результатам выполненной работы было установлено, что все изучаемые образцы водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого дают стабильный антимикробный эффект в отношении штаммов *S. aureus* и *C. albicans*.

Водно-спиртовое 80% извлечение из листьев и почек дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) и препараты настойка листьев и почек дуба черешчатого на 70% спирте этиловом в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5) являются наиболее эффективными объектами и дают максимальную задержку роста микроорганизмов при разведении в 32 и 64 раза.

Узконаправленное действие с максимальным антимикробным эффектом на *C. albicans* оказывает препарат настойка листьев дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5); на штаммы *S. aureus* – 70% водно-спиртовое извлечение в соотношении в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) (рис. 1). Водно-спиртовые извлечения почек дуба оказывают сходный стабильный максимальный антимикробный эффект в отношении *C. albicans*; для штаммов *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli* отмечается максимальный антимикробный эффект при концентрации экстрагента – 96% спирта этилового. Минимальная антимикробная активность отмечается для 70% водно-спиртового извлечения из листьев дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) на штаммы *E. coli*, а также для 40% водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) на штаммы *P. aeruginosa* (рис. 1).

Выбор в пользу 70% концентрации спирта как экстрагента для получения настойки листьев и почек дуба сделан исходя из того, что для лекарственных форм при данных параметрах экстракции отмечается наибольший антимикробный эффект в отношении изучаемых штаммов микроорганизмов (рис. 1). Также, извлечения при данной концентрации спирта обладают лучшей проникающей способностью в глубокие слои эпидермиса по сравнению с более высокими и с более низкими концентрациями спирта⁷. Следует отметить, что листья имеют большую фито-массу в сравнении с почками, их сбор может осуществляться в больший временной промежуток, чем для почек, время сбора которых, как правило, выпадает на зимне-весенний период [7].

⁶ Государственный реестр лекарственных средств. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_6283.htm

⁷ Государственный реестр лекарственных средств. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_6283.htm

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все полученные в ходе исследования результаты могут служить основанием для создания новых антибактериальных препаратов на основе листьев и

почек дуба черешчатого, а также для внедрения препаратов настойки листьев и почек дуба черешчатого на 70% спирте в медицинскую и фармацевтическую практику.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают особую благодарность Корчикову Евгению Сергеевичу, доценту кафедры экологии, ботаники и охраны природы Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева за содействие в написании статьи и предоставление гербарных образцов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.А. Рябов – сбор данных, проведение эксперимента, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка черновика рукописи, анализ литературы, написание рукописи и окончательное утверждение ее для публикации; В.М. Рыжов – планирование исследования, участие в разработке концепции и дизайна исследования, сбор растительного материала для анализа; В.А. Куркин – окончательное утверждение для публикации рукописи, обработка полученных результатов, проверка критически важного интеллектуального содержания; С.Д. Колпакова – участие в проведении исследования, анализ литературы; А.В. Жестков – участие в описании и анализе полученных результатов, участие в написании рукописи и окончательном утверждении ее для публикации; А.В. Лямин – участие в написании рукописи, критический анализ исследования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Dasgupta A., Krasowski M.D. Chapter 10 – Therapeutic drug monitoring of antimicrobial, antifungal and antiviral agents, Therapeutic Drug Monitoring Data (Fourth Edition), Academic Press. – 2020. – P. 159–197. DOI: 10.1016/B978-0-12-815849-4.00010-4.
2. Andrade H.B., Shinotsuka C.R., da Silva I.R.F., Donini C.S., Yeh Li H., de Carvalho F.B., Americano do Brasil P.E.A., Bozza F.A., Miguel Japiassu A. Highly active antiretroviral therapy for critically ill HIV patients: A systematic review and meta-analysis // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, No.10. – e0186968. DOI: 10.1371/journal.pone.0186968.
3. Grozdova N.B., Nekrasov V.I., Globa-Mikhailenko D.A. Trees, shrubs and vines. M.: Lesn. industry, 1986. – P. 176–178.
4. Maevsky P.F. Flora of the middle zone of the European part of Russia. 11th ed. M.: Partnership of scientific publications KMK, 2014. P. 200–201.
5. British Pharmacopoeia 2009. British Pharmacopoeia Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations. Oak Bark. 2009; Vol. III. 7203 p.
6. European Pharmacopoeia – 8th Edition. «01/2008:1887 corrected 6.0». 2013. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://pharmeuropa.edqm.eu>
7. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>
8. Fatehi S., Mohammadi Sichani M., Tavakoli M. Evaluation of antimicrobial and Anti-quorum sensing activity of mazouj and ghalghaf galls extracts of oak against *Pseudomonas aeruginosa* // Qom Univ Med Sci J. – 2018. – Vol. 12, No.10. – P. 36–45. DOI: 10.29252/qums.12.10.36.
9. Pailhoriès H., Munir M.T., Aviat F., Federighi M., Belloncle C., Eveillard M. Oak in Hospitals, the Worst Enemy of *Staphylococcus aureus*? // Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2017. – Vol. 38, No.3. – P. 382–384. DOI: 10.1017/ice.2016.304.
10. Smailagić A., Ristivojević P., Dimkić I., Pavlović T., Dabić Zagorac D., Veljović S., Fotirić Akšić M., Meland M., Natić M. Radical Scavenging and Antimicrobial Properties of Polyphenol Rich Waste Wood Extracts // Foods. – 2020. – Vol. 9, No.3. – P. 319. DOI: 10.3390/foods9030319.
11. Sarwar R, Farooq U, Naz S, Riaz N, Majid Bukhari S, Rauf A, Mabkhot Ya.N., Al-Showiman S.S. Isolation and Characterization of Two New Antimicrobial Acids from *Quercus incana* (Bluejack Oak) // Biomed Res Int. – 2018. – Vol. 2018. – 3798105. DOI: 10.1155/2018/3798105.
12. Smailagić A., Zagorac D.D., Veljović S., Sredojević M., Relić D., Fotirić M. A., Roglić G., Natić M. Release of wood extractable elements in experimental spirit model: Health risk assessment of the wood species generated in Balkan cooperation // Food Chemistry. – 2021. – Vol. 338. – 127804. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127804.
13. Elansary O. H., Szopa A., Kubica P., Ekiert H., Mattar A. M., Al-Yafrasi M.A., El-Ansary D.O., Zin El-Abedin T.K., Yessoufou K. Polyphenol Profile and Pharmaceutical Potential of *Quercus* spp // Bark Extracts. Plants. – 2019. – Vol. 8, No.11. – 486. DOI: 10.3390/plants8110486
14. Rao N. In vitro phytochemical screening, antioxidant & antimicrobial activity of the methanolic extract of *Quercus infectoria* L. – 2013. – Vol. 5. – P. 273–277.
15. Drózdź P., Pyrzyńska K. Assessment of polyphenol content and antioxidant activity of oak bark extracts // European Journal of Wood and Wood Products. – 2017. – Vol. 76. – P. 793–795. DOI: 10.1007/s00107-017-1280-x.
16. Sánchez-Burgosa J.A., Ramírez-Maresb M.V., Larrosac M.M., Gallegos-Infantea J.A., González-Laredoa R.F.,

