

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Чувашский государственный университет
имени И. Н. Ульянова»

На правах рукописи



Солёнова Елена Александровна

ВЛИЯНИЕ ИЗОЛИКВИРИТИГЕНИНА НА ТЕЧЕНИЕ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

3.3.6. - фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель –
доктор медицинских наук,
доцент Павлова Светлана Ивановна

Чебоксары - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Генерализованная стафилококковая инфекция и современные подходы к ее терапии	11
1.2. Особенности врожденного и адаптивного иммунитета при стафилококковой инфекции.....	13
1.3. Полифенолы как основа для создания лекарств	16
1.3.1. Особенности структуры, свойства, кинетика полифенолов	16
1.3.2. Изоликвиритигенин как основа для разработки.....	19
лекарственных средств	19
1.3.3. Антимикробная активность полифенолов	20
1.3.4. Антимикробные эффекты изоликвиритигенина.....	28
1.3.5. Иммунотропные эффекты полифенолов	29
1.3.6. Иммунотропные эффекты изоликвиритигенина	33
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1. Поэтапная схема проведения эксперимента	35
2.2. Объекты и материалы исследования	36
2.2.1. Тестируемое вещество и его использование в экспериментах <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	36
2.2.2. Препараты сравнения и их использование в экспериментах <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	36
2.2.3. Характеристика бактериальных штаммов и условия их поддержания..	37
2.2.4. Экспериментальные животные.....	38
2.2.5. Выделение мононуклеаров селезенки и паховых лимфатических узлов мышей.....	39
2.2.6. Получение крови здоровых добровольцев	39
2.2.7. Получение флуорохром-меченого <i>S. aureus</i>	40
2.3. Модели и методы исследования	41
2.3.1. Определение антимикробной активности	41
2.3.2. Оценка динамики бактериального роста	41
2.3.3. Оценка формирования бактериальных биопленок	41
2.3.4. Оценка пролиферации митоген-активированных мононуклеарных клеток..	42

2.3.5. Оценка секреции цитокинов лимфоидными клетками	42
2.3.6. Оценка хемотаксиса фагоцитов	43
2.3.7. Оценка поглотительной активности фагоцитов	44
2.3.8. Оценка продукции активных форм кислорода фагоцитами	45
2.3.9. Модель стафилококковой инфекции у мышей	45
2.3.10. Метод секторных посевов крови.....	46
2.3.11. Оценка динамики количества мононуклеаров в селезенке и лимфатических узлах при генерализованной стафилококковой инфекции	48
2.4. Статистический анализ	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	49
3.1. Антибактериальные эффекты изоликвиритигенина и его комбинаций с антибиотиками в отношении <i>S. aureus</i> <i>in vitro</i>	49
3.1.1. Прямая антибактериальная активность изоликвиритигенина и его комбинаций с антибиотиками.....	49
3.1.2. Влияние изоликвиритигенина и его комбинаций с антибиотиками на формирование бактериальных биопленок <i>S. aureus</i>	53
3.2. Иммунотропные эффекты изоликвиритигенина <i>in vitro</i>	62
3.2.1. Влияние изоликвиритигенина на хемотаксис, поглотительную способность и продукцию активных форм кислорода фагоцитами	62
3.2.2. Влияние изоликвиритигенина на активированные спленоциты и секрецию ими цитокинов <i>in vitro</i>	68
3.3. Эффекты изоликвиритигенина в модели генерализованной стафилококковой инфекции.....	70
3.3.1. Влияние изоликвиритигенина на выживаемость мышей при генерализованной стафилококковой инфекции <i>in vivo</i>	70
3.3.2. Влияние изоликвиритигенина на секрецию цитокинов клетками лимфатических узлов и селезенки при генерализованной стафилококковой инфекции у мышей	75
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	100
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В современную эпоху развития технологий оказания помощи пациентам в критических состояниях, инвазивных вмешательств и эндопротезирования глобальной проблемой лечения инфекционно-воспалительных заболеваний человека является рост и распространение резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам. При этом нерациональное использование антибактериальных препаратов способствует селекции полирезистентной условно-патогенной флоры, являющейся впоследствии причиной нозокомиальных инфекций и ограничивающей эффективность санитарно-эпидемиологических мероприятий [11].

Согласно данным ВОЗ, метициллинрезистентный *Staphylococcus aureus* (*MRSA*), умеренно чувствительные/устойчивые к ванкомицину *Staphylococcus aureus* (*VISA/VRSA*), относятся к группе высокого уровня приоритетности [179]. В последние годы *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) занимает 5 место среди других возбудителей нозокомиальных инфекций стационаров Российской Федерации, при этом доля *MRSA* составляет около 30% [6]. С начала XXI в., благодаря своевременно принятым мерам по сдерживанию антибиотикорезистентности, наблюдалась устойчивая тенденция к снижению *MRSA* [58]. Но, несмотря на это, на сегодняшний день *S. aureus* остается одним из наиболее распространенных возбудителей генерализованных инфекций человека с высокой заболеваемостью и смертностью [61]. Помимо формирования резистентности к антибиотикам, *S. aureus*, обладая способностью противодействия врожденным и адаптивным механизмам иммунной защиты, вызывает у человека инфекции, имеющие тенденцию к генерализации с развитием неконтролируемого воспаления и впоследствии иммуноопосредованного повреждения организма.

На сегодняшний день ведутся поиски новых методов лечения стафилококковых инфекций. Однако темп развития резистентности и разнообразие ее механизмов к антибактериальным препаратам опережает время, необходимое для полного цикла их исследования и внедрения медицинскую практику [36, 136],

а эффективных вакцин от инфекций, вызванных *S. aureus*, на сегодняшний день не разработано [173]. Следовательно, необходим поиск новых подходов к лечению стафилококковых инфекций как с учетом особенностей патогенности и резистентности микроорганизма, так и ответа макроорганизма на них.

Одним из таких подходов является использование полифенолов. В нашей лаборатории ранее продемонстрировано, что сумма полифенолов корня солодки повышает выживаемость мышей линии Balb/C в модели генерализованной стафилококковой инфекции [7]. Однако наибольший интерес для современной фармакологии представляет изучение не суммы веществ, а отдельных субстанций. Таким образом, весьма актуальным представляется изучение антимикробных и иммунотропных эффектов изоликвидигенина (ИЛГ), основного полифенола корней солодки, в различных экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*.

Степень разработанности темы. В доступной литературе не встречаются работы, посвященные изучению эффективности и механизмов ИЛГ при генерализованной стафилококковой инфекции. Однако имеются публикации, описывающие наличие у различных полифенольных соединений растительного происхождения иммунотропных, антимикробных и противовоспалительных эффектов [20, 31, 52, 57, 131, 142]. Продемонстрировано, что некоторые полифенолы корней солодки повышают выживаемость лабораторных животных при генерализованной стафилококковой инфекции [7]. Кроме того, в различных моделях они увеличивают секрецию IL-17, который играет ключевую роль в защите от внеклеточных бактериальных и грибковых инфекций. В доступной литературе не встречаются работы, посвященные изучению эффективности и механизмов действия ИЛГ, основного полифенола корней солодки, при генерализованной стафилококковой инфекции.

Цель исследования – определить влияние изоликвидигенина на течение генерализованной стафилококковой инфекции у мышей.

Задачи:

- изучить антимикробную активность ИЛГ и его комбинаций с антибиотиками (оксациллином/ванкомицином) в отношении некоторых коллекционных штаммов и клинических изолятов *S. aureus*;
- определить влияние ИЛГ и его комбинаций с антибиотиками (оксациллином/ванкомицином) на формирование бактериальных биопленок штаммов *S. aureus*;
- оценить выживаемость мышей-самцов линии Balb/C при различных режимах введения ИЛГ и его комбинаций с оксациллином при генерализованной стафилококковой инфекции;
- изучить влияние ИЛГ на некоторые функциональные показатели клеток-эффекторов врожденного иммунитета;
- исследовать влияние ИЛГ на пролиферацию и секрецию цитокинов митоген-активированными Т-лимфоцитами *in vitro*;
- определить влияние ИЛГ на секрецию цитокинов-регуляторов Т-хелперного ответа первого (Th1) типа, семнадцатого (Th17) типа, а также IL-10 клетками региональных лимфоузлов и спленоцитов у мышей линии Balb/C на ранних сроках генерализованной стафилококковой инфекции.

Научная новизна. Впервые установлено, что ИЛГ ингибирует суспензионный рост *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, *S. aureus* 10 (МПК 128 мкг/мл) и *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 74, *S. aureus* 83, *S. aureus* 1, *S. aureus* 6, *S. aureus* 77 (МПК 64 мкг/мл). При этом ИЛГ в комбинации с оксациллином в концентрациях ниже МПК подавляет рост *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, а ИЛГ с ванкомицином - *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, *S. aureus* 6, *S. aureus* 10, *S. aureus* 77.

Показано, что ИЛГ ингибирует формирование бактериальной биопленки *S. aureus* ATCC 25923 (4-64 мкг/мл). При этом комбинация «ИЛГ + оксациллин» в концентрациях меньших, чем МПК, подавляет образование бактериальных биопленок *S. aureus* ATCC 25923 и *S. aureus* 1, а комбинация «ИЛГ + ванкомицин» - *S. aureus* 1.

Доказано, что предварительное внутрибрюшинное введение ИЛГ (10 мг/кг, трехкратно) повышает выживаемость мышей-самцов линии Balb/C при генерализованной стафилококковой инфекции, вызванной штаммом *S. aureus* ATCC 25923.

Выявлено, что ИЛГ (4-128 мкг/мл) не подавляет поглотительную активность нейтрофилов и моноцитов крови человека в отношении *S. aureus* ATCC 25923, но дозозависимо увеличивает продукцию АФК и интенсивность «кислородного взрыва» как ФМА (форбол-12-миристат-13-ацетат)-активированными, так и не активированными нейтрофилами и моноцитами крови человека *in vitro*, а также не оказывает влияния на пептон-индукционную миграцию фагоцитов в брюшную полость у мышей Balb/C.

Доказано, что ИЛГ подавляет пролиферацию КонА-активированных спленоцитов, а также секрецию цитокинов клетками мышей-самцов Balb/C *in vitro*.

Показано, что предварительное внутрибрюшинное введение ИЛГ (10 мг/кг, трехкратно) мышам-самцам линии Balb/C при генерализованной стафилококковой инфекции, вызванной *S. aureus* ATCC 25923, на 4 и 5 сутки ее развития сопровождается снижением продукции цитокинов группы Th-1 (IL-2, IFN γ) и Th-17 (IL-6, GM-CSF, IL-17A) КонА-активированными клетками регионарных лимфатических узлов и увеличением продукции цитокинов-регуляторов Th-1 ответа (IL-2, IL-12p70, IFN γ), и цитокинов, регулирующих Th-17 ответ (IL-22, IL-23, IL-17A, IL-17F, MIP-3 α / CCL20, IL-10) КонА-активированными спленоцитами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в результате исследования данные об антистафилококковых и имуномодулирующих эффектах ИЛГ и его комбинаций с антибиотиками расширяют представления о его фармакодинамике и являются предпосылкой для дальнейшего изучения antimикробных эффектов ИЛГ при инфекциях, вызванных другими грамположительными, а также грамотрицательными микроорганизмами.

Результаты работы внедрены в учебный процесс и используются в научно-исследовательской работе кафедры фармакологии, клинической фармакологии и биохимии медицинского факультета, а также кафедры органической и

фармацевтической химии химико-фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «ЧГУ им. И. Н. Ульянова».

Положения, выносимые на защиту:

1. ИЛГ обладает антимикробной активностью в отношении *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, *S. aureus* 74, *S. aureus* 83, *S. aureus* 1, *S. aureus* 6, *S. aureus* 10, *S. aureus* 77 (МПК=64-128 мкг/мл) и не снижает активность оксациллина и ванкомицина в отношении данных штаммов.

2. ИЛГ дозозависимо подавляет пролиферацию КонА-активированных спленоцитов и секрецию ими цитокинов *in vitro*, не ингибируя поглотительную активность и пептон-индуцированную миграцию нейтрофилов и моноцитов, но дозозависимо увеличивает продукцию АФК, а также интенсивность «кислородного взрыва» фагоцитов периферической крови человека.

3. ИЛГ, введенный до бактериального заражения, повышает выживаемость мышей при генерализованной стафилококковой инфекции, модулируя на ранних этапах ее развития продукцию цитокинов-регуляторов Th-1 ответа (IL-2, IFN γ , TNF α , IL-12p70), Th-17 ответа (GM-CSF, MIP3a/CCL20, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-17E/IL-25, IL-23), а также IL-10 клетками региональных лимфатических узлов и спленоцитами.

Степень достоверности и апробация результатов. При выполнении работы применялись современные лабораторное оборудование и методы исследования, в результате чего получен значительный объем экспериментальных данных. Их анализ проведен согласно общепринятым методам и критериям статистической обработки, что позволяет сделать вывод о достоверности полученных результатов.

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90085.

Результаты работы были доложены на XII, XIII, XIV, XV международных научных конгрессах «Рациональная фармакотерапия» (г. Санкт-Петербург); 88-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых (г. Казань); III Всероссийской научно-практической конференции с

международным участием молодых ученых, аспирантов и студентов «Актуальные проблемы медико-биологических дисциплин» (г. Саранск); 49-й и 52-й Всероссийских научных студенческих конференциях по техническим, гуманитарным и естественным наукам (г. Чебоксары); 54-й Международной научной студенческой конференции по техническим, гуманитарным и естественным наукам (г. Чебоксары); 92-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых в рамках V Всероссийского научного медицинского форума студентов и молодых ученых с международным участием «Белые цветы» (г. Казань); I, II, III, IV Всероссийских научно-практических конференциях «Безопасность фармакотерапии: *Noli nocere!*» (г. Казань); Международной научно-практической конференции «Современные проблемы химии, технологии и фармации» (г. Чебоксары), а также на заседаниях кафедры фармакологии, клинической фармакологии и биохимии ФГБОУ ВО «ЧГУ им. И. Н. Ульянова».

По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, из них – 3 в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста, иллюстрирована 19 рисунками, содержит 12 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных экспериментальных данных, заключения, выводов, списка литературы. Библиографический указатель включает 11 отечественных и 169 зарубежных источников литературы.

Благодарности. Автор выражает благодарность сотрудникам отдела молекулярной микробиологии и медицинской эпидемиологии под руководством профессора Сидоренко С.В. (ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России) за ценные советы и помощь в интерпретации результатов исследований, а также коллективу кафедры общей патологии под руководством профессора Бойчук С. В. (ФГБОУ ВО «Казанский

государственный медицинский университет» Минздрава России) за содействие в исследованиях по определению уровней цитокинов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Генерализованная стафилококковая инфекция и современные подходы к ее терапии

В настоящее время *S. aureus* является одним из наиболее распространенных возбудителей генерализованных инфекций человека, заболеваемость и смертность от которых остаются довольно высокими [61]. Проявлением генерализованной стафилококковой инфекции является бактериемия, которая указывает на наличие источника инфекции в кровяном русле или диссеминацию микробов из других очагов. На протяжении последних десятилетий частота развития бактериемии составляет в среднем 10-30 случаев на 100 000 населения [34, 162]. Большая доля ее приходится на пациентов с первичными и вторичными иммунодефицитами, лимфопролиферативными заболеваниями, получающих иммуносупрессивную терапию, а также имеющих обширные повреждения кожных покровов.

Современная терапия генерализованных инфекций, вызванных *S. aureus*, представляет собой многокомпонентную тактику борьбы, направленную не только на элиминацию возбудителя, но и на патогенетические механизмы развития септического процесса. Этиотропная терапия инфекций, ассоциированных с *MSSA* (метициллинчувствительный *Staphylococcus aureus*), предполагает применение полусинтетических антистафилококковых пенициллинов и цефалоспоринов, при *MRSA* – гликопептидов, оксазолидинонов, глицилциклинов, цефалоспоринов V поколения и липогликопептидов.

В условиях роста антибиотикорезистентности бактерий продолжаются поиски новых антибактериальных препаратов для лечения стафилококковых инфекций. Однако темпы развития резистентности, а также разнообразие ее механизмов у *S. aureus* опережают время, необходимое для полного цикла разработки антибактериального препарата, что требует иных подходов к этиотропной терапии [36].

В качестве альтернативы антибактериальных препаратов в литературе имеются предпосылки для применения лизинов – ферментов, полученных из бактериофагов и расщепляющих пептидогликан клеточной стенки *S. aureus*. Обладая рядом преимуществ перед терапией антибиотиками (интактность нормальной флоры макроорганизма, низкая вероятность развития устойчивости бактерий), в экспериментальных моделях сепсиса, пневмонии, менингита, эндокардита и других инфекций, вызванных *S. aureus*, лизины продемонстрировали высокую эффективность, обусловленную быстрым лизисом и массивной гибелью бактериальной популяции *S. aureus*, в том числе и в форме бактериальных биопленок, а также синергизм с антибактериальными препаратами.

Ключевое значение в регрессе синдрома полиорганной недостаточности и таких его составляющих, как шок, острая дыхательная недостаточность, почечная и печеночная дисфункция, развивающиеся в ходе течения генерализованной инфекции, вызванной *S. aureus*, принадлежит глюкокортикоидам (ГКС), применение которых легло в основу лечебной тактики многих современных руководств [2, 4, 8, 9]. Установлено, что раннее введение ГКС способствовало более высокой выживаемости при лечении тяжелого сепсиса в сравнении с антибактериальной терапией без применения данной группы [168, 153, 156].

Тенденция к генерализации инфекций, вызванных *S. aureus*, и высокая смертность требуют не только усовершенствованных подходов к терапии, но и к профилактике данных состояний. В литературе последних лет отмечен повышенный интерес к разработке вакцин от инфекций, вызванных *S. aureus*. Однако результаты III фазы клинических исследований не продемонстрировали адекватного иммунитета в ответ на такую вакцинацию [173], что в настоящее время не позволяет рассматривать ее как перспективный метод профилактики инфекций, вызванных *S. aureus*.

Таким образом, остается актуальным поиск новых эффективных подходов к лечению стафилококковых инфекций как с учетом особенностей патогенности и резистентности микроорганизма, так и ответа макроорганизма.

1.2 Особенности врожденного и адаптивного иммунитета при стафилококковой инфекции.

Немаловажным в создании новых подходов к лечению генерализованной стафилококковой инфекции является понимание иммунопатогенеза данного процесса на этапах реализации врожденного и адаптивного звеньев иммунитета.

При прохождении входных ворот инфекции (кожные покровы, слизистые оболочки) *S. aureus* взаимодействует с Toll-подобными рецепторами (TLR) 2 типа тучных клеток и макрофагов этих тканей. В ответ на стимул-индуцированное образование цитокинов, хемокинов и антимикробных пептидов происходит хемотаксис нейтрофилов, макрофагов и NK-клеток в очаг внедрения патогена с последующей миграцией дендритных клеток в лимфатические узлы для активации адаптивного иммунного ответа.

