

Генералов И. И.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

Коротина О. Л.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

Моисеева А. М.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

Генералова А. Г.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

Юпатов Ю. Г.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ РЕСВЕРАТРОЛА И РЕСВЕРАТРОЛ-СОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ МЕСТНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Фитоалексин ресвератрол (*trans*-3,4',-5-тригидроксистильбен) относится к группе растительных полифенолов. Среди многочисленных позитивных эффектов ресвератрола — нормализация клеточного обмена и усиление транспорта кислорода, регуляция жирового обмена в печени, укрепление сосудистой стенки и снижение ее проницаемости, улучшение реологических показателей крови, противоаллергическое, радиопротекторное, противовоспалительное, противораковое и сосудорасширяющее действие [1].

Также в литературе имеются указания на антибактериальную, противовирусную и антимикотическую активность ресвератрола. Согласно данным М. М. Chan et al., ресвератрол был способен ингибировать рост *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, а также пяти штаммов грибков-дерматофитов. В концентрации 15 мг/мл ресвератрол (W. B. Wang et al., 2006) прекращал ползучий рост *Proteus mirabilis*, снижая его вирулентность действием на белок-транс-миттер сигнальной системы бактерий. Также он ингибировал рост 16 штаммов *Helicobacter pylori* в условиях *in vitro* (G. B. Mahady et al., 2003), в том числе штамм, несущий цитотоксин-ассоциированный ген (CagA+). Ресвератрол оказался синергистом по отношению к аналогам нуклеозидов при ингибировании вируса иммунодефицита человека (все цит. по [2]).

Все описанные исследования свидетельствуют о потенциальном терапевтическом эффекте ресвератрола при широком спектре самых разных заболеваний. В настоящее время выполняется более 60 клинических испытаний химических препаратов и/или растительных извлечений-биодобавок, содержащих ресвератрол, в ведущих институтах и клиниках мира (цит. по источнику US National Institute of Health; www.clinicaltrials.gov).

Основные растительные источники, содержащие ресвератрол в повышенной концентрации, в настоящее время хорошо известны. В 1963 г. ресвератрол был получен из корней горца гребенчатого (*Polygonum cuspidatum*). Это растение, широко применяемое в традиционной японской и китайской медицине, на сегодняшний день является самым богатым источником ресвератрола. Также в повышенной концентрации ресвератрол содержится в кожуре и косточках красного винограда и красном виноградном вине. В невысоких концентрациях он выявляется в ягодах, содержащих растительные пигменты и комплекс антиоксидантов (шелковица, черника, голубика, клюква, земляника и т. д.), орехах, хвойных растениях, листе эвкалипта и др. [2].

Несмотря на потенциально высокую терапевтическую ценность ресвератрола, до сих пор не изучалось его содержание в растениях и нутриентах, доступных в Республике Беларусь, а также в выделенных из них фракциях и компонентах. Исходя из этого, необходимой является разработка собственных методов получения растительных извлечений с повышенной концентрацией ресвератрола. С учетом имеющихся данных, интерес представляет также исследование антимикробной активности ресвератрол-содержащих материалов в отношении бактериальной микрофлоры и грибковых патогенов.

Таким образом, **целью** настоящей работы явилось определение содержания ресвератрола в местных растительных источниках, разработка методов получения растительных извлечений, обогащенных по ресвератролу, оценка антимикробной активности ресвератрола и ресвератрол-содержащих экстрактов.

Материалы и методы. В качестве стандарта для экспериментов использовали субстанцию транс-ресвератрола производства Sigma, США. Качественный и количественный анализ ресвератрола проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Agilent с использованием колонок Zorbax StableBond 5 мкм 250 × 4,6 мм с диодно-матричным детектированием. Концентрацию ресвератрола в спиртовых и водных растворах определяли спектрофотометрией на 307 нм (максимум поглощения ресвератрола).

Для оценки антимикробной активности помимо ресвератрол-содержащих извлечений использовали препарат «Кардивитол» производства ГП «Академфарм», Республика Беларусь. По данным ВЭЖХ, препарат содержит ресвератрол > 95 % чистоты.