- Medina-Torres L., Rocha-Guzmána N.E. Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Industrial Crops and Products*. – 2013. – Vol. 42. – P. 57–62. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.05.017
17. Буданцев А.Л. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 2: Actinidiaceae-Malvaceae, Euphorbiaceae-Haloragaceae. / А.Л. Буданцев. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – 774 с.
 18. Grotewold E. *The Science of Flavonoids*. 8th ed. New York: Springer. 2006. 274 p. DOI: 10.1007/978-0-387-28822-2.
 19. Bedi M.K., Shenefelt P.D. Herbal Therapy in Dermatology // *Archives of Dermatology*. – 2002. – Vol. 138, No.2. – P. 237–238. DOI: 10.1001/archderm.138.2.232.
 20. Cushnie T.P., Lamb A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2011. – Vol. 38. – P. 99–107. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014.
 21. Scalbert A., Haslam E. Polyphenols and chemical defence of the leaves of *Quercus robur* // *Phytochemistry*. – 1987. – Vol. 26. – P. 3191–3195. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)82468-1.
 22. Benyagoub E., Nabbou N., Dine A. Antimicrobial Effect of *Quercus robur* L. Leaves Selective Extracts from the Mezi Mountain of Djenane Bourezg (West of Algeria) // *Current Bioactive Compounds*. – 2020. – Vol.16, No.8. – P. 1181–1190. DOI: 10.2174/1573407216666191226141609.
 23. Benyagoub E., Nabbou N., Boukhalkhel S., Dehini I. The In vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Quercus robur* L. Methanolic and Aqueous Leaves' Extracts, from the Algerian High Plateaus Against some Uropathogenic Microbial Strains // *Phytopathology*. – 2019. – Vol. 12. DOI: 10.29252/qums.12.10.36.
 24. Sánchez-Burgosa J.A., Ramírez-Maresb M.V., Larrosac M.M., Gallegos-Infantea J.A., González-Laredoa R.F., Medina-Torres L., Rocha-Guzmána N.E. Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Industrial Crops and Products*. – 2013. – Vol. 42. – P. 57–62. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.05.017
 25. Nassima B, Behidj-Benyounes N, Ksouri R. Antimicrobial and antibiofilm activities of phenolic compounds extracted from *Populus nigra* and *Populus alba* buds (Algeria) // *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2019. – Vol. 55. – e18114. DOI: 10.1590/s2175-97902019000218114
 26. Isidorov V.A., Bagan R., Szczepaniak L., Swiecicka I. Chemical profile and antimicrobial activity of extractable compounds of *Betula litwinowii* (Betulaceae) buds // *Open Chemistry*. – 2015. – Vol. 13, No.1. – P. 123–127. DOI: 10.1515/chem-2015-0019
 27. The definition of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Guidelines. MUK 4.2.1890-04. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. – 2004. – Vol. 6, No.4. – P. 306–359.
 28. Козлова И.В., Лекарева Л.И., Быкова А.П. Кандидоз желудочно-кишечного тракта // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2016. – Т. 3. – С. 40–46.
 29. Golus J., Sawicki R., Widelski J., Ginalska G. The agar microdilution method – a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts // *J Appl Microbiol*. – 2016. – Vol. 121. – P. 1291–1299. DOI: 10.1111/jam.13253

АВТОРЫ

Рябов Николай Анатольевич – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1332-953X. E-mail: ryabov.nikolay.2014@mail.ru

Рыжов Виталий Михайлович – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-8399-9328. E-mail: lavr_rvm@mail.ru

Куркин Владимир Александрович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7513-9352. E-mail: kurkinvladimir@yandex.ru

Колпакова Светлана Дмитриевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-9358-4436. E-mail: Sdkolpakova@mail.ru

Жестков Александр Викторович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-3960-830X. E-mail: avzhestkov2015@yandex.ru

Лямин Артем Викторович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-5905-1895. E-mail: avlyamin@rambler.ru