Среди множества компонентов врожденного иммунитета ключевая роль в ранней антистафилококковой защите и ее локализации принадлежит нейтрофилам [148, 101]. Их миграция в очаг инфекции индуцируется IL-17 [121], выработку которого Th-17-клеточной популяцией регулируют IL-1 β и IL-23 [39]. В свою очередь, пролиферация Th-17 запускается дендритными клетками при активации поверхностных TLR2, TLR 4, TLR 5 и Fc γ RIIA стафилококковых иммунных комплексов с IgG [77]. Пролиферация Th17 клеток подавляется IFN- α [76, 72, 33, 29, 170] и IL-27 [70]. С целью блокирования незавершенного фагоцитоза *S. aureus* IL-27 способствует образованию дендритных клеток из моноцитов, выработке этими клетками IFN- α и IFN- λ 1, а также IL-12, переключающего Т-клеточный ответ на Th1 [100, 78]. Таким образом, баланс между IFN- α и IL-17 является ключевым механизмом в регуляции иммунной защиты в отношении *S. aureus* и выраженности воспаления при развитии инфекции.

Активированные дендритные клетки, мигрируя в регионарные лимфатические узлы, запускают развитие адаптивного иммунного ответа, в котором ключевую защитную роль в отношении *S. aureus* играет субпопуляция эфекторных CD4+ Т-клеток - Th17 лимфоцитов, что подтверждено в ряде моделей

стафилококковой инфекции и врожденного IL-17A-иммунодефицита мышей [44, 88, 73].

Th17 секретируют цитокины (IL-17A, IL-17F и IL-22), которые, помимо улучшения барьерной функции эпителия и фагоцитарной активности нейтрофилов [89, 59, 167, 125], потенцируют формирование гуморальной защиты при вакцинации от *S. aureus* [172]. Таким образом, Th17 принимает участие в развитии как врожденного, так и адаптивного иммунитета при инфекциях *S. aureus*.

Установлено, что при развитии инфекции, вызванной *S. aureus*, зачастую не наблюдается развития адекватного иммунитета [152, 112]. Считается, что происходит это благодаря эволюционно выработанным механизмам уклонения *S. aureus* от гуморальной и клеточной иммунной защиты макроорганизма [164]. Установлено, что в основе многих из них лежит секреция молекул (белков) уклонения от иммунитета [43]. В мировой литературе описано более 40 белков уклонения *S. aureus* [69], многие из которых направлены на нейтрализацию активности нейтрофилов: препятствуют их экстравазации в место инфекции (стафилококковый суперантigenоподобный белок, белок внеклеточной адгезии, стафилококковый энтеротоксиноподобный пептид X), тормозят прайминг, хемотаксис и активацию нейтрофилов (стафилококковый суперантigenоподобный белок, формилпептидный рецептор), препятствуют опсонизации и фагоцитарному поглощению патогенов нейтрофилами путем блокирования активности компонентов системы комплемента, иммуноглобулинов и фагоцитоза (стафилококковый протеин A, молекула, связывающая антистафилококковые IgG, ингибитор стафилококкового комплемента, стафилокиназа, ауреолизин, стафилококковый суперантigenоподобный белок, внеклеточный фибриногенсвязывающий белок, внеклеточный комплемент-связывающий белок). Помимо молекул уклонения, большинство клинических изолятов *S. aureus* препятствуют этапу опсонизации с помощью капсульных полисахаридов 5 и 8 типов [123].

Примечательно, что развитие инфекции, вызванной *S. aureus*, характеризуется тенденцией к генерализации и развитию неконтролируемого

воспаления. В частности, благодаря нуклеазе и аденоzinсинтазе *S. aureus* разрушает нейтрофильные внеклеточные «ловушки», что способствует выходу бактерий за пределы очага инвазии [159]. Помимо тенденции к генерализации инфекции развитие неконтролируемого воспаления при сепсисе, вызванном *S. aureus*, несмотря на раннее введение антибактериальных препаратов, является одной из причин резистентности к проводимой терапии. Установлено, что с помощью токсинов (суперантителенов), способствующих блокированию основных комплексов гистосовместимости класса II и Т-клеточных рецепторов, *S. aureus* запускает массивную неспецифическую активацию Т-лимфоцитов, сопровождающейся «лавинообразной» секрецией провоспалительных цитокинов, что приводит к повреждению тканей, органов и развитию синдрома токсического шока, в большинстве случаев, с летальным исходом [66].

Таким образом, *S. aureus*, обладая разнообразными механизмами противодействия врожденным и адаптивным механизмам иммунной защиты человека, является возбудителем инфекции, имеющей тенденцию к генерализации с иммуноопосредованным повреждением тканей макроорганизма. Это позволяет полагать, что преодоление резистентности *S. aureus* и повышение эффективности химиотерапии возможно не только путем изыскания принципиально новых классов соединений, влияющих непосредственно на патогенные микроорганизмы и их социальные формы существования (бактериальные биопленки), но и с помощью средств, влияющих механизмы противоинфекционного иммунного ответа макроорганизма.

1.3. Полифенолы как основа для создания лекарств

1.3.1. Особенности структуры, свойства, кинетика полифенолов

Вторичные метаболиты растений – низкомолекулярные соединения, синтезируемые флорой для аутообеспечения процессов роста, размножения, защитных реакций от патогенов, а также и других процессов жизнедеятельности растений [18]. Среди вторичных метаболитов растений выделяются полифенольные соединения (флавоны, флавонолы, флаваноны, флаванонолы, изофлавоны, антоцианы, халконы и флаван-3-олы) с обширным спектром биологических эффектов, в том числе при введении в организм животных и человека [174]. Благодаря разнообразию биологических эффектов в настоящее время полифенолы растительного происхождения в научной литературе пристально изучаются и позиционируются как потенциальная основа для создания лекарственных средств для лечения онкологических, сердечно-сосудистых заболеваний, метаболического синдрома, ожирения и остеопороза.

Интересным является тот факт, что некоторые полифенолы участвуют в становлении симбиоза растений семейства бобовых с почвенными бактериями (*Rhizobiaceae*), обеспечивая формирование клубеньков на корнях бобовых растений для усвоения азота. Выступая в роли сигнальных молекул, полифенолы бобовых действуют как хемоаттрактанты для клубеньковых бактерий [5]. В условиях организма человека подтверждена способность полифенолов (даидзина, генистина) поддерживать существование комменсаллов – стимулировать рост и размножение лакто- и бифидобактерий кишечника [48]. В свою очередь, метаболизм полифенолов кишечной микробиотой способствует образованию более простых и усвояемых метаболитов [56].

Полифенольные соединения высших растений (флавоноиды) обладают широким спектром биологической активности, в том числе проявляя antimикробные и иммуномодулирующие эффекты. Так, например, парентеральное введение флавоноидов корня солодки повышало резистентность мышей к острой стафилококковой инфекции в таких дозах, которые значимо не влияли на функции

эффекторов врожденного иммунитета, но предотвращали активацию и пролиферативный ответ лимфоцитов [16].

Эти особенности полифенольных соединений растений, по-видимому, предрасполагают к тому, что в научной литературе последнего десятилетия накапливаются исследования как прямой антибактериальной активности, так и иммуномодулирующих эффектов полифенолов.

Фармакокинетика полифенолов. Фармакокинетика полифенолов зависит от химической структуры, молекулярной массы, степени гликозилирования молекулы. Результаты 7-дневной диеты, богатой кверцетином, кемпферолом, изорхамнетином, апигенином и лютеолином, подтверждают способность данных полифенолов всасываться как в неизменном виде (биодоступность варьирует от 0 до 60%), так и в виде метаболитов [169]. Так, галловая кислота и изофлавоны были наиболее усвоеными: при однократном пероральном приеме галловой кислоты значения C_{max} ее метаболитов достигали 4 мкмоль/л, а относительная экскреция с мочой составляла 38%. Далее за ними следуют катехины, flavanоны и кверцетин, наименее усваиваемые с исследованном ряду – это проантоксианидины, галлатированные катехины чая и антоцианы.

Большинство полифенолов, поступающих с пищей, в основном, в виде гликозидов, метаболизируются ферментами 2 фазы метаболизма как тонкой кишки, так и печени [133]. В желудочно-кишечном тракте гликозиды полифенолов превращаются в агликоны с участием ферментов бета-гликозидаз. Некоторые полифенолы способны трансформироваться в другие в процессе брожения с участием микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Так, анаэробные бактерии (*Eubacterium ramulus* и *Clostridium orbiscindens*) могут способствовать превращению апигенина в лютеолин в толстой кишке человека [74].

Преобразованные бактериями кишечника полифенолы отчасти выводятся с калом, другая часть подвергается в печени цитохромом P450 (СУР-450)-зависимому окислению. Кроме того, в печени агликоны частично подвергаются конъюгации с глюкуроновой кислотой, метилируются и сульфатируются.

Как и многие подвергающиеся метаболизму ксенобиотики, полифенолы не только метаболизируются системой СУР-450, но и изменяют активность ее изоферментов. Например, есть данные о том, что нарингин и нарингенин ингибируют изоферменты СҮР3А [82]. Полифенолы зверобоя (мирицетин, апигенин, кемпферол, кверцетин, аменофлавон, кверцитрин и рутин) ингибируют активность ферментов семейства СҮР1 (СҮР 1В1> СҮР1А1). Агликоны вогонин, хризин, тамариксетин, изоргаметин, кверцетин и кемпферол выраженно ингибируют активность СҮР2С [177]. Другие полифенолы также способны выступать ингибиторами микросомального окисления: ИЛГ ингибирует СҮР4А, формононетин – СҮР2D6, биоханин А умеренно ингибирует СҮР2С9 человека. Два последних полифенола дозозависимо ингибируют также активность СҮР1А2 кишечника человека и крысы [85].

Отмечена взаимосвязь между способностью изменять активность СУР-450 и структурой полифенольного соединения. Галлатированные катехины (катехин-3-О-галлат, эпигаллокатехин-3-О-галлат), в отличие от негаллатированных, ингибировали СҮР1А2, СҮР2С9, СҮР3А4 *in vitro*. Зависимое от химической структуры селективное ингибирование СҮР3А4 *in vitro* свойственно ликофлавону и ирилону. Также есть полифенолы (диосмин), не оказывающие влияния на активность семейства СУР-450 [82], тогда как агликон диосмина (диосметин) и гесперидин ингибируют СҮР2С9.

Взаимодействие «полифенол-СУР-450» способно влиять как на метаболизм эндогенных соединений, так и фармакокинетику лекарств. Ингибирование СҮР3А4 мирицетином и кущенолом подтверждено влиянием на метаболизм диазепама, СҮР3А4 и СҮР3А5 диосметином и лютеолином – ингибированием метаболизма мидазолама.

Период полувыведения полифенолов в среднем составляет 2-28 ч. Перорально принятый человеком диосмин в разовой дозе 493 мг снижает концентрацию в плазме крови наполовину через 1,1 ч [74]. Но у некоторых метabolитов полифенолов (4-*O*-метилгалловой кислоты) период полувыведения больше, чем у исходного соединения (галловой кислоты). В настоящее время

ведутся отечественные и зарубежные исследования по улучшению фармакокинетики полифенолов, в частности увеличения их биодоступности при пероральном приеме [14, 135].

1.3.2. Изоликвидигенин как основа для разработки лекарственных средств

ИЛГ (2,4,4'-тригидроксихалкон) относится к классу халконов и представляет собой кристаллическое вещество оранжевого цвета, растворимое в этаноле и диметилсульфоксида. Как и большинство флавоноидов, ИЛГ обладает низкой биодоступностью и коротким периодом полувыведения. Было показано, что при внутривенном введении ИЛГ (10-50 мг/кг) крысам период полувыведения ИЛГ располагался в диапазоне 4,6-4,9 ч, а биодоступность при пероральном введении (20-100 мг/кг) составляла около 30% [130]. При этом максимальное распределение ИЛГ было отмечено в печени, сердце и почках животных, а связь с белками плазмы составляла около 44%.

В печени крыс и человека ИЛГ метаболизируется в I (в том числе с помощью системы цитохрома Р-450 – изофермента СУР2С19) и в II фазы метаболизма (до моноглюкуронидов, сульфатных и глутатионовых конъюгатов) [28, 83].

Помимо низкой биодоступности ИЛГ и короткого периода полувыведения, отмечено, что глюкуронизация ИЛГ, повышающая гидрофильность метаболитов, также способна изменять фармакологическую активность ИЛГ *in vivo* [102, 87]. Однако, несмотря на недостатки фармакокинетических параметров ИЛГ как потенциального лекарства, в отношении него, как и других полифенолов, ведутся разработки технологий систем лекарственной доставки [53].

На сегодняшний день накоплено множество исследований, демонстрирующих различную биологическую активность ИЛГ и его производных (психотропную, нейтро- и кардиопротекторную, иммунотропную, противоопухолевую, antimикробную и другие), что позволяет рассматривать ИЛГ как перспективную основу для изыскания новых лекарственных средств [20, 57, 31,

142, 131, 52]. Наличие противоопухолевой [7], антимикробной [79], а также противовоспалительной и иммуномодулирующей [7, 16] активностей обуславливает актуальность его исследования в качестве агента при генерализованном инфекционно-воспалительном процессе.

1.3.3. Антимикробная активность полифенолов

Прямая антибактериальная активность полифенолов. Классическим методом эрадикации возбудителя является применение веществ, напрямую подавляющих жизнеспособность, рост и размножение микроорганизмов. Различные представители класса полифенолов демонстрируют весьма разнообразный спектр антибактериальной активности, включающий как возбудителей болезней растений, так и животных, и человека. Например, протокатехиновая кислота в концентрации 25 мкг/мл подавляет видимый рост возбудителя гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis MAFF 301494*). Пирогаллол (33 мкг/мл) останавливает рост и размножение патогенов рыб и амфибий (*Aeromonas hydrophila ATCC 7966*), головоногих моллюсков (*Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802*), а также и человеческих патогенов (*Vibrio vulnificus ATCC 27562* и *Klebsiella pneumoniae [K. pneumoniae] ATCC 13883*) в концентрации 25 мкг/мл.

Антибактериальная активность полифенолов, основываясь на величине минимальной подавляющей концентрации (МПК), варьирует от высокой до ее отсутствия. В литературе встречаются указания на широкий диапазон МПК полифенолов: от 0,2 мкг/мл до 3200 мкг/мл в отношении различных грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Анализ литературных данных показывает, что полифенолы проявляют антистафилококковую активность. Наиболее выраженной способностью подавлять жизнеспособность золотистого стафилококка обладал спиромастол С (МПК = 0,25 мкг/мл, *S. aureus ATCC 25923*). В то же время другие подобные соединения (наргенин, кверцетин, галангин, а также спиромастол А, В, С и I)

демонстрировали значения МПК ниже 10 мкг/мл, а пирогаллол - 25 мкг/мл (*S. aureus* ATCC 29213).

Заслуживает пристального внимания тот факт, что полифенолы подавляли рост не только коллекционных штаммов золотистого стафилококка, чувствительных к метициллину (оксациллину, *MSSA*), но и *MRSA*, в том числе и некоторых клинических изолятов. Установлено, что оксигаллат (*S. aureus* BB568 - *MRSA*, 16 мкг/мл), глабридин (*MRSA*, 3,12 - 25 мкг/мл) обладают умеренной антистафилококковой активностью в отношении таких штаммов. Однако следует заметить, что в отношении многих клинических изолятов *S. aureus* отмечается невысокая активность полифенолов. Ксантогумол (*MRSA*, 125 мкг/мл), 3,4,5-тригидроксибензойная кислота (*MRSA*, 600 мкг/мл), и метил-3,4,5-тригидроксибензоат (*MRSA*, 500 мкг/мл), подавляют рост диких штаммов в более высоких концентрациях [25]. Обсуждаются вопросы связи структуры с антимикробной активностью: повышение антистафилококковой активности метил-3,4,5-тригидроксибензоата объясняют присутствием метильной группы [25].

Описания механизмов антистафилококкового действия полифенолов к настоящему времени недостаточно. Известно, что кверцетин увеличивает проницаемость цитоплазматической мембрany *Staphylococcus epidermidis*, мишенью глабридина в отношении некоторых штаммов *S. aureus* может быть фермент топоизомераза IV.

Антибактериальная активность полифенолов также изучена по отношению к стрептококкам. Наиболее выраженное антимикробное действие обнаружено у силибинина в отношении возбудителей инфекций ротовой полости человека: *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) ATCC 27607, *Streptococcus ratti* KCTC 3294, *Streptococcus anginosus* ATCC 31412, *Streptococcus gordonii* ATCC 10558 (МПК = 0,025-0,2 мкг/мл) и эпигаллокатехина галлата (*S. mutans* UA159, МПК = 31,25 мкг/мл). В то же время активность полифенолов в отношении патогенных штаммов *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) невысока. Рост клинических изолятов *S. pyogenes* подавлялся флавоном (25 мкг/мл), наингенином, мирицетином (50

мкг/мл). Причем клинические изоляты *S. pyogenes* были более чувствительны к полифенолам.

Поиск antimикробных свойств полифенолов в отношении грамотрицательных микроорганизмов представлен разнообразием тестируемых патогенов. Кверцетин подавлял рост энтеробактерий, проявляя различную активность: *K. pneumonia* (МПК = 4 мкг/мл), *Escherichia coli* (*E. coli*) (МПК более 50 мкг/мл). МПК флоридзина, флоретина, наргенина, гесперитина в отношении *E. coli* была более 100 мкг/мл [60]. Обнаружена выраженная активность галангина в отношении *K. pneumoniae* (МПК = 0,5 мкг/мл) [155].

Рост *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), а также возбудителей инфекций желудочно-кишечного тракта (сальмонеллы, шигеллы, иерсинии) подавляют эпигаллокатехин (МПК = 25 мкг/мл), эпигаллокатехин-о-галлат, пуникалагин, таниновая кислота, геранин, галловой кислоты моногидрат, теарубигин, катехин, мурицитрин, рутин, теафлавин (МПК > 100 мкг/мл). В отношении *A. baumannii* исследована активность эпигаллокатехина-3-галлата, которая продемонстрировала МПК более 100 мкг/мл, что свидетельствует о низкой активности в отношении данного патогена [103].

МПК полифенолов по отношению к анаэробам свидетельствуют от умеренной/низкой антибактериальной активности. Эпигаллокатехин-о-галлат и таниновая кислота (МПК = 50 мкг/мл), пуникалагин, касталагин, геранин (МПК = 67 мкг/мл) моногидрат галловой кислоты (МПК = 83 мкг/мл) подавляли рост *Clostridium difficile*. Антианаэробная активность в отношении другого анаэроба (*Listeria monocytogenes*) выявлена у пирогаллола (МПК = 67 мкг/мл). Кверцетин умеренно подавлял рост *Lactobacillus spp.* (МПК = 50 мкг/мл), *Bacteroides galacturonicus*, а также *Ruminococcus gauvreauii*, колонизирующих кишечник человека (МПК = 20 мкг/мл). Нарингенин и гесперитин не оказывали antimикробного действия в отношении обоих последних видов анаэробов [46]. Однако следует подчеркнуть, что в полифенолы продемонстрировали способность не только подавлять бактериальный рост, но и стимулировать жизнеспособность некоторых бактерий микробиоты кишечника. Об этом свидетельствовало

увеличение скорости роста лакто- и бифидобактерий в присутствии даидзина, генистина и подавление роста бифидобактерий в присутствии экволова (16 мкг/мл) [48].