В качестве сырья для экстракции ресвератрола использован ряд растительных биоматериалов. К ним относились: 1) разные сорта красного винограда, выращенного в Республике Беларусь и Республике Молдова (свежие ягоды, высушенная измельченная кожура, измельченные высушенные косточки), виноградные соки, красные виноградные вина, полученные из разных сортов винограда; 2) различные виды дикорастущих и культивируемых ягод, собранных в Республике Беларусь (черника, ежевика, клюква, желтый и красный крыжовник, черная и красная смородина, шелковица, земляника, облепиха и др.); 3) другое пищевое сырье — ревеня, фасоль, горох, лук репчатый красный, соевые бобы (производство Российской Федерации); 4) лекарственное растительное сырье — высушенная и измельченная трава и корни некоторых видов семейства *Polygonaceae*

рода *Polygonum* — горца перечного, горца почечуйного, горца змеинового, горца татарского, горца птичьего.

Были изучены различные варианты предварительной экстракции ресвератрола из образцов измельченного и высушенного сырья. После проведенных экспериментов было выявлено, что оптимальным способом является использование 70 % водного раствора этанола в течение 1 ч при $t = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Дальнейшее фракционирование первичных этанольных экстрактов проводили, используя микроколоночный вариант обращенно-фазовой хроматографии на агарозной С8-матрице (октил-агароза пр-ва «Sigma», США) или силикагелевой матрице Диасорб С8 и С16 («Биохиммак», Москва).

Антимикробную активность ресвератрола и содержащих его извлечений оценивали, используя стандартные штаммы *S. Aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 8739, *B. subtilis subsp. spizizenii* ATCC 6633, *P. vulgaris*, *C. Albicans* ATCC 10231.

Анализ проводили микрометодом серийных разведений в жидкой питательной среде согласно методическим указаниям «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [3].

Реакцию выполняли в стерильных полистироловых планшетах. Для культивирования бактерий использовали среду Мюллер–Хинтон. Для выращивания кандид применяли среду Сабуро. Перед добавлением микроорганизмов проводили титрование экстрактов и извлечений на физиологическом растворе в объеме 0,05 мл.

Для увеличения биодоступности ресвератрола при титровании в физиологический раствор добавляли его солиubilизаторы — этанол или диметилсульфоксид (ДМСО). Для нивелирования их антимикробного действия проводили предварительный подбор концентраций этанола и ДМСО, не влияющих на рост микроорганизмов в контролях. Конечная концентрация солиubilизаторов в реакции составила 5 % (этанол) или 10 % (ДМСО).

В контроль вместо извлечений вносили тест-штаммы на жидкой питательной среде и физиологический раствор с аналогичным количеством растворителей. После внесения микроорганизмов посева с бактериальными культурами инкубировали в термостате в течение 20 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, со взвесью кандид — при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20–48–72 ч.

Учет реакции проводили визуально по ингибированию роста микроорганизмов, сравнивая результаты с показателями контрольных проб или турбидиметрическим методом на фотометре Ф300 производства РУП «Витязь» (Республика Беларусь) с одноволновым измерением оптической плотности в лунках планшета при 620 нм.

Результаты и обсуждение.

Удалось установить, что ресвератрол содержится лишь в сравнительно небольшом количестве растительных источников, доступных в Республике Беларусь. Среди пищевого сырья к ним относится кожура ягод винограда красных сортов и, в меньшей степени, ягоды черники. Нами не был обнаружен ресвератрол в экстрактах из клюквы, малины, брусники, других ягод, соевых бобах, другом пищевом сырье, хотя на это указывают некоторые литературные источники. В исследованных

образцах винограда белорусского происхождения (промышленный сорт Альфа) содержание ресвератрола в целом невелико (~0,5 мкг/мл экстракта).

Учитывая вышеприведенные данные, нами был проведен дальнейший скрининг содержания ресвератрола в непищевом растительном сырье Республики Беларусь, включая лекарственное растительное сырье. Среди различных видов горцев, встречающихся на территории Республики Беларусь, к лекарственным растениям отнесены горец птичий и горец перечный. Однако в извлечениях из этих видов растений, равно как из горца почечуйного и змеиноного, ресвератрол не обнаруживался.

Повышенное содержание ресвератрола было выявлено в этанольных экстрактах из корня горца татарского. В отдельных образцах доля гликозилированного соединения составляла 10 % и более. Обычное содержание ресвератрола в спиртовых извлечениях из корня горца татарского находилось в пределах 2–5 %.