Практический интерес представляет активность определенных полифенолов в отношении микробактерий. Прекаторины А, В и С, люпинифолин, каханон подавляют рост *Mycobacterium tuberculosis* [*M. tuberculosis*] H37Rv в концентрациях более 31,25 мкг/мл. Также в отношении *M. tuberculosis* более выраженную, но невысокую активность имеют неваденсин и изотимусин (МПК = 200 мкг/мл) и аментофлавон (МПК более 500 мкг/мл) [119].

Противогрибковая активность полифенолов представлена в большинстве случаев изысканиями в отношении грибов рода *Candida*. Так, катехины и теафлавины (МПК = 6250 мкг/мл), диферулоилметан (МПК более 100 мкг/мл) не обладали антигрибковой активностью. Однако бромофенолы из красных морских водорослей проявили умеренную антрафунгальную активность (МПК = 12,5-25 мкг/мл). Есть немногочисленные исследования механизмов фунгицидного действия. Известно, что таксифолин, кверцетин, биоханин А, мирицетин, флоретин, фlorицин, генистеин и генистин увеличивают индуцированный нистатином трансмембранный ток кальцеина (флуоресцентный индикатор кальция) через нистатиновые каналы искусственного липидного бислоя. Вероятно, данные полифенолы способны не только разрушать клеточную стенку грибов, но и усиливать действие нистатина.

Изучено влияние полифенолов на выживаемость лабораторных животных в моделях липополисахарид-индуцированной системной воспалительной реакции, а также CLP-модели сепсиса (*cecal ligation and puncture*, перевязка и прокол слепой кишки) *in vivo*. Так эпигаллокатехин галлат, ориентин, персикирин, дайдзein, ресвератрол, байкалин, физетин повышают ее. При этом наблюдается тенденция к снижению активности провоспалительных цитокинов и локализации инфекционного процесса. Предварительное под кожное введение дайдзеина в течение семи дней (1 мг/кг) увеличивало выживаемость опытных мышей, уменьшая бактериальную нагрузку в брюшинной жидкости, крови и легких,

препятствовал повреждению легких и снижал проницаемость сосудов в CLP-модели сепсиса [42].

Взаимодействие полифенолов и антимикробных средств. Несмотря на простоту методики, скрининг абсолютно новых веществ с прямой антимикробной активностью весьма долговременный процесс. Еще одним методом в преодолении антибиотикорезистентности является поиск субстанций, проявляющих синергизм в комбинации с широко использующимися антбактериальными препаратами.

Большое количество исследований синергизма полифенолов с антибиотиками проведено в отношении золотистого стафилококка, в том числе *MRSA* штаммов. Наибольшее внимание ученых обращено к поиску синергизма между полифенолами и β -лактамами. Так, синергизм выявлен у байкалеина и амоксициллина/пенициллина G, силибинина и ампициллина/оксациллина. Более выраженную степень синергизма продемонстрировала комбинация флавона и оксациллина [158]. Деметилтексазин (метаболит изофлавонов сои, выделенный у человека) усиливает антимикробное действие амоксициллина и оксациллина [80]. Исследование фармакодинамики показало, что комбинация галангина и цефтазидима вызывает повреждение ультраструктур клеток бактерий, а апигенин в комбинации с ампициллином/цефтриаксоном оказывал повреждающее действие на клеточную стенку и плазматическую мембрану *MRSA*.

Подавление роста клинических изолятов *MRSA* и *MSSA* особенно выражено при комбинации эпигаллокатехин галлата с бензилпенициллином/оксациллином. Кроме того, показано, что эпигаллокатехин галлат способен ингибировать β -лактамазу стафилококка. Кверцетин-пивалоксиметиловый конъюгат в различных парных комбинациях с ампициллином, цефепимом и ванкомицином проявляли синергизм в отношении *VISA* [84]. Помимо этого, кверцетин-пивалоксиметиловый конъюгат был способен дозозависимо ингибировать гемолитическую активность *S. aureus*.

Полифенолы с фторхинолонами также способны проявлять антистафилокковый синергизм. Комбинации генистеина с норфлоксацином, диосметина с норфлоксацином и ципрофлоксацином продемонстрировали

синергизм в отношении *MRSA* [64]. Сочетанное использование полифенола биоканина А с ципрофлоксацином показало способность преодолевать резистентность к фторхинолонам в отношении некоторых штаммов *MRSA*.

Выявлен феномен синергизма полифенолов с тетрациклинами. Байкалин увеличивает чувствительность тетрациклин-резистентного *S. aureus* в отношении тетрациклина и окситетрациклина. Эпигаллокатехина галлат в комбинации с окситетрациклином проявляет синергизм против коллекционных штаммов с типичными свойствами и клинических изолятов *S. aureus*, включая штаммы, устойчивые к эритромицину, метициллину и тетрациклину [47].

Данных об усилении антистафилококковой активности гликопептидов немного. Кверцетин-пивалоксиметиловый конъюгат проявлял синергизм с ванкомицином в отношении *MRSA* [67]. Весьма высокую степень синергизма продемонстрировало сочетание флавона с ванкомицином в отношении *VISA*.

Эпигаллокатехина галлат с гентамицином, кемпферол/кверцетин сrifампицином проявляли синергизм в отношении клинических изолятов *MRSA* [47].

Синергизм полифенолов с антибиотиками в отношении *K. pneumoniae* представлен немногочисленными данными. Известен синергизм между кверцетином и эритромицином в отношении *K. pneumoniae*. А байкалеин и цефотаксим, мирицетин в сочетании с амоксициллина клавуланатом, ампициллином/сульбактамом или цефокситином характеризовались синергичным взаимодействием в отношении *K. pneumoniae*, характеризующихся продукцией β -лактамаз расширенного спектра [157]. При этом синергизм между байкалеином и цефотаксимом коррелировал со снижением экспрессии β -лактамазы CTX-M-1. Эпигаллокатехин галлат восстанавливал чувствительность клинических изолятов резистентных штаммов *K. pneumoniae* к имипенему.

Выявлен синергизм между хлорамфениколом и кверцетином в отношении штамма *P. aeruginosa*, между эпигаллокатехин-3-галлатом и меропенемом – в отношении клинического изолята *A. baumannii* [103].

Комбинации «силибинин + ампициллин», а также «софорафлаванон G + ампициллин» проявляли синергизм в отношении кариесогенных бактерий полости рта человека (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. anginosu*, *S. gordoni*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* [*F. nucleatum*], *Porphyromonas gingivalis* [*P. gingivalis*]).

Существуют микроорганизмы, при влиянии на которые комбинация полифенолов с антибиотиками не проявляет синергизма. Так не наблюдалось синергизма между эпигаллокатехин галлатом и ампициллином против *E. coli*. Кверцетин, лютеолин, рамнетин и октилгаллат не улучшали антихламидийный эффект доксициклина в отношении *Chlamydophila pneumoniae*, а в некоторых случаях приводили к антагонистическим эффектам [146].

Антибиопленочная активность полифенолов. Нарушение формирования биопленок – еще одно направление в преодолении антимикробной резистентности [122]. Наиболее перспективным является изучение антибиопленочной активности полифенолов в отношении патогенных для человека бактерий и грибов. Примечательно, что антибиопленочная активность данных соединений найдена в субингибирующих суспензионный рост концентрациях. Это явление характерно для 3-гидроксихалкона в отношении *Haemophilus influenzae*, а также мирицетина в отношении *E. coli* [24].

В модели *in vivo* выявлено, что кверцетин способен проявлять синергизм с флуконазолом в отношении биопленок *Candida albicans* (*C. albicans*), ингибируя адгезию грибов, гидрофобность клеточной поверхности, флокуляцию, переход в гифу, метаболизм, толщину и дисперсию биопленок, а также подавляя экспрессию ряда генов гриба [115].

Бактерии рода *Staphylococcus* характеризуются многообразием механизмов приобретенной резистентности, в том числе образованием биопленок. По сравнению с обилием исследований прямой антистафилококковой активности полифенолов, накоплено не столь много данных о полифенолах с антибиопленочными свойствами. Ингибирование сессильного роста стафилококка отмечено для ксантогумола, 2',4'-дигидрокси-2-метоксихалкона, 2,2',4'-

тригидроксихалькона, 2',4'-дигидроксихалькона, 8-пренил-нарингенина, апигенина, физетина, хризина, лютеолина, кверцетина и дубильной кислоты [103]. Важно наличие таковой активности у 1,3-бис-(2-гидрокси-фенил)-пропенона в отношении клинических изолятов *MRSA* в концентрациях 6,25 мкг/мл [120].

Помимо скринингового поиска ведется изучение механизмов антибиопленочного действия полифенолов в отношении *S. aureus*. Обработка байкалином уже сформированной бактериальной биопленки снижает выработку стафилококкового энтеротоксина А и концентрацию α-гемолизина, а также тормозит работу регуляторов системы *quorum sensing* *agrA*, *RNAIII* и *sarA*, экспрессию генов *ica*. Полифенол эпигаллокатехин-3-галлат блокирует сборку амилоидогенных протеасом и нарушает образование амилоидных фибрилл *S. aureus* [129]. Напротив, мирицетин не ингибирует чувствительной системы *agr quorum*. Ликохалкон А изменяет экспрессию 817 генов биопленки *S. aureus*, ассоциированных с аутолизом, белками клеточной стенки, патогенными факторами, генами синтеза белков и ферментами [55].

P. aeruginosa также относят к патогенам, которые способны формировать бактериальные биопленки. Плюмбокатехин А, 8-О-метилретусин и кемпферола 3-O-(6'-O-ацетил) -β-D-галактопиранозид, катехины подавляли *in vitro* образование биопленок *P. aeruginosa* [92], дигидромирицетин подавлял образование биопленок *P. aeruginosa* на уретральных катетерах. Механизмы антибиопленочных эффектов были изучены для полифенолов кверцетина и эпигаллокатехина галлата. Кверцетин в концентрации 16 мкг/мл ингибировал выработку факторов вирулентности, включая пиоцианин, протеазу и эластазу, способствовал транскрипционным изменениям, связанным с системой *quorum sensing* - подавлению экспрессии генов *lasI*, *lasR*, *rhlII* и *rhlR* *P. aeruginosa* [42]. Эпигаллокатехин галлат ингибировал способность Fap (фибриллярный кислый белок) образовывать фибриллы и уменьшал амилоид-специфический флуоресцентный сигнал тиофлавина [48].

Также антибиопленочные свойства эпигаллокатехина галлата обнаружены в отношении *S. mutans*, *S. aureus* и *C. albicans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *P.*

gingivalis, *Enterococcus faecalis*. Синенсетин, нарнгенин, геспередин, неогеспередин, неоэриоцитрин, апигенин, хризин, лютеолин, протокатехин и ванильная кислоты демонстрировали выраженное ингибирование образования биопленок *E. coli* [37]. Механизмы ингибирования лютеолином прикрепления уропатогенных штаммов *E. coli* к эпителиальным клеткам мочевого пузыря человека *in vitro* были связаны со снижением липофильности ее поверхности и экспрессии гена *fimH* адгезина 1-го типа в сформированной биопленке [54].

1.3.4. Антимикробные эффекты изоликвиритигенина

Данные об антибактериальных свойствах ИЛГ не столь многочисленны. Большинство исследований посвящены изучению антибактериальной активности экстрактов растений, содержащих ИЛГ [140, 109]. Так, этилацетатный экстракт бразильского красного прополиса продемонстрировал антимикробную активность в отношении основных агентов, вызывающих кариес зубов (*S. mutans* и *Lactobacillus acidophilus*), а также в отношении *C. albicans* *in vitro* [109]. Исследование антибактериальных эффектов ИЛГ продемонстрировало выраженную активность против *P. gingivalis*, *F. nucleatum* и *Prevotella intermedia*, но не *S. mutans* и *S. sobrinus* [60], что в контексте поиска новых лекарственных субстанций доказывает необходимость изучения активности ИЛГ в виде чистой субстанции.

Заслуживают внимания данные о протективном эффекте ИЛГ при стафилококковой инфекции как *in vitro*, так и *in vivo*. Сообщается об умеренной прямой антистафилококковой активности ИЛГ. Так, МПК ИЛГ против *S. aureus* составила 128 мкг/мл [140], против *Staphylococcus xylosus* (*S. xylosus*) - 80 мкг/мл [79]. При этом ИЛГ в концентрациях 1/2 - 1/8 МПК препятствовали формированию бактериальных биопленок *S. xylosus* *in vitro*.

Предпринимаются попытки изучения взаимодействия ИЛГ с антибактериальными препаратами. Описано, что полифенолы корней солодки

(ИЛГ и ликвиритигенин) способны усиливать антистафилококковую активность β -лактамов в отношении *MRSA* [49].

In vivo продемонстрированы протективные эффекты ИЛГ при развитии стафилококковой инфекции. В модели острого повреждения легких при инфекции, вызванной *S. aureus*, предварительное введение препарата «Jie-Geng-Tang», содержащего ИЛГ, способствовало уменьшению бактериальной нагрузки в легких, подавлению экспрессии провоспалительных цитокинов через 24 ч после инфицирования и увеличению выживаемости мышей [140].

Ведутся исследования по разработке средств на основе ИЛГ, снижающих токсичность других лекарств. Так, разработаны и защищены патентные изобретения в виде комбинаций противотуберкулезных препаратов (изониазида, рифампина, пиразинамида, этамбутора) с полифенольными соединениями, в том числе и ИЛГ, с целью гепатопротекции при лечении туберкулёза.

1.3.5. Иммунотропные эффекты полифенолов

В реализации эффектов антибиотика *in vivo* важно наличие адекватной работы иммунной системы макроорганизма. В настоящее время растет количество публикаций, которые показывают, что полифенолы способны влиять на врожденный и приобретенный иммунитет на различных этапах развития инфекционного процесса.

На этапах инвазии распознавание общих структурных детерминант антигенов патогена (патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, PAMP) происходит клетками врожденного иммунитета. Некоторые полифенолы способны влиять на этот процесс, изменяя экспрессию TLR [158]. Ресвератрол способствует олигомеризации TLR-4, расположенных на нейтрофилах и моноцитах [124]. Последующая активация связанный с TLR-4 молекулы CD14 облегчает взаимодействие липополисахаридов грамотрицательных бактерий, хламидий, флавобактерий, респираторно-синцитиального вируса с TLR-4, тем самым

способствуя более продуктивному распознаванию и элиминации антигенов микробных патогенов.

В отличие от ресвератрола, такие полифенолы, как куркумин, энгелетин, астилбин, эпигаллокатехин галлат, проантоцианидин, апигенин, изоликвиритигенин, кверцетин, кемпферол-3-О-софорозид, байкалин, наингенин, флоретин, физетин, пиноцембрин, биоханин А могут подавлять экспрессию TLR-4 [174]. Эпигаллокатехина галлат и биоханин А, снижая активность мембранного TLR-2, вероятно, будут изменять способность иммунокомpetентных клеток распознавать грамположительные бактерии, грибы, микобактерии, спирохеты, трипаносомы, нейсмерии, лептоспиры, дрожжи, цитомегаловирус [106]. В отличие от дозозависимой стимуляции икариином TLR-9, эпигаллокатехина галлат подавляет экспрессию этого внутриклеточного рецептора, а также снижает активацию транскрипционного фактора IRF7 (регуляторный фактор интерферона 7), ответственного за синтез IFN α . Помимо влияния на противобактериальный ответ, изучено, что кверцетин подавляет активность TLR-3, участвующего в распознавании двусpirальной рибонуклеиновой кислоты вирусов [99].

Важнейшими эффекторами врожденного иммунитета являются фагоциты. Есть сведения о воздействии полифенолов на фагоцитарную активность [17]. Так, согласно одному исследованию, генистейн усиливает фагоцитоз, а в другом случае – ингибирует взаимодействие макрофагов с липополисахаридным матриксом [63]. Байкалин, генистейн и апигенин усиливают фагоцитоз *S. aureus* макрофагами. При исследовании влияния на фагоцитоз глюкуронида байкалина в концентрации 10 мкмоль/л установлена его более слабая стимулирующая активность, чем у агликонового байкалеина при 3 и 10 мкмоль/л. Это может быть связано с наличием у макрофагов β-глюкуронидазы, превращающей байкалин в его агликон [141].

Функциональная активность фагоцитов связана с продукцией АФК и азота, синтезом провоспалительных цитокинов. Полифенолы растений с участием различных механизмов способны как стимулировать, так и подавлять этот процесс. Например, T2R («рецепторы горького вкуса») стимулируют мукоцилиарный клиренс и выработку NO в ответ на сигнальные молекулы системы *quorum sensing*

в слизи дыхательных путей [74]. Известно, что антоцианиды (дельфинидин, цианидин, керационин, мирицетин) стимулируют выработку оксида азота иным путем, а эпигаллокатехин галлат, куместан, флавопиридол, лютеолин, апигенин, кверцетин, генистеин и антоцианидин, изотрифолиол и галловая кислота подавляют [74]. Галловая кислота стимулирует выработку АФК, а гесперидин уменьшает [63]. Однако сравнительно мало работ, описывающих механизм воздействия на синтез АФК и азота.

Известно, что изотрифолиол подавляет выработку NO, циклооксигеназы-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α с помощью ингибирования передачи сигналов при активации TLR-системы в липополисахарид-индукционных макрофагах *in vitro* [165]. Подавление синтеза IL-1 β способно снизить его токсическое влияние на β -клетки поджелудочной железы при развитии экспериментального сахарного диабета 1 типа, а блокирование активности IL-6 способно уменьшить синтез С-реактивный белка и сывороточного амилоида P, снизить пролиферацию Т-лимфоцитов.

Проантоцианидин снижает концентрацию в плазме IL-1 β , IL-6 и TNF- α в модели острой гепатотоксичности, индуцированной цисплатином у экспериментальных животных, ингибируя воспаление и апоптоз гепатоцитов [114] Лютеолин, апигенин, кверцетин, генистеин и антоцианидин, ингибируя экспрессию FcetaRI и активацию NF-kB, снижают выработку провоспалительного цитокина TNF- α и NO, уменьшая развития септического шока.

Байкалин уменьшает экспрессию IL-6 и IL-8, сигнальные пути, опосредованные NF-kB, p38 MAPK и JNK, а также механизмы, связанные с TLR, в кератиноцитах человека *in vitro*. Обсуждается, что эти механизмы могут лежать в основе подавления *P. gingivalis*-ассоциированного пародонтита. Энгелетин и астилбин оказывают ингибирующее влияние не только на экспрессию IL-1 β и IL-6, но и TLR-4, TNF- α , IL-10, выступая в роли потенциальных противовоспалительных агентов.

Потенциально подавляет воспаление и апигенин: снижая выработку провоспалительных факторов TLR-4, IL-1 β и TNF- α , он способен повышать уровень антивоспалительного цитокина IL-10 в модели *in vitro* [40]. Пиноцембрин,

снижая выработку провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α и угнетая продукцию активных форм азота, способен подавлять иммунные каскады не только врожденного, но и приобретенного иммунитета. Подавление активации NF- κ B пиноцембрином, кверцетином, ресвератролом, трицином, пиперидилметилоксихалконом, наргенином, ликвидином, биоханином А, а также ИЛГ способно снижать экспрессию цитокинов IL-1 α и IL-1 β [81].

Помимо изменения механизмов врожденных иммунных реакций, полифенолы способны влиять на адаптивный иммунный ответ. Известно о влиянии полифенолов на процесс дифференцировки наивных Т-лимфоцитов с последующим переключением Т-хелперного иммунного ответа [13]. Энотеин В стимулирует пролиферацию лимфоцитов путем увеличения экспрессии CD25 и CD69 рецепторов – маркеров активированных Т- и В-лимфоцитов, в то время как полифенолы корней солодки подавляют пролиферацию активированных Т- и В-лимфоцитов [80].

Особенный интерес, на наш взгляд, представляют работы по изучению влияния полифенолов на Т-хелперный ответ 17 типа и провоспалительный цитокин IL-17, несмотря на немногочисленность подобных исследований. Следует подчеркнуть, что большинство исследований посвящено влиянию полифенолов на экспрессию IL-17 при аутоиммунной патологии у экспериментальных животных, но не на течение инфекционно-воспалительного процесса. Так, например, выявлено подавление цианидином индуцированной IL-17A гиперплазии кожи мышей, а также гиперреактивности дыхательных путей в модели стероид-резистентной астмы [21]. Ингибирование икариином активации STAT3 и снижение продукции IL-17 коррелируют с уменьшением симптоматики экспериментального ревматоидного артрита. Однако следует отметить, что переключение дифференцировки Т-лимфоцитов с увеличением пула Th17 способствует активации эффекторов врожденной иммунной реакции, преимущественно нейтрофилов. Таким образом, Th17 участвуют в антиинфекционном иммунитете, в частности, например, есть данные, что IL-17 дефицитные мыши более восприимчивы к стафилококковым инфекциям [126].

Известно, что введение суммы полифенолов корней солодки способствует увеличению выработки IL-17 за счет переключения иммунного ответа с Th1 на Th17 [7]. Еще четыре изофлавона (биоханин А, генистеин, формононетин и дайдзеин) усиливают экспрессию IL-17. Напротив, наингенин, ингибируя секрецию TNF- α и IL-6 макрофагов, препятствует образованию Th-17 [84]. Генистеин, снижая выработку цитокина-индуктора IL-6, также подавляет дифференцировку наивных Т-лимфоцитов по пути Th17 [113]. Подавляющее действие на Th17-путь дифференцировки выявлено также у икариина. Колавирон, снижая экспрессию IL-3, IL-4 и IL-10 в клеточной линии Сертоли, стимулированной липополисахаридом, в низких концентрациях (5-15 мкМ) подавляет дифференцировку Th-1/Th-2, уменьшая признаки воспалительного повреждения ткани.

1.3.6. Иммунотропные эффекты изоликвиритигенина

В отличие от немногочисленных данных об антибактериальных эффектах ИЛГ, в современной литературе накоплено достаточно сведений о влиянии данного халкона на различные звенья иммунной системы человека и животных, а также продемонстрированы противовоспалительные эффекты ИЛГ в различных моделях.

Изменяя активность TLR, запускающих врожденные иммунные реакции под влиянием антигена, ИЛГ, модулируя TRIF-зависимые сигнальные пути, способствует снижению экспрессии воспалительных генов в макрофагах [128]. Описана способность ИЛГ ингибировать активность NF-кВ, синтез ЦОГ-2 и NO вследствие подавления экспрессии TLR-4 [127]. При этом с подавлением активации NF-кВ ИЛГ связано снижение экспрессии IL-1 α и IL-1 β [81].

В культуре клеток кишечного эпителия человека HT-29 ИЛГ подавляет выработку IL-8, IL-1 β и ЦОГ-2, что, по мнению авторов, позволяет рассматривать ИЛГ как перспективное средство для борьбы с воспалительными заболеваниями кишечника [95]. У самок Balb/C ИЛГ дозозависимо подавляет выработку Th2-

лимфоцитами IL-4 и IL-5, участвующих в иммунопатогенезе хронического воспаления дыхательных путей при бронхиальной астме [68].

Особого внимания заслуживают работы, посвященные изучению влияния ИЛГ на механизмы противоинфекционного иммунитета, демонстрирующих способность данного халкона модулировать механизмы врожденных иммунных реакций и адаптивного иммунного ответа, способствовать увеличению выживаемости лабораторных животных [79, 96]. Установлено, что ИЛГ снижает уровни молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1), обеспечивающих «прилипание» лейкоцитов к эндотелию при инфекционной инвазии [86], индуцирует выработку антимикробного пептида (АМП) β -дефензина-3 в эпителии кишечника человека [116]. В модели туберкулеза позвоночника у новозеландских белых кроликов ИЛГ ингибирует образование гранулем, снижая экспрессию белков MCP-1, NF-кВ и секрецию IL-4 и IL-10 [93]. В модели мастита, вызванного *S. xylosus* ATCC 700404 у мышей, показано, что ИЛГ значительно снижает выработку TNF- α и IL-6 иммунными клетками в тканях молочных желез [79].

Влияние на адаптивный иммунный ответ ИЛГ может быть связано с ингибированием активации Т-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* [97]. Ряд исследований демонстрирует способность флавоноидов корней солодки, содержащих ИЛГ, увеличивать секрецию IL-17 активированными Т-клетками *in vitro* [17], а также переключать иммунный ответ с дифференцировкой клеток, продуцирующих IL-17 [7].

Таким образом, интерес к изучению фармакологических эффектов и механизмов флавоноидов при инфекционных заболеваниях не ослабевает и на современном этапе. Имеющиеся сведения о антибактериальной активности ИЛГ в отношении *S. aureus* и иммунотропных эффектах являются предпосылкой углубленного изучения данного халкона с целью изыскания новых подходов для повышения эффективности терапии генерализованных инфекций, вызванных *S. aureus* [38, 133, 119].

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Поэтапная схема проведения эксперимента

План экспериментальных работ состоял из следующих этапов:

1) Определение антистафилококковых эффектов ИЛГ и его комбинаций с антибиотиками сравнения *in vitro*. Для этого определяли:

- МПК ИЛГ и его комбинаций с оксациллином/ванкомицином в отношении различных (коллекционных и «диких») штаммов *S. aureus*;
- способность ИЛГ и его комбинаций с оксациллином/ванкомицином подавлять формирование бактериальных биопленок штаммов *S. aureus*.

2) Оценка иммунотропных эффектов ИЛГ:

- влияние ИЛГ на функции фагоцитов как эффекторов врожденного иммунитета (хемотаксис, поглотительную способность, продукцию АФК фагоцитами);
- оценка влияния ИЛГ на пролиферацию и функциональную активность (секреция цитокинов) активированных лимфоцитов как эффекторов адаптивного иммунитета.

3) Оценка эффективности и некоторых механизмов ИЛГ в модели стафилококковой инфекции:

- влияние ИЛГ на выживаемость лабораторных животных в модели генерализованной стафилококковой инфекции;
- влияние ИЛГ на секрецию цитокинов спленоцитами и лимфоцитами паших лимфатических узлов мышей в модели стафилококковой инфекции.

2.2. Объекты и материалы исследования

2.2.1. Тестируемое вещество и его использование в экспериментах *in vivo* и *in vitro*

В качестве тестируемого вещества использовали ИЛГ (чистота 98%, *Xi’An Yiyang Bio-Tech Co., Китай*).

Для экспериментальных целей ИЛГ растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО, *Panreac, Испания*), матричные растворы хранили при комнатной температуре в темноте. В экспериментах *in vitro* ИЛГ тестировали в диапазоне концентраций 0,1-128 мкг/мл, добавляя в контрольные лунки соответствующие объемы растворителя так, чтобы конечная концентрация ДМСО в лунках не превышала 1%.

Для парентерального (внутрибрюшинного) введения экспериментальным животным матричный раствор ИЛГ в ДМСО разводили фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH=7,4, *ООО «ПанЭко», Россия*) *ex tempore* и вводили 10 мг/кг в объеме не более 0,5 мл, трехкратно. Животным контрольной группы вместо ИЛГ вводили соответствующие объемы ДМСО (не более 5%), разведенного в ФСБ.

2.2.2. Препараты сравнения и их использование в экспериментах *in vivo* и *in vitro*

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* использовали антибиотики сравнения: оксациллин (*ООО «ХимТехЛаб», Россия*) и ванкомицин (*ООО «ХимТехЛаб», Россия*).

Для экспериментов *in vitro* антибиотики разводили в ФСБ (*ООО «ПанЭко», Россия*) и тестировали в диапазоне концентраций: для оксациллина – 0,03125 – 1024 мкг/мл, ванкомицина – 0,125 – 2 мкг/мл. В контрольные пробы вместо антибактериальных препаратов сравнения добавляли соответствующие объемы ФСБ. Аликовты матричных растворов хранили при температуре -70 °C в низкотемпературном холодильнике (*Haier, Китай*).

Для парентерального введения животным антибиотики разводили в ФСБ (*ООО «ПанЭко», Россия*) *ex tempore*: оксациллин (100-400 мг/кг) и ванкомицин (40-160 мг/кг). Мышам контрольных групп вместо ИЛГ вводили соответствующие объемы ФСБ.

2.2.3. Характеристика бактериальных штаммов и условия их поддержания

В качестве бактериальных моделей были использованы коллекционные штаммы с типичными морфологическими и биохимическими свойствами, а также клинические изоляты (Таблица 2-1). Штаммы были приобретены в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (г. Москва, Россия), а также любезно предоставлены сотрудниками отделом молекулярной микробиологии и медицинской эпидемиологии ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия, руководитель отдела – ведущий научный сотрудник, д.м.н., профессор Сидоренко С.В.).

Штаммы *S. aureus* культивировали в бульоне Мюллера-Хинтона (БМХ, *Medica plus LLS, Россия*) при 37 °C в стеклянных аэрируемых флаконах. Для экспериментов *in vitro* и *in vivo* из ночной бактериальной культуры, находящейся в средней log-фазе (время определяли в предварительном эксперименте), готовили разведения. Расчет колониеобразующих единиц (КОЕ) осуществляли путем измерения оптической плотности (OD) бактериальной суспензии при 630 нм с использованием микропланшетного фотометра (*ImmunoChem 2100, США*), исходя из соотношения: 1 оптическая единица OD = $8,5 \times 10^8$ КОЕ/мл при 630 нм.

Таблица 2-1. Характеристика бактериальных штаммов *Staphylococcus aureus*.

Штамм	Происхождение штамма	Питательная среда для культивирования
ATCC 4330	Музейный штамм	БМХ
ATCC 29213	Музейный штамм	БМХ
ATCC 25923	Музейный штамм	БМХ
1	Клинический изолят	БМХ
6	Клинический изолят	БМХ
10	Клинический изолят	БМХ
74	Клинический изолят	БМХ
77	Клинический изолят	БМХ
83	Клинический изолят	БМХ

2.2.4. Экспериментальные животные

Мыши Balb/C (самцы, массой 20-22 г, возрастом 6-8 недель) были получены от научно-производственного предприятия «Питомник лабораторных животных» Института биологии РАН (г. Пущино, Россия). Уход за животными и обращение с ними осуществляли в соответствии с принципами ARRIVE [161], а также с требованиями ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» [1].

Мышей, разделенных на постоянные и гармоничные группы по 8 животных, содержали в помещении с низким уровнем освещенности и шума при температуре от 20 °C до 24 °C, относительной влажности от 45% до 65% в просторных клетках из полупрозрачного лабораторного пластика, легко подвергающихся чистке. В качестве наполнителя использовали древесный подстил. Частота уборки клеток производилась по мере загрязнения и в зависимости от численности группы.

На протяжении всего содержания животные имели свободный доступ к воде и пище. Для кормления использовали полнорационный корм «Чара» для лабораторной животной категории SPF (ООО «Хлебная база № 9», Владимирская обл., Россия). Эвтаназию животных проводили методами цервикальной дислокации и обезглавливания. Утилизация трупов животных производилась как

биологически опасных отходов класса Б. Протокол данных экспериментов был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» (протокол № 20-04 от 17.04.2020 г.).

2.2.5. Выделение мононуклеаров селезенки и паховых лимфатических узлов мышей

После выведения мышей из эксперимента в стерильных условиях извлекали селезенку и паховые лимфатические узлы. Органы, помещенные в среду RPMI-1640, бережно гомогенизировали, после чего гомогенизаты фильтровали с помощью капронового фильтра от тканей стромы и клеточных конгломератов. Затем суспензию двукратно центрифугировали (10 мин., 300 g, *СМ-6МТ, ELM, Латвия*), удаляя супернатант. После этого для удаления эритроцитарной фракции к осадку добавляли раствор Бройля (0,84% раствор NH₄CL, 10 mM Хепес-буфера, несколько кристаллов фенолового красного) в соотношении 1:9, инкубировали 1 мин. при комнатной температуре, после чего клеточную суспензию дважды центрифугировали со сменой культуральной среды. Осажденные мононуклеары подсчитывали в камере Горяева по стандартной методике и для последующего культивирования разводили в среде RPMI-1640 (*Thermo Fisher Scientific, США*) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (*Thermo Fisher Scientific, США*), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мКГ/мл стрептомицина («полная» среда RPMI-1640) (конечная концентрация 10⁶ клеток на лунку).

2.2.6. Получение крови здоровых добровольцев

Для определения поглотительной активности фагоцитов крови человека и продукции ими АФК в день эксперимента производили забор крови из локтевой вены в гепаринизированные пробирки (*Improvacuter, Китай*) у здоровых добровольцев (всего исследовано 60 человек) в возрасте 18-25 лет на базе Университетской клиники ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет

имени И.Н. Ульянова» (лицензия №ФС - 21-01-000500 от 6 марта 2015 года) после взятия информированного добровольного согласия участника исследования.

Протокол данных экспериментов одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» (протокол № 20-04 от 17.04.2020 г.).

2.2.7. Получение флуорохром-меченого *S. aureus*

В качестве стимулятора фагоцитоза использовали полностью инактивированный штамм *S. aureus* ATCC 25923. Для этого ночную бактериальную культуру штамма подвергали инкубации на водяной бане при 95°C в течение 30-40 мин. в плотно закрытых стеклянных пробирках с последующим центрифугированием (1000g, 25 мин., CM-6MT, ELMI, Латвия). После удаления надосадочной жидкости к осажденным убитым бактериям добавляли карбонатно-бикарбонатный буфер (0,1 М, pH 9,5, ООО «ПанЭко», Россия) и снова центрифугировали (1000g, 25 мин.) (CM-6MT, ELMI, Латвия). Затем в пробирки с инактивированным стафилококком добавляли ФСБ так, чтобы концентрация бактерий составила 2×10^8 микробных тел на 1 мл. Затем к инактивированной бактериальной суспензии добавляли флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), растворенный в ДМСО, из расчета 0,05 мг на 10^8 бактерий с последующей инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Затем инактивированные бактериальные клетки трехкратно отмывали ФСБ центрифугированием (1000g, 10 мин.) (CM-6MT, ELMI, Латвия) и готовили разведение взвеси ФИТЦ-меченых бактерий до концентрации 5×10^8 микробных тел на 1 мл. Аликовты в микропробирках (TREFFLAB, Швейцария) хранили при температуре -70 °C в низкотемпературном холодильнике (Haier, Китай).

2.3. Модели и методы исследования

2.3.1. Определение антимикробной активности

Антимикробную активность определяли методом серийных разведений в БМХ в 96-луночных плоскодонных планшетах (*Corning Costar, США*) [35]. Для этого в лунки к бактериальной суспензии *S. aureus* (конечная концентрация 5×10^5 КОЕ/мл) вносили ИЛГ, оксациллин, ванкомицин или их комбинации с ИЛГ и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. По истечению времени инкубации в проходящем свете сравнивали мутность опытных и контрольных образцов. Минимальной подавляющей концентрацией (МПК) ИЛГ считали самую низкую концентрацию, приводившую по истечению времени инкубации к видимому подавлению бактериального роста.

2.3.2. Оценка динамики бактериального роста

Для оценки динамики бактериального роста использовали метод, описанный Wang [176], с небольшими изменениями. Для этого к бактериальной суспензии *S. aureus* (конечная концентрация в образце 5×10^5 КОЕ/мл) добавляли ИЛГ так, чтобы его конечные концентрации в образцах составляли 1/8 МПК, 1/4 МПК, 1/2 МПК, МПК. Для оценки бактериального роста в образцах OD измеряли через 4, 8, 12, 24 ч при 630 нм с использованием микропланшетного фотометра (*ImmunoChem 2100, США*).

2.3.3. Оценка формирования бактериальных биопленок

Для изучения формирования бактериальных биопленок использовали МТТ-тест, описанный Grela [71]. Для этого к бактериальной суспензии *S. aureus* (конечная концентрация в лунке 5×10^5 КОЕ/мл) в 96-луночные плоскодонные планшеты (*Corning Costar, США*) добавляли ИЛГ, оксациллин, ванкомицин или их

комбинации с ИЛГ. Все образцы культивировали в течение 24 ч. За 2 ч до окончания инкубации бактериальную суспензию удаляли, лунки трижды промывали ФСБ и добавляли 1% раствор 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромида (МТТ, *eBioscience, США*) в ФСБ и инкубировали в течение 2 ч при 37 ° С. После этого для растворения частиц формазана раствор МТТ заменяли на ДМСО, ресуспензировали и инкубировали в течение 15 мин. при комнатной температуре, затем измеряли OD при 492 нм с использованием микропланшетного фотометра (*ImmunoChem 2100, США*).

2.3.4. Оценка пролиферации митоген-активированных мононуклеарных клеток

Оценку влияния ИЛГ на активированные лимфоциты производили с помощью МТТ-теста с использованием спленоцитов мышей, стимулированных Т-клеточным митогеном конканавалином А (КоА, *ООО «ПанЭко», Россия*). Для этого мононуклеары мышей, выделенные щадящей гомогенизацией лимфоидных органов (селезенки) с последующим удалением эритроцитарной фракции путем осмотического лизиса раствором Бройля, культивировали (37 °C, 5% CO₂, φ = 100%, 24 ч) в «полной» среде RPMI-1640 в присутствии митогена КоА (15 мкг/мл,). Через 24 ч после активации лимфоцитов в опытные лунки вносили ИЛГ (0,1-128 мкг/мл), и продолжали культивирование в прежних условиях. За 4 ч до окончания инкубации в лунки вносили по 20 мкл 0,5% раствора МТТ (*ООО «ПанЭко», Россия*). По истечении 4 ч инкубации супернатант заменяли на 100 мкл ДМСО, после чего через 15 мин. определяли оптическую плотность образцов с помощью планшетного фотометра (*ImmunoChem 2100, США*) при λ = 492 нм.