Дальнейшее обогащение экстрактов по ресвератролу при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ на октил-агарозе (С8-агарозе) привело к увеличению содержания ресвератрола в 10 раз по сравнению с исходным количеством. Меньший уровень обогащения достигался при использовании обращенно-фазовых матриц на основе силикагеля — Диасорба С16 и С8. В последнем случае наблюдалось увеличение концентрации соединения ~ в 3 раза.

Тем не менее, последний вариант хроматографии сохраняет свою значимость при больших объемах концентрирования сырья, так как С8-матрица силикагеля является жесткой и при этом хорошо регенерируется 96 % этанолом (в отличие от С16-силикагеля и мягкой матрицы октил-агарозы).

Разработанные методики позволили получить растительные извлечения, обогащенные по ресвератролу, и оценить их антимикробные свойства. Одновременно была проведена оценка этих свойств в экстракте отечественной биодобавки ресвератрола «Кардивитол».

Для определения минимальной подавляющей концентрации (или МПК) ресвератрола в отношении изучаемых тест-штаммов использовали этанольный экстракт из биодобавки «Кардивитол» в концентрации 400 мкг/мл. Для поддержания ресвератрола в солюбилизированном состоянии в реакцию вносили ДМСО до концентрации 10 %.

После инкубации для тест-штамма *B. subtilis* МПК ресвератрола составила 100 мкг/мл. Аналогичный уровень МПК был установлен и для культуры *C. albicans*. Для всех остальных тест-культур величина МПК превышала 100 мкг/мл.

При оценке антимикробного действия первичных этанольных экстрактов из различных видов растительного сырья, содержащих ресвератрол, отмечалось угнетение роста представителей группы грамотрицательных микроорганизмов, включая *P. aeruginosa* и *E. coli* (на 2 разведения в сравнении с антибактериальной активностью растворителя). Также наблюдалось снижение ростовой активности культуры *C. albicans*. Антимикробного действия в отношении *S. aureus* не наблюдалось.

Аналогичным образом выполняли оценку антимикробной активности хроматографических фракций, полученных из первичного этанольного экстракта. В частности, определяли активность исходного извлечения из горца татарского

и его хроматографической фракции после элюции 32 % этанолом. В условиях проведенного эксперимента даже при максимальных концентрациях полного ингибирования роста культур обнаружено не было. Как и в исходных экспериментах, ресвератрольные фракции подавляли рост культуры *C. albicans*, *P. aeruginosa* и частично *B. subtilis*.

Следует отметить, что сам исходный этанольный экстракт из горца татарского обладал более выраженной антимикробной активностью в отношении тест-штаммов в сравнении с его фракцией. Это может указывать на наличие в его составе других, пока еще не идентифицированных дополнительных компонентов с антимикробным действием.

Исходя из полученных нами данных, антимикробная активность ресвератрола является достаточно умеренной. Соединение может ингибировать рост некоторых видов микроорганизмов, среди них могут быть и клинически значимые, такие как *P. aeruginosa*, представители рода *Bacillus* и грибы *C. albicans*. Однако МПК для данных возбудителей была равной или превышала 100 мкг/мл. Следует отметить, что высокие МПК > 100 мкг/мл в целом характерны для многих лекарственных растений или их извлечений. Такие средства могут применяться для лечения инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами бактерий. В свою очередь, в дальнейших исследованиях ресвератрола представляет интерес оценка его потенциального противовирусного действия.

Выводы:

1. Повышенное содержание ресвератрола установлено в коже различных сортов красного винограда и корнях горца татарского, что делает данные виды растений перспективными в качестве сырья для последующего получения ресвератрола.

2. Определены оптимальные условия для хроматографического разделения ресвератрол-содержащих растительных фракций (обращенно-фазовая хроматография на С8- или С16-матрицах со ступенчатой элюцией этанолом).

3. Ресвератрол и ресвератрол-содержащие экстракты, полученные из растительных источников местного происхождения, способны ингибировать рост тест-штаммов некоторых грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *P. aeruginosa*), а также представителей рода *Bacillus* и грибов кандид.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yu, W. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease / W. Yu, Y. C. Fu, W. Wang // J. Cell. Biochem. 2012. Vol. 113, № 3. P. 752–759.
2. Фитоалексин ресвератрол : методы определения, механизмы действия, перспективы клинического применения / А. М. Моисеева [и др.] // Вестник фармации. 2012. № 1 (55). С. 63–73.
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам / Н. А. Семина [и др.] // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2004. Т. 6, № 4. С. 306–359.