2.3.5. Оценка секреции цитокинов лимфоидными клетками

Лимфоидные клетки интактных мышей или полученные от животных на 4 и 5 день развития генерализованной стафилококковой инфекции культивировали в

присутствии митогена (КонА, 15 мкг/мл) (*ООО «ПанЭко», Россия*) при 37 °C, 5% CO₂, φ = 100% в «полной» среде RPMI-1640. Через 24-48 ч концентрацию цитокинов в супернатантах определяли с помощью набора реактивов (*MILLIPLEX MAP, Mouse Th17 MAGNETIC BEAD PANEL KIT 96-Well Plate Assay #MT17MAG4712-PX25, США*). Для этого в лунки планшета, промытого буферным раствором (10 мин.), добавляли по 25 мкл исследуемых супернатантов. Затем в каждую лунку добавляли по 25 мкл магнитных шариков и инкубировали при перемешивании на шейкере 16-18 ч при 4 °C в темноте. По истечению времени добавляли по 25 мкл детектирующих антител и продолжали инкубировать, перемешивая на шейкере 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляли по 25 мкл стрептавидин-фикаэритрина, инкубурируя при перемешивании 30 мин. Затем удаляли содержимое лунки, дважды промывали их буферным раствором и жидкостью MAGPIX. После ресуспензирования образцы анализировали с помощью мультиплексного анализатора (*Magpix, США*).

2.3.6. Оценка хемотаксиса фагоцитов

Для изучения влияния ИЛГ на хемотаксис фагоцитов использовали модель пептон-индукционной миграции фагоцитов в брюшную полость мышей, предложенной *Miyazaki* [90], в которой проводили прямое параллельное сравнение следующих групп:

- Контрольная группа 1 – мышам внутрибрюшинно трехкратно вводили стерильный ФСБ (по 0,5 мл);
- Контрольная группа 2 – мышам внутрибрюшинно трехкратно вводили 3% раствор пептона (3 мл) (*ГНЦ ПМБ, Россия*);
- Контрольная группа 3 - мышам внутрибрюшинно трехкратно вводили 10% ДМСО, затем - 3% раствор пептона (3 мл);
- Опытная группа – мышам внутрибрюшинно трехкратно вводили ИЛГ (10 мг/мышь), затем - 3% раствор пептона (3 мл).

Через 24 ч (хемотаксис преимущественно нейтрофилов) и 72 ч (хемотаксис преимущественно макрофагов) после инъекций животным, выведенным из опыта, производили внутрибрюшинную инстилляцию 20 мл ФСБ с помощью инсулинового шприца (*SFM, Германия*). После пальпаторного массирования брюшка (30 с) полученные промывные воды отбирали в пластиковые пробирки (*Литопласт-мед, Россия*) и центрифугировали (10 мин., 300 г, *СМ-6МТ, ELMI, Латвия*). Затем после ресусспензирования осадка в 1 мл ФСБ подсчитывалось количество клеток с помощью световой микроскопии в камере Горяева согласно стандартной методике. Для количественной оценки миграции фагоцитов рассчитывали индекс стимуляции (ИС) по формуле:

$$\text{ИС} = A/B, \text{ где}$$

A – количество клеток в группах на фоне введения пептона,

B – количество клеток в группе отрицательного контроля (стерильный ФСБ).

2.3.7. Оценка поглотительной активности фагоцитов

Для оценки поглотительной активности фагоцитов воспользовались методикой, описанной Пинегиным Б. В. и др. [10]. В микропробирки (*TREFFLAB, Швейцария*) с образцами гепаринизированной крови человека добавляли ИЛГ (опытные образцы), которые культивировали в течение 30 мин. ($t=37^{\circ}\text{C}$, $\phi=100\%$, $\text{CO}_2=5\%$). По истечению данного времени к образцам добавляли ФИТЦ-меченный *S. aureus* в соотношении к крови 1:10 и продолжали инкубацию (30 мин., $t=37^{\circ}\text{C}$, $\phi=100\%$, $\text{CO}_2=5\%$). После этого во все образцы добавляли лизирующий раствор (*Backman Coulter, США*) для лизиса эритроцитов и инкубировали еще 10 мин. Затем образцы анализировали на проточном цитометре Cytomics FC500 (*Backman Coulter, США*), оценивали интенсивность флуоресценции и рассчитывали фагоцитарный индекс (ФИ):

$$\text{ФИ} = A/B, \text{ где}$$

A - количество фагоцитов, поглотивших ФИТЦ-меченные бактерии

B - общее число фагоцитов.

2.3.8. Оценка продукции активных форм кислорода фагоцитами

Оценку продукции АФК фагоцитами осуществляли с помощью теста форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА)-индуцированного «кислородного взрыва», изложенного Пинегиным Б. В. и др. [10]. Для этого в микропробирки (*TREFFLAB, Швейцария*) с образцами гепаринизированной крови человека добавляли ИЛГ или ДМСО и инкубировали (30 мин., $t=37$ °C, $\phi=100\%$, $CO_2=5\%$). По истечению времени к части образцов добавляли ФМА (0,1 мкг/мл, образцы с активированными фагоцитами), к остальным - 0,2% раствор ЭДТА (контрольные не стимулированные образцы фагоцитов) и инкубировали 10 мин. ($t=37$ °C, $\phi=100\%$, $CO_2=5\%$). После инкубации ко всем образцам добавляли флуорогенный субстрат дигидрородамин 123 (ДГР 123, *Sigmaaldrich, США*) и инкубировали еще 10 мин. ($t=37$ °C, $\phi=100\%$, $CO_2=5\%$). Эритроцитарную фракцию в образцах удаляли с помощью добавления лизирующего раствора и анализировали на проточном цитометре *Cytomics FC500 (Becton Coulter, США)*. С помощью полученных данных оценивали процент активированных нейтрофилов и моноцитов, а также показатели спонтанной и стимулированной интенсивности флуоресценции.

2.3.9. Модель стафилококковой инфекции у мышей

Для воспроизведения модели генерализованной стафилококковой инфекции мышей заражали *S. aureus* путем внутрибрюшинного введения бактериальной суспензии в ФСБ в дозах 5×10^8 КОЕ/мышь, 10^9 КОЕ/мышь, $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мышь и проводили прямое параллельное сравнение экспериментальных групп (Таблица 2-2).

День заражения считали нулевым днем эксперимента. Выживание мышей оценивали в первый день каждые 6 ч, со второго дня и в последующие дни

эксперимента - ежедневно. Для анализа полученных результатов строили кривые Каплан-Майера и оценивали динамику гибели мышей.

Таблица 2-2. Формирование экспериментальных групп в модели генерализованной стафилококковой инфекции.

Группа	Этапы эксперимента	
	Предварительное введение (внутрибрюшинно)	Последующее введение (внутрибрюшинно)
Контроль 1	растворитель с интервалом 4 ч, трехкратно	З А Р А Ж Е Н И Е
Опыт 1	ИЛГ (10 мг/кг×3) с интервалом 4 ч	
Контроль 2	-	
Опыт 2А	-	
Опыт 2В	-	

2.3.10. Метод секторных посевов крови

Определение степени бактериемии на фоне стафилококковой инфекции производили методом секторных посевов [151] с небольшой модификацией. В первый день производили посев крови из магистральных сосудов шеи декапитированных мышей, предварительно выведенных из эксперимента, одной стандартной (3 мм) бактериологической петлей по секторам I, II, III и IV в чашку Петри с 5% кровяным агаром (*БиоВитрум Санкт-Петербург, Россия*) (Рисунок 2-1). Для этого в участке среды сектора I делали посев, равномерно втирая материал по всей площади сектора, затем, не беря нового материала, этой же петлей делали посев штрихами на питательную среду в секторе II (3-4 штриха),

из сектора II во III, из III сектора - в IV. Затем образцы инкубировали (24 ч, 37 °C).

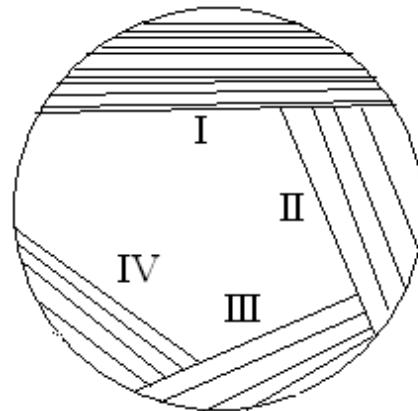


Рисунок 2-1. Схема рассева крови штрихами для получения изолированных колоний.

На второй день эксперимента определяли степень бактериемии (Таблица 2-3) в зависимости от того, в каком секторе обнаружен рост колоний микроорганизма. При наличии менее 100 тыс. микробов в 1 мл крови рост колоний наблюдается только в секторе I чашки Петри. Появление роста колоний в II секторе указывает на более высокую степень бактериемии.

Таблица 2-3. Соответствие числа колоний бактерий, выросших на агаре, степени бактериемии.

Количество бактерий в 1 мл крови	Число колоний в различных секторах чашки Петри			
	I	II	III	IV
Менее 1 тыс.	1-6	Роста нет	Роста нет	Роста нет
1 тыс.	20-30	Роста нет	Роста нет	Роста нет
5 тыс.	30-60	Роста нет	Роста нет	Роста нет
10 тыс.	70-80	Роста нет	Роста нет	Роста нет
50 тыс.	100-150	Роста нет	Роста нет	Роста нет
100 тыс.	Очень большое	5-10	Роста нет	Роста нет
500 тыс.	Очень большое	20-30	Роста нет	Роста нет
1 млн.	Очень большое	40-60	Роста нет	Роста нет

Количество бактерий в 1 мл крови	Число колоний в различных секторах чашки Петри			
	I	II	III	IV
5 млн.	Очень большое	100-140	10-20	Роста нет
10 млн.	Очень большое	Очень большое	30-40	Роста нет
50 млн.	Очень большое	Очень большое	60-80	Единичные
100 млн.	Очень большое	Очень большое	80-140	От единичных до 25

2.3.11. Оценка динамики количества мононуклеаров в селезенке и лимфатических узлах при генерализованной стафилококковой инфекции

После заражения внутрибрюшинной инъекцией суспензии *S. aureus* в дозе 5×10^8 КОЕ/мышь ежедневно в течение 14 дней мышей выводили из эксперимента, извлекали селезенку и паховые лимфатические узлы и подсчитывали количество мононуклеаров в камере Горяева по стандартной методике.

2.4. Статистический анализ

Все эксперименты были выполнены не менее, чем в трех сериях. Полученные в ходе них данные были статистически обработаны с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 8.4.0, а также пакета прикладных программ Microsoft Excel 365. Для оценки динамики гибели мышей строили кривые Каплан-Майера. Полученные результаты подчинялись закону нормального распределения, обрабатывались методами вариационной статистики и представлялись в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего. Достоверность различий между группами в экспериментах определяли по критерию Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$, где p – уровень значимости.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Антибактериальные эффекты изоликвиритигенина и его комбинаций с антибиотиками в отношении *S. aureus* *in vitro*

3.1.1. Прямая антибактериальная активность изоликвиритигенина и его комбинаций с антибиотиками

Прямая антибактериальная активность ИЛГ. Антибактериальную активность в отношении коллекционных штаммов ATCC и клинических изолятов *S. aureus* определяли методом серийных разведений в БМХ, измеряя значения МПК.

ИЛГ был протестирован в диапазоне концентраций 0,1 - 128 мкг/мл. Через 24 ч инкубации с ИЛГ в концентрации 128 мкг/мл в лунках со штаммами *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, *S. aureus* 10 наблюдалось выраженное подавление суспензионного роста бактерий, о чем свидетельствовало полностью прозрачное содержимое лунок в проходящем свете, сопоставимое с «отрицательным» контролем (стерильный БМХ) (Таблица 3-1). В концентрации 64 мкг/мл образцы с указанными штаммами слегка опалесцировали, что свидетельствовало о частичном подавлении бактериального роста.

Таблица 3-1. Минимальные подавляющие концентрации изоликвиритигенина в отношении коллекционных штаммов и клинических изолятов *Staphylococcus aureus*, мкг/мл.

Штамм <i>S. aureus</i>	ATCC 25923	ATCC 29213	ATCC 4330	74	83	1	6	10	77
МПК ИЛГ, мкг/мл	64	128	128	64	64	64	64	128	64

Прозрачность проб со штаммами *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 74, *S. aureus* 83, *S. aureus* 1, *S. aureus* 6, *S. aureus* 77 с добавлением ИЛГ в концентрациях 64 мкг/мл и 128 мкг/мл не отличалась от «отрицательного» контроля, а в

концентрации 32 мкг/мл отмечалась незначительная мутность суспензии. Во всех остальных опытных пробах наблюдался интенсивный рост бактерий, аналогичный мутности «положительного» контроля (суспензия бактерий без ИЛГ).

Влияние ИЛГ на динамику бактериального роста *S. aureus*. Была изучена динамика роста штамма *S. aureus* ATCC 25923 в БМХ в присутствии ИЛГ в диапазоне концентраций МПК – МПК/8 (64 - 8 мкг/мл). Как показано на Рисунке 3-1, ИЛГ дозозависимо подавлял рост исследуемого штамма *S. aureus* в концентрациях МПК – МПК/8. В первые 4 ч наблюдений оптическая плотность образцов существенно не отличалась друг от друга, и ее значения были сопоставимы со значениями проб с бактериальной суспензией без добавления ИЛГ («положительный» контроль). Через 8 ч различия OD при 630 нм между положительным контролем и образцами с ИЛГ во всех исследуемых концентрациях стали нарастать. К концу инкубации (24 ч) значения OD образцов при 630 нм стали достоверно отличными от значений «положительного» контроля (бактериальной суспензии) - $0,6 \pm 0,2$ Ед: так, для ИЛГ в МПК она составила $0,1 \pm 0,0$ Ед ($p < 0,05$), МПК/2 - $0,3 \pm 0,1$ Ед ($p < 0,05$), МПК/4 - $0,4 \pm 0,1$ Ед ($p < 0,05$), МПК/8 - $0,5 \pm 0,3$ Ед ($p < 0,05$).

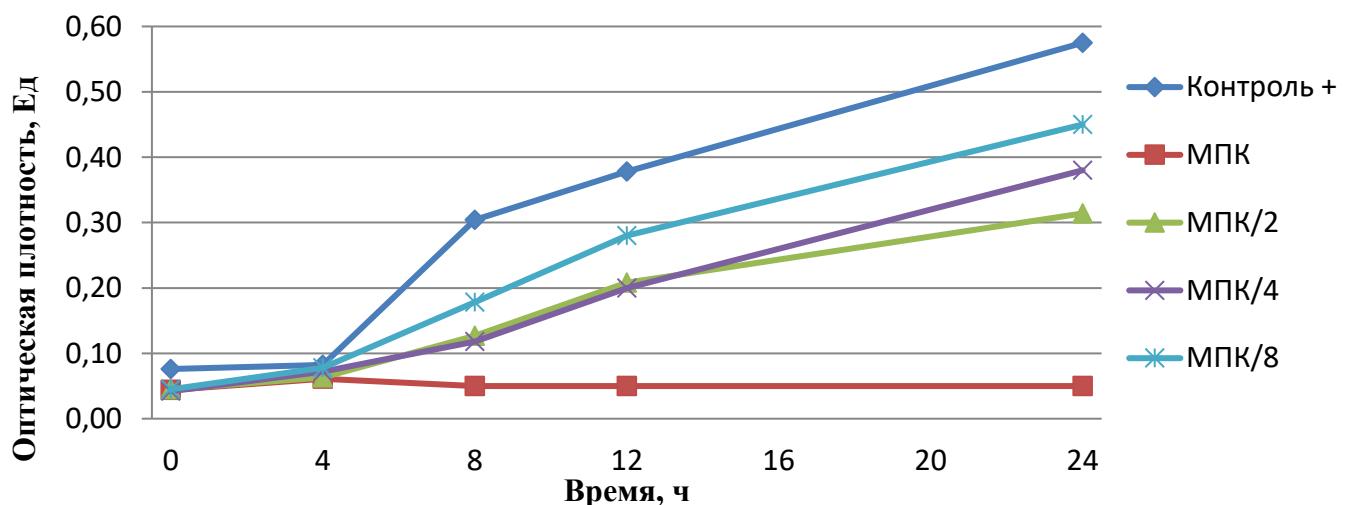


Рисунок 3-1. Влияние изоликовиритигенина на суспензионный рост *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 в бульоне.

Прямая антибактериальная активность ИЛГ в комбинации с оксациллином. Антибактериальную активность ИЛГ в комбинации с антистафилококковым антибиотиком оксациллином в отношении штаммов *S. aureus* изучали в концентрациях ≤ МПК: ИЛГ – в диапазоне 0,1 - 128 мкг/мл, оксациллин – 0,125 – 1024 мкг/мл.

Установлено, что через 24 ч инкубации в образцах со штаммами *S. aureus* ATCC 25923 с ИЛГ в концентрации 32 мкг/мл и оксациллином 0,125 мкг/мл, *S. aureus* ATCC 29213 с добавлением ИЛГ в концентрации 64 мкг/мл и оксациллина в концентрации 0,25 мкг/мл, *S. aureus* ATCC 4330 в присутствии ИЛГ (64 мкг/мл) и оксациллина (8 мкг/мл), а также *S. aureus* 77 с добавлением ИЛГ (<1 мкг/мл) и оксациллина (256 мкг/мл) в проходящем свете были полностью прозрачными (Таблица 3-2). При сравнении образцов остальных клинических изолятов с питательной средой («отрицательный» контроль) сопоставимая прозрачность отмечена в присутствии МПК ИЛГ с добавлением оксациллина в концентрации МПК/2. В частности, абсолютно прозрачными были бактериальные суспензии штаммов *S. aureus* 74, 83, 1, 3, 10 с добавлением ИЛГ и оксациллина в таких комбинациях, как 64 мкг/мл + 512 мкг/мл, 64 мкг/мл + 512 мкг/мл, 64 мкг/мл + 256 мкг/мл, 128 мкг/мл + 256 мкг/мл соответственно. Во всех остальных опытных пробах наблюдался интенсивный рост бактерий, сопоставимый с мутностью бактериальной суспензии («положительный» контроль).

Таблица 3-2. Минимальные подавляющие концентрации изоликвиритигенина, оксациллина и их комбинаций в отношении штаммов *Staphylococcus aureus*, мкг/мл.

Штамм <i>S. aureus</i>	МПК ИЛГ	МПК оксациллина	МПК комбинации «ИЛГ + оксациллин»
ATCC 25923	64	0,25	32+0,125
ATCC 29213	128	0,5	64+0,25
ATCC 4330	128	16	64+8
74	64	>1024	64+512
83	64	>1024	64+512

Штамм <i>S. aureus</i>	МПК ИЛГ	МПК оксациллина	МПК комбинации «ИЛГ + оксациллин»
1	64	>512	64+256
6	64	>512	64+512
10	128	512	128+256
77	64	512	<1+256

Прямая антибактериальная активность ИЛГ в комбинации с ванкомицином. Для изучения антибактериальной активности комбинации ИЛГ с антистафилококковым (анти-MRSA) антибиотиком - ванкомицином использовали в концентрациях \leq МПК: ИЛГ - в диапазоне 0,1 – 128 мкг/мл, ванкомицин – 0,25-2 мкг/мл.

Выявлено, что через 24 ч инкубации в образцах *S. aureus* ATCC 25923 с ИЛГ в концентрации 32 мкг/мл и ванкомицином 0,5 мкг/мл, *S. aureus* ATCC 29213 с добавлением ИЛГ в концентрации 16 мкг/мл и ванкомицина в концентрации 0,5 мкг/мл, *S. aureus* ATCC 4330 в присутствии ИЛГ (64 мкг/мл) и ванкомицина (0,25 мкг/мл), а также таких клинических изолятов, как *S. aureus* 77 с добавлением ИЛГ в концентрации 32 мкг/мл и ванкомицина 1 мкг/мл, *S. aureus* 10 в присутствии ИЛГ (0,1 мкг/мл) и ванкомицина (1 мкг/мл), *S. aureus* 6 с добавлением ИЛГ в концентрации 16 мкг/мл и ванкомицина 0,5 мкг/мл были полностью прозрачными аналогично питательной среде («отрицательный» контроль) (Таблица 3-3).

Таблица 3-3. Минимальные подавляющие концентрации изоликвиритигенина, ванкомицина и их комбинаций в отношении штаммов *Staphylococcus aureus*, мкг/мл.

Штамм <i>S. aureus</i>	МПК ИЛГ	МПК ванкомицина	МПК комбинации «ИЛГ + ванкомицин»
ATCC 25923	64	>0,5	32+0,5
ATCC 29213	128	>0,5	16+0,5
ATCC 4330	128	>0,25	64+0,25
74	64	1	64+0,5
83	64	1	64+0,5
1	64	>1	64+0,5

Штамм <i>S. aureus</i>	МПК ИЛГ	МПК ванкомицина	МПК комбинации «ИЛГ + ванкомицин»
6	64	1	16+0,5
10	128	2	0,1+1
77	64	2	32+1

В проходящем свете опытные пробы таких клинических изолятов, как *S. aureus* 74, *S. aureus* 83 и *S. aureus* 1, с добавлением комбинации ИЛГ (64 мкг/мл) с ванкомицином (0,5 мкг/мл) были прозрачными идентично «отрицательному» контролю. Во всех остальных опытных пробах наблюдался интенсивный рост бактерий, сопоставимый по мутности с «положительным» контролем (сuspензия бактерий без ИЛГ).

Таким образом, установлено, что:

- МПК ИЛГ в отношении исследуемых коллекционных штаммов (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330) и клинических изолятов (*S. aureus* 74, *S. aureus* 83, *S. aureus* 1, *S. aureus* 6, *S. aureus* 10, *S. aureus* 77) располагаются в диапазоне концентраций 64-128 мкг/мл;
- ИЛГ дозозависимо ингибирует суспензионный рост *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, *S. aureus* 10 (МПК 128 мкг/мл) и *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 74, *S. aureus* 83, *S. aureus* 1, *S. aureus* 6, *S. aureus* 77 (МПК 64 мкг/мл);
- при добавлении ИЛГ в комбинации с оксациллином в концентрациях ниже МПК наблюдалось подавление роста штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, а при добавлении ИЛГ с ванкомицином - штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, *S. aureus* 6, *S. aureus* 10, *S. aureus* 77.

3.1.2. Влияние изоликвиритигенина и его комбинаций с антибиотиками на формирование бактериальных биопленок *S. aureus*

Антибиопленочная активность ИЛГ. Изучение влияния ИЛГ на формирование бактериальных биопленок *S. aureus* на пластиковой поверхности

планшета для культур клеток проводили с использованием МТТ-теста. Для этого после культивирования бактериального штамма удаляли содержимое лунок и тщательно промывали их ФСБ, а затем добавляли МТТ. Способность к адгезии к пластиковой поверхности оценивали, измеряя оптическую плотность образцов после растворения формазана в ДМСО.

Предварительно была проанализирована способность образовывать биопленки изучаемыми штаммами *S. aureus* в динамике за период времени 24-72 ч. Установлено, что уже через 24 ч у всех исследованных штаммов наблюдалось формирование бактериальной биопленки на поверхности лунок планшета (Рисунки 3-2 и 3-3). Однако динамика формирования биопленки и, соответственно, значений оптической плотности различались. Так, у штаммов *S. aureus ATCC 29213*, *S. aureus 83* максимальные значения оптической плотности наблюдались через 24 ч, а через 48-72 ч эти показатели уменьшались. Другие штаммы характеризовались меньшей скоростью формирования биопленок в аналогичных условиях: у штаммов *S. aureus ATCC 25923*, *S. aureus 74* и *S. aureus 10* пиковые значения оптической плотности образцов наблюдались через 48 ч, у штаммов *S. aureus ATCC 4330*, *S. aureus 6*, *S. aureus 77* – через 72 ч.

Таким образом, у всех исследуемых штаммов в течение 24 ч происходил процесс формирования бактериальных биопленок. Эта временная точка явила оптимальным сроком для дальнейшей оценки антибиопленочной активности тестируемых соединений.

На Рисунке 3-3 показаны фотографии планшетов со сформированными биопленками различных штаммов *S. aureus*. Кроме того, в некоторые лунки был добавлен ИЛГ в концентрации 128 мкг/мл (МПК или 2 МПК для исследуемых штаммов *S. aureus*). Как видно на фотографиях, если через 24 ч в присутствии ИЛГ не наблюдалось видимого бактериального роста ни одного из штаммов, то через 48-72 ч картина для большинства штаммов менялась. Спустя 72 ч оптическая плотность образцов таких штаммов, как *S. aureus 1*, *S. aureus 6*, *S. aureus 77*, *S. aureus 83*, достоверно не отличалась от значений питательной среды («отрицательный» контроль).

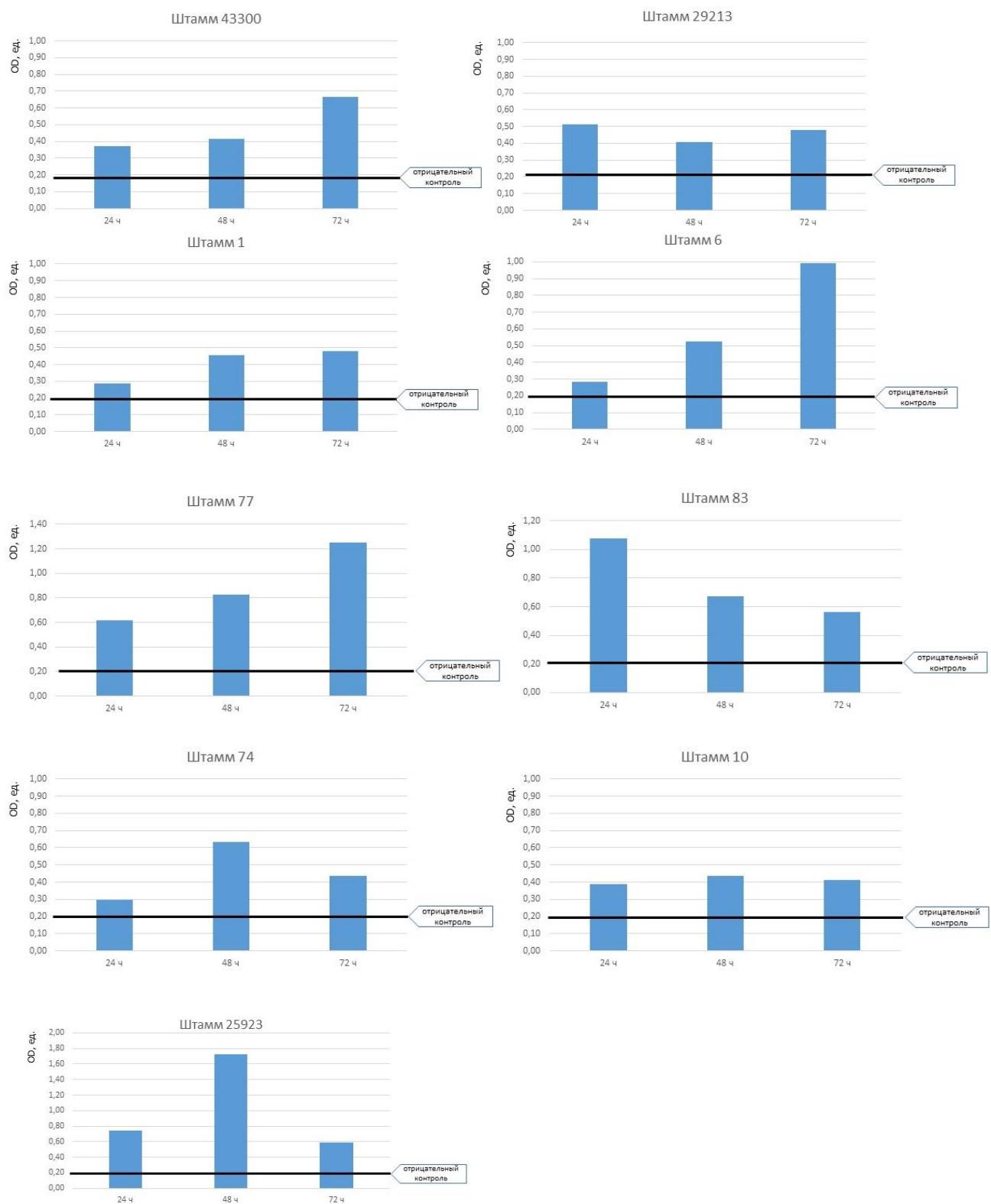
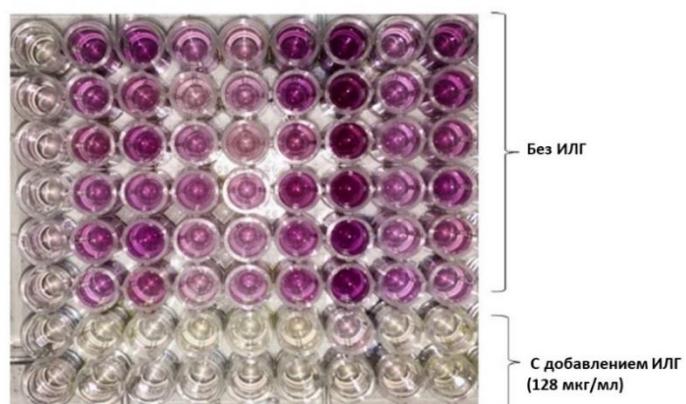


Рисунок 3-2. Динамика оптической плотности образцов в 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид-тесте образования бактериальных биопленок различных штаммов *Staphylococcus aureus*.

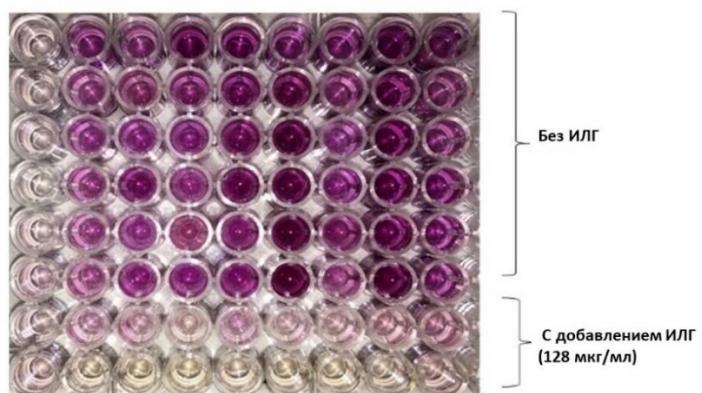
МТТ-тест, 24 ч

К- 43300 29213 1 6 77 83 74 10



МТТ-тест, 48 ч

К- 43300 29213 1 6 77 83 74 10



МТТ-тест, 72 ч

К- 43300 29213 1 6 77 83 74 10

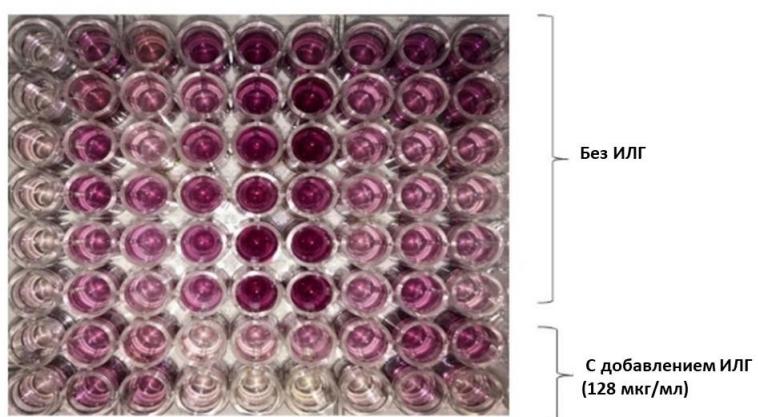


Рисунок 3-3. Типичные фотографии планшетов в 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенил-тетразолиум бромид -тесте образования бактериальных биопленок различными штаммами 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенил-тетразолиум бромид *aureus* с добавлением изоликвиритигенина (128 мкг/мл).

В образцах с ИЛГ в концентрации 128 мкг/мл у таких штаммов, как *S. aureus* ATCC 4330, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 74, *S. aureus* 10, через 24 ч и 48 ч инкубации оптическая плотность образцов также достоверно не отличалась от значений «отрицательного» контроля, а через 72 ч в данных образцах наблюдалось увеличение данного показателя (Рисунок 3-3).

В отношении *S. aureus* ATCC 25923 установлено, что ИЛГ дозозависимо снижает способность данного штамма к адгезии к пластику (Рисунок 3-4). Удаление бактериальной суспензии с многократным промыванием лунок культурального планшета после 24 ч инкубации показало, что оптическая плотность смыва с поверхности пластика в контрольных образцах была значительно выше, чем в лунках с ИЛГ: $0,8 \pm 0,1$ Ед vs. $0,4 \pm 0,0$ Ед (МПК, $p < 0,05$), $0,8 \pm 0,1$ Ед vs. $0,5 \pm 0,1$ Ед (МПК/2, $p < 0,05$), $0,8 \pm 0,1$ Ед vs. $0,5 \pm 0,2$ Ед (МПК/4, $p < 0,05$), $0,8 \pm 0,1$ Ед vs. $0,5 \pm 0,1$ Ед (МПК/8, $p < 0,05$). Значение OD при 492 нм в лунках с ИЛГ МПК/16 также имело тенденцию к снижению: $0,7 \pm 0,1$ Ед ($p > 0,05$).

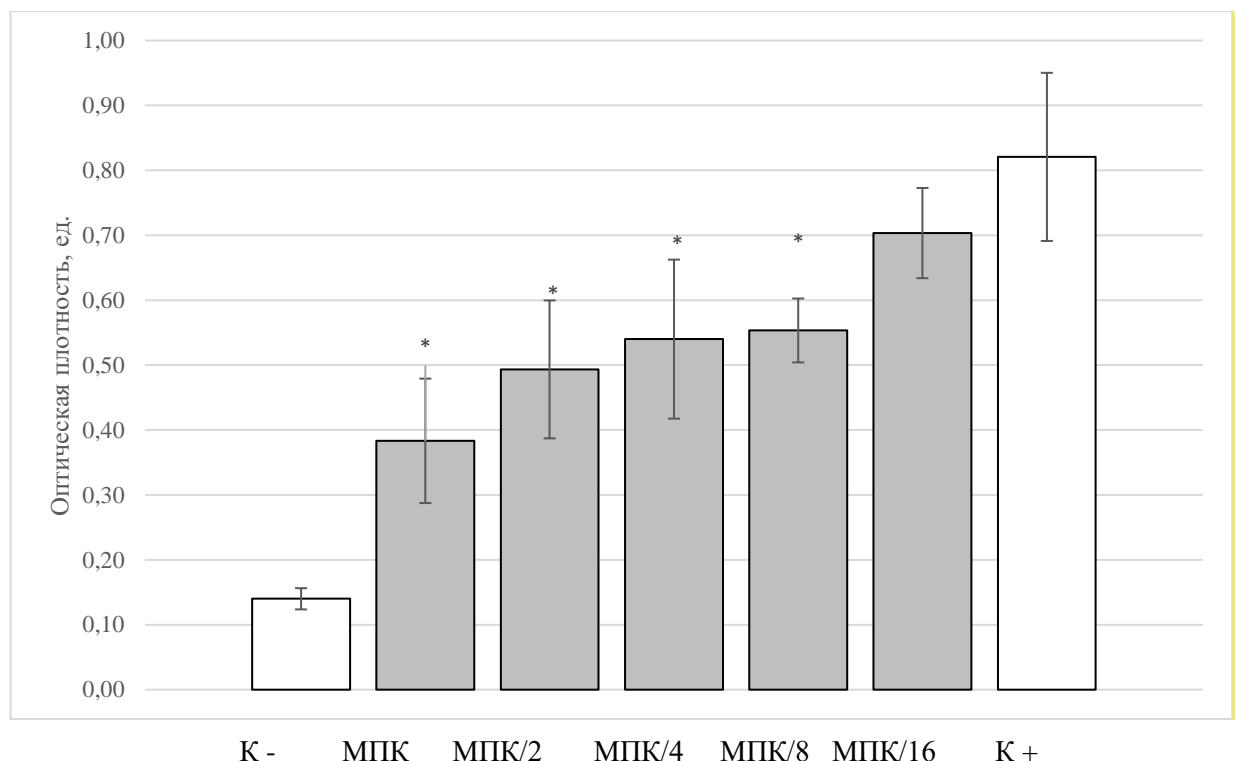


Рисунок 3-4. Влияние изоликвиритигенина на формирование биопленки *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Примечание: «К-» - «отрицательный» контроль; «К+» - «положительный» контроль; * - достоверные изменения при $p < 0,05$.

С помощью атомно-силовой микроскопии были визуализированы бактериальные биопленки штамма *S. aureus* ATCC 25923 на пластиковой поверхности и их формирование в присутствии ИЛГ. Обнаружено, что количество бактерий штамма в поле зрения в образцах с МПК ИЛГ ($8,0 \pm 2,0$ бактерий в поле зрения, 300x, $p < 0,05$), МПК/2 ($30,0 \pm 7,0$ бактерий в поле зрения, 300x, $p < 0,05$) было меньше, чем в контрольных образцах, имевших массивные бактериальные конгломераты ($83,0 \pm 13,0$ бактерий в поле зрения, 300x) (Рисунок 3-5).

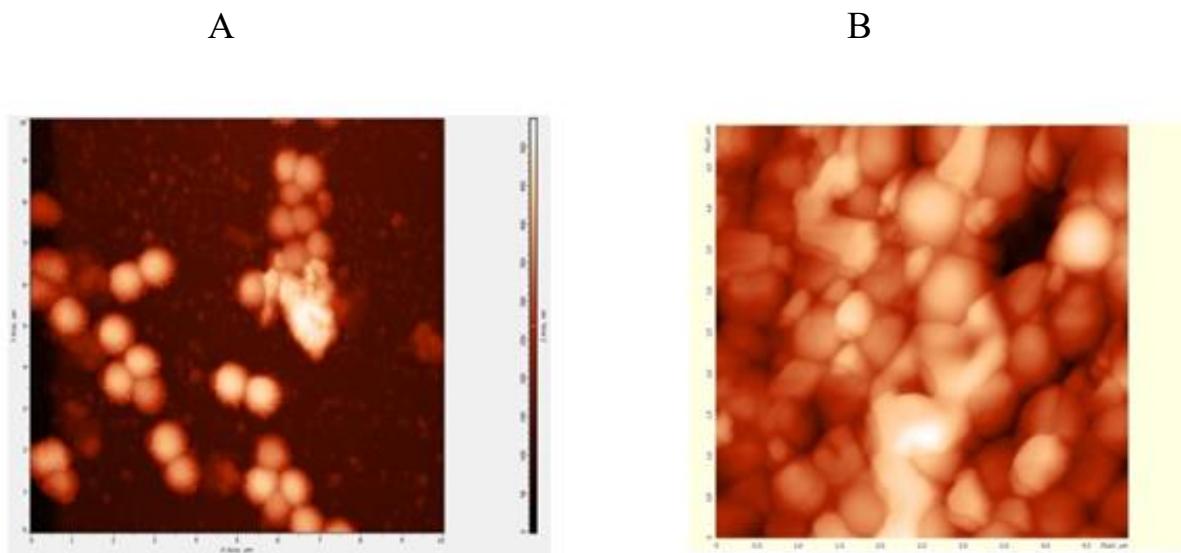


Рисунок 3-5. Подавление формирования бактериальной биопленки *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 в присутствии изоликвиритигенина.

Примечание: А – изоликвиритигенин, 32 мкг/мл (опыт); В – контроль.

Влияние комбинации ИЛГ с оксациллином на формирование бактериальных биопленок. При изучении влияния комбинации ИЛГ с оксациллином на формирование бактериальных биопленок штаммов *S. aureus* с использованием МТТ-теста было установлено, что в образцах со штаммом *S. aureus* 1 оптическая плотность достоверно не отличалась от значений питательной среды («отрицательный» контроль) при комбинации ИЛГ (4 мкг/мл) и оксациллина (256 мкг/мл) в концентрациях ниже, чем подавляющие образование биопленок в отдельности каждым из агентов (Таблица 3-4).

В образцах штамма *S. aureus* ATCC 25923 значения OD при 492 нм «отрицательного» контроля достоверно не отличались от значений образцов с

добавлением такой комбинации ИЛГ и оксациллина, в которой концентрация оксациллина была в 2 раза меньше подавляющей образование биопленок без добавления ИЛГ, а концентрация ИЛГ достоверно не отличалась от OD образцов без добавления оксациллина.

У таких штаммов, как *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, *S. aureus* 74, *S. aureus* 83, *S. aureus* 10, *S. aureus* 77, оптическая плотность образцов достоверно не отличалась от значений «отрицательного» контроля в таких комбинациях, где концентрация оксациллина была сопоставима с концентрацией антибиотика, подавлявшей образование биопленок без ИЛГ, а ИЛГ – превышала таковую без добавления оксациллина более, чем в 4 раза.

Таблица 3-4. Концентрации изоликвиритигенина, оксациллина и их комбинаций, подавляющие формирование бактериальных биопленок штаммов *Staphylococcus aureus*, мкг/мл.

Штамм <i>S. aureus</i>	ИЛГ, мкг/мл	Оксациллин, мкг/мл	Комбинации «ИЛГ + оксациллин», мкг/мл
ATCC 25923	64	0,0625	32+0,03125
ATCC 29213	64	0,25	>128 + 0,25
ATCC 4330	32	8	>128 + 8
74	64	512	>128 + 512
83	32	512	>128+512
1	>128	>512	4+256
6	8	512	>128+512
10	8	256	>128+256
77	128	256	>128+256

Влияние комбинации ИЛГ с ванкомицином на формирование бактериальных биопленок. При изучении влияния комбинации ИЛГ с ванкомицином на формирование бактериальных биопленок штаммов *S. aureus* с использованием МТТ-теста было установлено, что в образцах со штаммом *S. aureus*

1 оптическая плотность достоверно не отличалась от значений питательной среды («отрицательный» контроль) при комбинации ИЛГ и ванкомицина в концентрациях ниже, чем концентрации, способные подавлять образование биопленок в отдельности. В образцах со штаммом *S. aureus* ATCC 25923 значения OD при 492 нм «отрицательного» контроля достоверно не отличались от значений OD в образцах с комбинацией ИЛГ и ванкомицина, в которой концентрация ванкомицина была в 2 раза меньше подавляющей образования биопленок без ИЛГ, а концентрация ИЛГ была сопоставима с подавляющей данной процесс без добавления ванкомицина. У таких штаммов, как *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, *S. aureus* 74, *S. aureus* 83, *S. aureus* 10, *S. aureus* 77 оптическая плотность образцов не отличалась от значений «отрицательного» контроля в таких комбинациях, где концентрация ванкомицина была меньше или сопоставима с концентрацией антибиотика, подавлявшей образование биопленок без ИЛГ, а ИЛГ – превышала таковую без ванкомицина более, чем в 2 раза.

Таблица 3-5. Концентрации изоликвиритигенина, ванкомицина и их комбинаций, подавляющие формирование бактериальных биопленок штаммов *Staphylococcus aureus*, мкг/мл.

Штамм <i>S. aureus</i>	ИЛГ, мкг/мл	Ванкомицин, мкг/мл	Комбинация «ИЛГ + ванкомицин», мкг/мл
ATCC 25923	32	1	32+0,125
ATCC 29213	32	1	>128+0,5
ATCC 4330	16	0,5	>128+0,25
74	32	0,5	>128+0,5
83	16	1	>128+0,5
1	>128	>1	32+0,5
6	4	0,5	>128+0,5
10	4	2	>128+1
77	64	2	>128+1

Таким образом, комбинация «ИЛГ + оксациллин» в концентрациях меньших, чем МПК, подавляет образование бактериальных биопленок таких штаммов, как *S. aureus* ATCC 25923 и *S. aureus* 1, а комбинация «ИЛГ + ванкомицин» - у штамма *S. aureus* 1.

3.2. Иммунотропные эффекты изоликвиритигенина *in vitro*

3.2.1. Влияние изоликвиритигенина на хемотаксис, поглотительную способность и продукцию активных форм кислорода фагоцитами

Влияние ИЛГ на пептон-индуцированную миграцию фагоцитов мышей.

Хемотаксис фагоцитов оценивали с помощью модели пептон-индуцированной миграции фагоцитов в брюшную полость мышей Balb/C, рассчитывая ИС – количество клеток, стимулированных внутрибрюшинной инъекцией пептона, относительно ФСБ через 24 и 72 ч после введения индуктора миграции фагоцитов.

Через 24 ч в контрольных смывах определялось $2,4 \times 10^6$ клеток/мышь (ФСБ), $3,95 \times 10^6$ клеток/мышь (пептон), а в группе, получавшей ИЛГ, определялось $4,9 \times 10^6$ клеток/мышь (Рисунок 3-6).

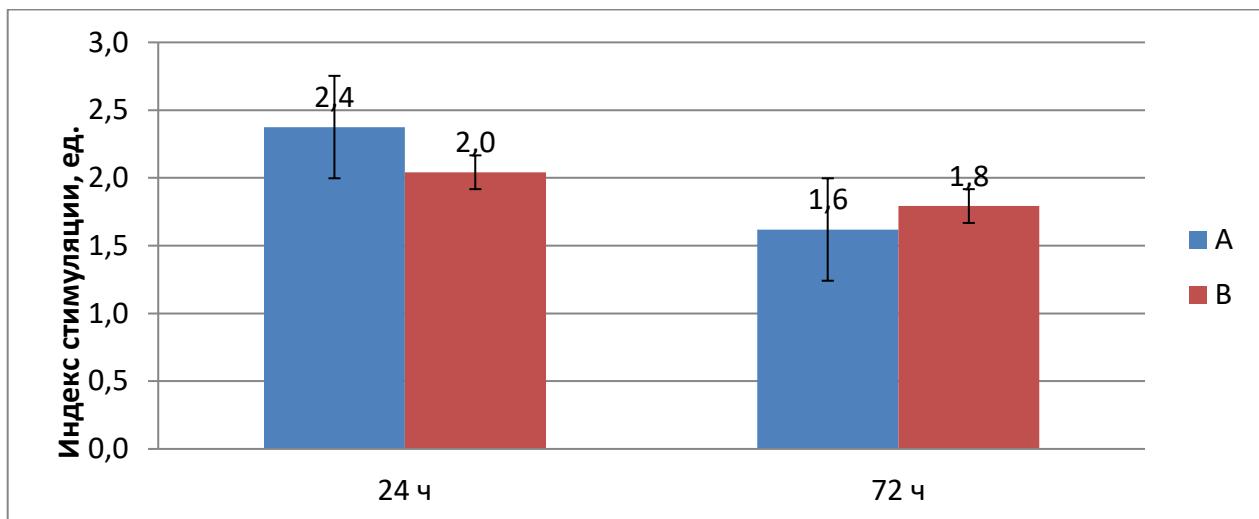


Рисунок 3-6. Влияние изоликвиритигенина на миграцию фагоцитов в брюшную полость мышей Balb/C. Примечание: А – индуктор миграции (пептон); В – изоликвиритигенин + пептон.

Индексы стимуляции у мышей, получавших ИЛГ, и у контрольных животных, стимулированных пептоном, достоверно не отличались друг от друга (Рисунок 3-6). Через 24 ч (хемотаксис преимущественно нейтрофилов) ИС в контрольной группе составлял $2,4 \pm 0,1$ Ед vs. $2,0 \pm 0,1$ Ед группы, получавшей ИЛГ ($p > 0,05$); через 72 ч (хемотаксис преимущественно макрофагов) значения индекса стимуляции характеризовались значениями $1,6 \pm 0,1$ Ед (контрольная группа) и $1,8 \pm 0,1$ Ед ($p > 0,05$) (группа, получавшая ИЛГ).

Влияние ИЛГ на поглотительную способность фагоцитов. Изучение влияния ИЛГ на поглотительную активность фагоцитов проводили цитофлуориметрическим методом, оценивая поглощение инактивированного ФИТЦ-меченого *S. aureus* ATCC 25923 нейтрофилами и моноцитами/макрофагами периферической крови человека. Было показано, что предварительная обработка фагоцитов ИЛГ *in vitro* не приводит к достоверному изменению процента фагоцитирующих нейтрофилов и моноцитов по сравнению с контролем (Рисунок 3-7). В контрольных образцах фагоцитарный индекс у нейтрофилов составил $93,9 \pm 6,0\%$, а у моноцитов – $73,9 \pm 14,1\%$. В концентрации ИЛГ 128 мкг/мл наблюдалась недостоверная тенденция к снижению фагоцитарного индекса нейтрофилов ($92,5 \pm 5,5\%$) и моноцитов ($64,1 \pm 13,7\%$).

Однако при оценке интенсивности флуоресценции показано, что в сравнении с контролем в образцах с добавлением ИЛГ в концентрации 128 мкг/мл происходит увеличение доли флуоресцирующих нейтрофилов ($184,8 \pm 44,8$ vs. $145,5 \pm 41,1$) и моноцитов ($58,5 \pm 17,2$ vs. $64,1 \pm 18,1$) (Таблица 3-6). В образцах с добавлением ИЛГ в концентрациях 16 мкг/мл и 64 мкг/мл показатели фагоцитарного индекса и интенсивность флуоресценции нейтрофилов с моноцитов достоверно не отличались от контрольных значений.

Таблица 3-6. Влияние изоликвиритигенина на показатели фагоцитарного индекса (%) и интенсивности флуоресценции (ЕД) нейтрофилов и моноцитов крови человека.

Фагоциты		Контроль	ИЛГ, мкг/мл		
			128	64	16
Нейтрофилы	%	$93,9 \pm 6,0$	$92,5 \pm 5,5$	$92,1 \pm 7,6$	$95,6 \pm 2,4$
	Ед.	$145,5 \pm 41,1$	$184,8 \pm 44,8$ *	$129,1 \pm 55,6$	$118,1 \pm 40,5$
Моноциты	%	$73,9 \pm 14,1$	$64,1 \pm 13,7$	$71,4 \pm 11,2$	$71,4 \pm 11,4$
	Ед.	$64,1 \pm 18,1$	$58,5 \pm 17,2$ *	$51,4 \pm 21,9$	$45,4 \pm 15,4$

Примечание: * - достоверные изменения при $p < 0,05$

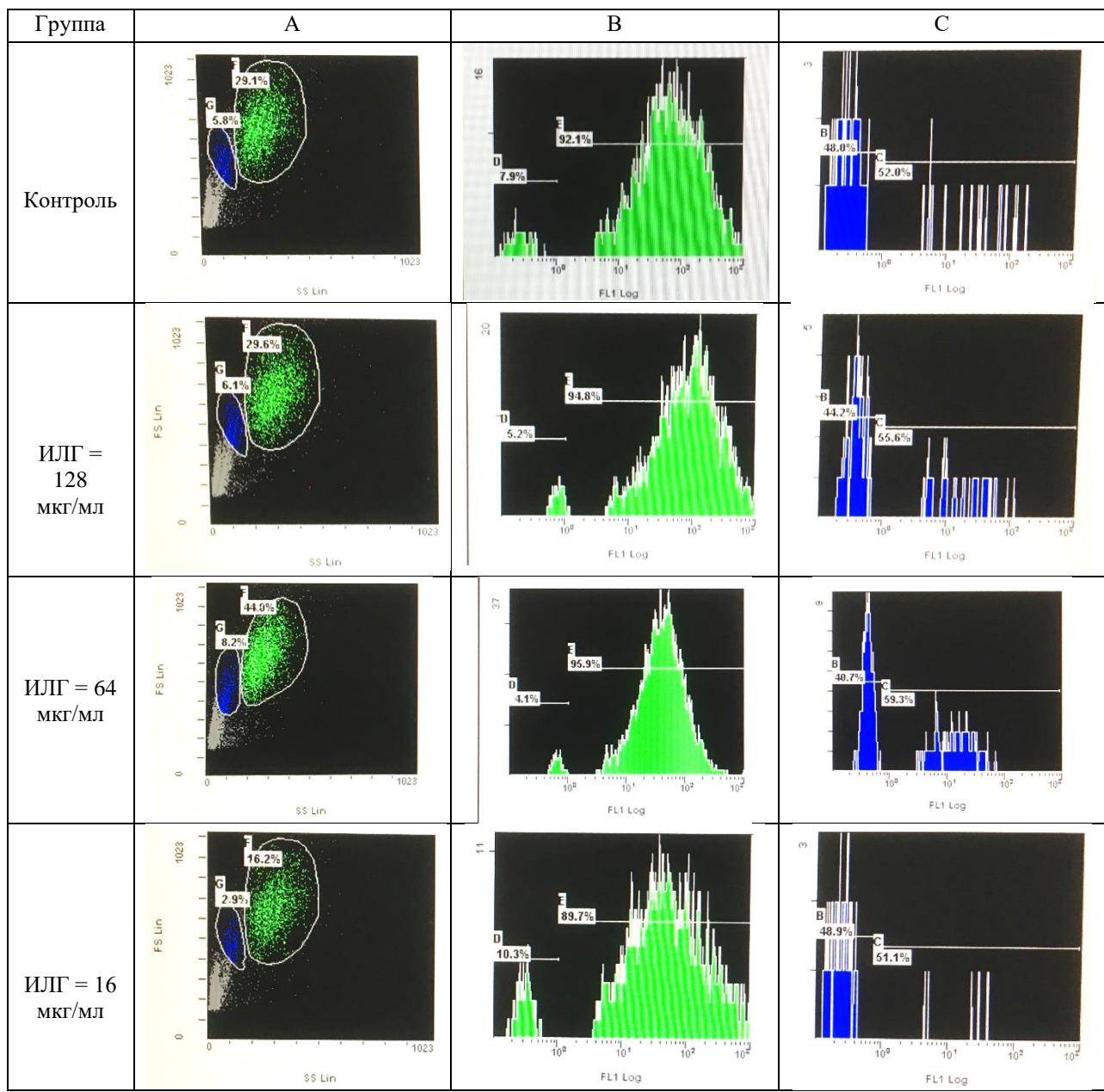


Рисунок 3-7. Распределение клеток крови по боковому светорассеянию (А) и гистограммы флуоресценции, соответствующие гейтам нейтрофилов (зеленый) и моноцитов (синий) (В, С) при цитометрической оценке поглотительной активности фагоцитов.

Влияние ИЛГ на продукцию активных форм кислорода фагоцитами.

Для изучения влияния ИЛГ на продукцию АФК использовали фагоциты периферической крови человека. Исследовали способность нейтрофилов и моноцитов продуцировать АФК в ответ на активатор протеинкиназы С – ФМА, оценивая долю флуорецирующих фагоцитов и интенсивность их флуоресценции

с использованием флуорогенного красителя ДГР123 методом проточной цитометрии.

В контрольных пробах без активации ФМА (Таблица 3-7) и в отсутствие ИЛГ доля флуоресцирующих нейтрофилов ($3,9\pm1,8\%$) и моноцитов ($3,0\pm2,0\%$) была очень низкой. По сравнению с контрольными показателями добавление ИЛГ значительно дозозависимо увеличивало долю флуоресцирующих нейтрофилов в концентрациях 128 мкг/мл ($100,0\pm0,1\%$, $p<0,05$), 64 мкг/мл ($99,6\pm0,5\%$, $p<0,05$), 16 мкг/мл ($34,7\pm8,9\%$, $p<0,05$), а концентрациях 128 мкг/мл ($86,2\pm11,7\%$, $p<0,05$), 64 мкг/мл ($47,2\pm18,7\%$, $p<0,05$) – процент флуоресцирующих моноцитов (Рисунок 3-8).

Таблица 3-7. Влияние изоликвиритигенина на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами и моноцитами крови человека.

			Контроль	ИЛГ, мкг/мл		
Нейт-рофи-лы	Активация ФМА	%		128	64	16
		Ед	11,3±3,7	15,8±3,0 *	14,8±4,2 *	14,1±5,2
	Без активации ФМА	%	3,9±1,8	100,0±0,1 *	99,6±0,5 *	34,7±8,9 *
		Ед	2,5±0,3	6,6±1,6 *	3,8±0,2 *	2,1±0,2
	Активация ФМА	%	44,5±27,2	97,8±1,8 *	88,1±7,8 *	62,7±17,7
		Ед	3,4±0,7	6,0±1,3 *	4,6±1,1*	4,0±1,0
	Без активации ФМА	%	3,0±2,0	86,2±11,7 *	47,2±18,7 *	4,6±2,4
		Ед	2,3±0,5	3,0±0,15 *	2,3±0,2	2,4±0,7

Примечание: Ед – единицы интенсивности флуоресценции; * - достоверные изменения при $p < 0,05$.

В то же время интенсивность флуоресценции нейтрофилов достоверно отличалась от показателей контроля ($2,5\pm0,3$) в присутствии ИЛГ 128 мкг/мл

($6,6 \pm 1,6$, $p < 0,05$), 64 мкг/мл ($3,8 \pm 0,2$, $p < 0,05$), а моноцитов – при 128 мкг/мл ($3,0 \pm 0,15$, $p < 0,05$).

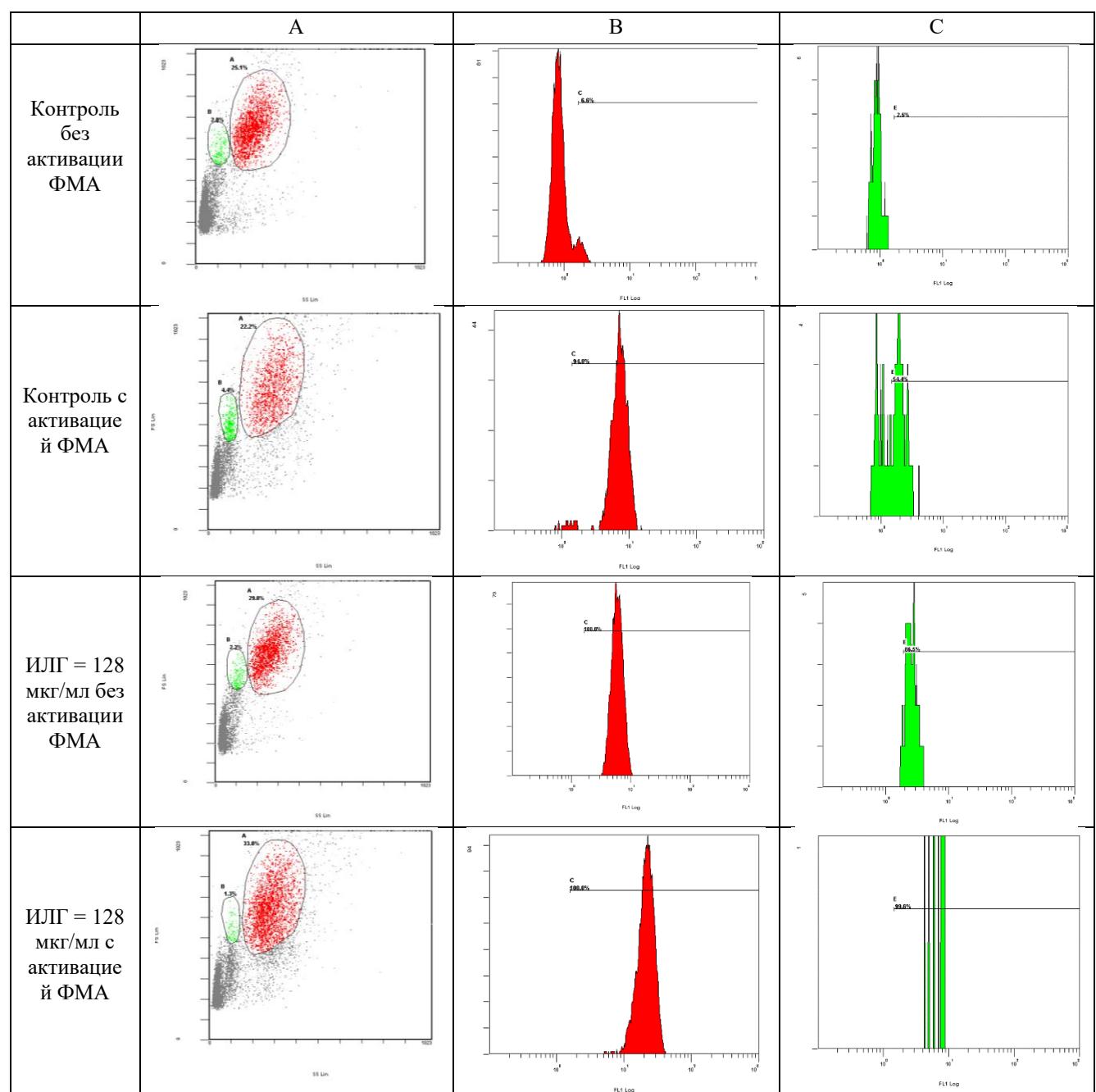


Рисунок 3-8. Распределение клеток крови по боковому светорассеянию (А) и гистограммы флуоресценции, соответствующие гейтам нейтрофилов (красный) и моноцитов (зеленый) (В, С) при цитометрической оценке продукции активных форм кислорода форбол-12-миристат-13-ацетат -активированными фагоцитами.

Также было изучено влияние ИЛГ на способность человеческих фагоцитов продуцировать АФК в ответ на ФМА. В контрольных образцах с добавлением

ФМА количество нейтрофилов, продуцировавших АФК, составило $93,3 \pm 14,9\%$, моноцитов - $44,5 \pm 27,2\%$ (Таблица 3-7). В присутствии ИЛГ в концентрациях 128 мкг/мл, 64 мкг/мл и 16 мкг/мл наблюдалась незначимая тенденция к дозозависимому увеличению доли флуоресцирующих нейтрофилов: $100,0 \pm 0,1\%$ ($p=0,07$), $99,9 \pm 0,1\%$ ($p=0,07$) и $99,5 \pm 0,4\%$ ($p=0,08$) соответственно (Рисунок 3-8). По сравнению с контрольными образцами ($11,3 \pm 3,7$) в присутствии ИЛГ в концентрациях 128 мкг/мл ($15,8 \pm 3,0$, $p<0,05$) и 64 мкг/мл ($14,8 \pm 4,2$, $p<0,05$) отмечено достоверное увеличение интенсивности флуоресценции, а в концентрации 16 мкг/мл – наблюдалась лишь тенденция к таковому ($14,1 \pm 5,2$, $p=0,09$).

При оценке функций моноцитов в присутствии ИЛГ в концентрациях 128 мкг/мл ($97,8 \pm 1,8\%$, $p<0,05$), 64 мкг/мл ($88,1 \pm 7,8\%$, $p<0,05$) наблюдалось дозозависимое увеличение количества флуоресцирующих клеток по сравнению с контрольными значениями ($44,5 \pm 27,2$). Данные по повышению доли флуоресцирующих моноцитов при экспозиции с ИЛГ в концентрациях 64-128 мкг/мл были сопоставимы с дозозависимым увеличением степени их флуоресценции (Таблица 3-7).

Таким образом, ИЛГ:

- не оказывает достоверного влияния на пептон-индуцированную миграцию фагоцитов в брюшную полость мышей Balb/c как через 24, так и через 72 ч после введения индуктора миграции;
- не ингибирует поглотительную активность фагоцитов (нейтрофилов и моноцитов) периферической крови человека в отношении ФИТЦ-меченого *S. aureus ATCC 25923*;
- дозозависимо увеличивает продукцию АФК как ФМА-активированными, так и неактивированными нейтрофилами и моноцитами в диапазоне концентраций 16-128 мкг/мл.

3.2.2. Влияние изоликвиритигенина на активированные спленоциты и секрецию ими цитокинов *in vitro*

Оценка влияния ИЛГ на количество жизнеспособных спленоцитов проводилась на основе МТТ-теста с применением Т-клеточного митогена КонА с добавлением ИЛГ через 24 ч после активации спленоцитов.

В результате установлено, что спустя 24 ч инкубации с ИЛГ в концентрациях 4-64 мкг/мл и Т-клеточным митогеном – КонА наблюдается дозозависимое подавление числа жизнеспособных лимфоцитов (Рисунок 3-9).

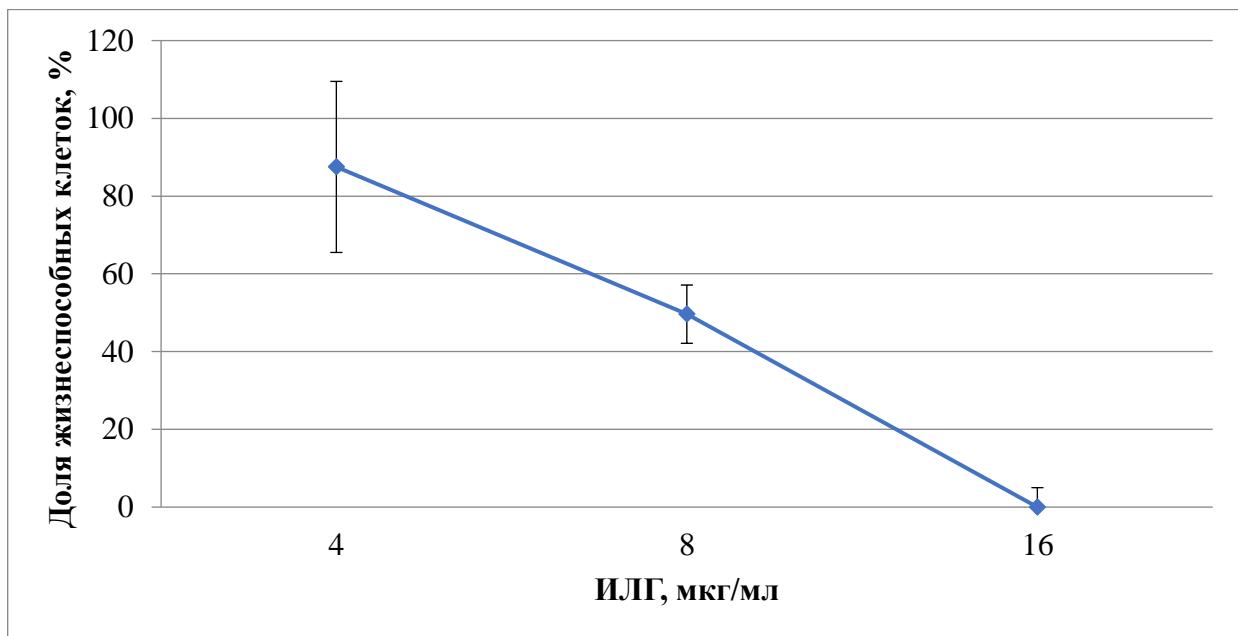


Рисунок 3-9. Влияние изоликвиритигенина на конканавалин А-стимулированные спленоциты мышей Balb/C.

Так, ИЛГ в концентрациях 16-64 мкг/мл практически полностью подавлял количество жизнеспособных клеток. В присутствии 8 мкг/мл ИЛГ она снижалась более чем в два раза ($50,0\pm7,5\%$, $p<0,05$) в сравнении с контролем и имела тенденцию к снижению при экспозиции с ИЛГ в концентрации 4 мкг/мл ($88,0\pm22,0\%$).

При оценке влияния ИЛГ на выработку цитокинов мышевыми активированными спленоцитами в образцы добавляли ИЛГ одновременно с Т-

клеточным митогеном (КонА) и анализировали их с помощью магнитной панели *MILLIPLEX MAP*. Установлено, что в образцах с ИЛГ, даже в концентрации 4 мкг/мл (Таблица 3-8), через 24-48 ч инкубации уровень практически всех исследованных цитокинов был достоверно ниже контрольных образцов.

При сравнении с контрольными образцами таких цитокинов, как IL-2 (2020,0±115,7 пг/мл), IFN γ (6253,0±157 пг/мл), IL-6 (2249,0±132,0 пг/мл), IL-22 (1276,0±71,2 пг/мл), IL-17A (724,5±76,9 пг/мл), IL-17F (968,4±107,4 пг/мл), в образцах с добавлением ИЛГ наблюдалось выраженное подавление секреции данных цитокинов (Таблица 3-8). Аналогичные достоверные отличия выявлены между контрольными и опытными образцами TNFa, IL-10.

Таблица 3-8. Влияние изоликвиритигенина на секрецию цитокинов конканавалин А-стимулированными спленоцитами мышей Balb/C *in vitro*.

Наименование цитокинов	Концентрация цитокинов, пг/мл	
	Контроль	ИЛГ
IL-2	2020,0±115,7	<4,0
IL-12p70	23,8±2,6	<7,9
IFN γ	6253,0±157	<4,5
TNF α	213,2±16,1	25,0±0,2 *
IL-6	2249,0±132,0	27,6±1,4 *
IL-22	1276,0±71,2	13,2±0,4 *
IL-23	223,3±1,4	<123,7
IL-17A	724,5±76,9	<20,4
IL-17F	968,4±107,4	<6,2
IL-17E/IL-25	527,6±25,4	<377,5
GM-CSF	310,8±32,6	<22,5
MIP-3A/CCl20	355,8±3,1	<35,6
IL-10	424,3±24,3	32,8±0,1 *

Примечание: * - достоверные изменения при $p < 0,05$.

Таким образом, ИЛГ дозозависимо подавляет пролиферацию КонА-стимулированных спленоцитов мышей и секрецию ими цитокинов.

3.3. Эффекты изоликвиритигенина в модели генерализованной стафилококковой инфекции

3.3.1. Влияние изоликвиритигенина на выживаемость мышей при генерализованной стафилококковой инфекции *in vivo*

Генерализованную стафилококковую инфекцию у мышей воспроизводили внутрибрюшинным введением больших концентраций бактериальной суспензии *S. aureus* ATCC 25923 в дозах 5×10^8 КОЕ/мышь, 10^9 КОЕ/мышь, $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мышь. Заражение животных в дозе 5×10^8 КОЕ/мышь не приводило к летальным исходам в контрольной группе, хотя у животных наблюдались такие симптомы, как снижение активности, аппетита, взъерошенность шерсти, диарея. Следует отметить, что выживаемость здоровых животных, которым вводили трехкратно внутрибрюшенно 5% раствор ДМСО (растворитель ИЛГ), составила 100 %.

Влияние предварительного введения ИЛГ на развитие бактериемии при генерализованной стафилококковой инфекции. Установлено, что при внутрибрюшинном введении бактериальной суспензии *S. aureus* ATCC 25923 в дозе 5×10^8 КОЕ/мышь наблюдается развитие бактериемии.

Для экспериментальных целей кровь зараженных мышей (5×10^8 КОЕ/мышь) засевали на кровяной агар. Через сутки после заражения у контрольных мышей в секторе I наблюдался рост большого количества колоний (>150), а в секторе II – отмечен рост 6 колоний, что соответствует 10^5 КОЕ/мл. В образцах посевов крови мышей, получавших ИЛГ роста колоний, не наблюдали. На 4-5 сутки инфекции в группе, получавшей ИЛГ, в секторе I обнаружен рост 1 колонии, что свидетельствует об отсутствии выраженного бактериального роста в образцах крови ($<10^3$ КОЕ/мл) (Рисунок 3-10). В других образцах контрольных и опытных групп роста не наблюдалось.

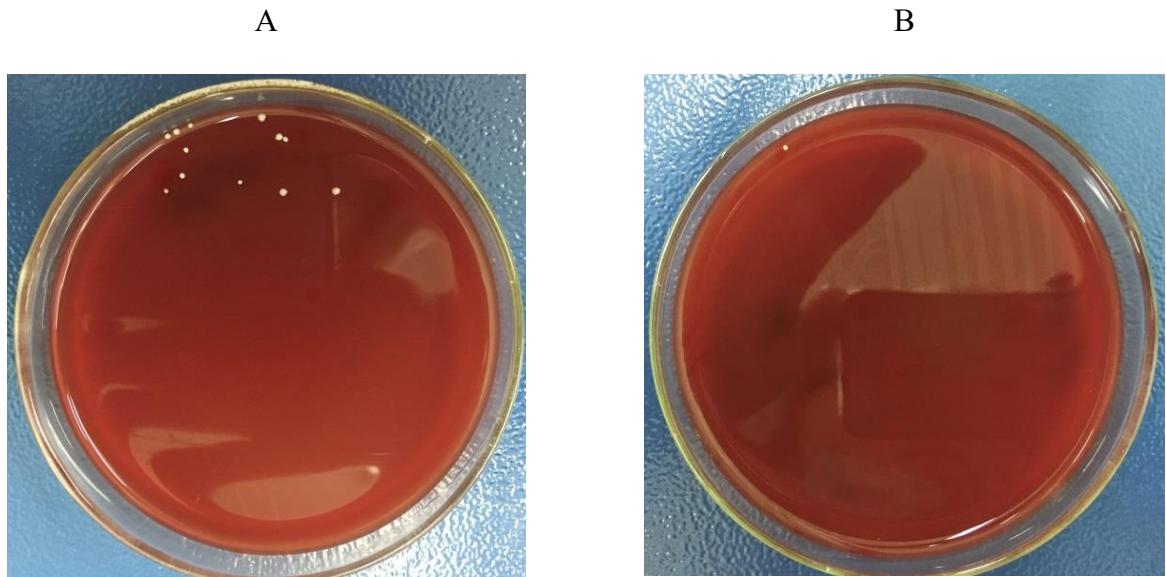


Рисунок 3-10. Рост бактерий в кровяном агаре при посеве крови мышей Balb / C (самцы), инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (5×10^8 КОЕ / мышь).

Примечание: А - предварительное трехкратное введение диметилсульфоксида, 5×10^8 КОЕ/мышь, через 1 день после инфицирования; В - предварительные трехкратные инъекции изоликвиритигенина, 5×10^8 КОЕ/мышь, через 5 дней после инфицирования.

Влияние предварительного введения ИЛГ на выживаемость мышей при генерализованной стафилококковой инфекции. Установлено, что при заражении 10^9 КОЕ/мышь в обеих экспериментальных группах на второй день эксперимента отмечалось начало гибели животных. В контрольной группе смертность нарастала более динамично, и к 4 дню выживаемость составила лишь 17 % (Рисунок 3-11). В группе, получавшей предварительные инъекции ИЛГ в дозе 30 мг/кг, выживаемость была достоверно выше и на 7 день эксперимента составила 67 % ($p < 0,05$). Через 3 дня после заражения *S. aureus* мыши, получавшие ИЛГ, стали более активными по сравнению с контрольной группой. Вес выживших мышей, получавших ИЛГ, составлял $22,0 \pm 3,0$ г по сравнению с $19,0 \pm 3,0$ г у выживших контрольных мышей.

Внутрибрюшинное введение $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мышь вызывало гибель 100% животных контрольной группы в течение 48-72 ч. Предварительное введение ИЛГ

значимо снижало смертность: через 2 дня погибало 62,5% мышей, к 24 дню выживало 12,5% мышей (Рисунок 3-12).

При аутопсии установлено (Рисунок 3-13), что через 48-72 ч после заражения у мышей, получавших ИЛГ, были менее выраженные инъекции брыжеечных сосудов и вздутие петель кишечника. Через 14 дней в группе ИЛГ наблюдался интенсивный спаечный процесс, а через 30 дней отмечались забрюшинные абсцессы с плотной капсулой и спайками.

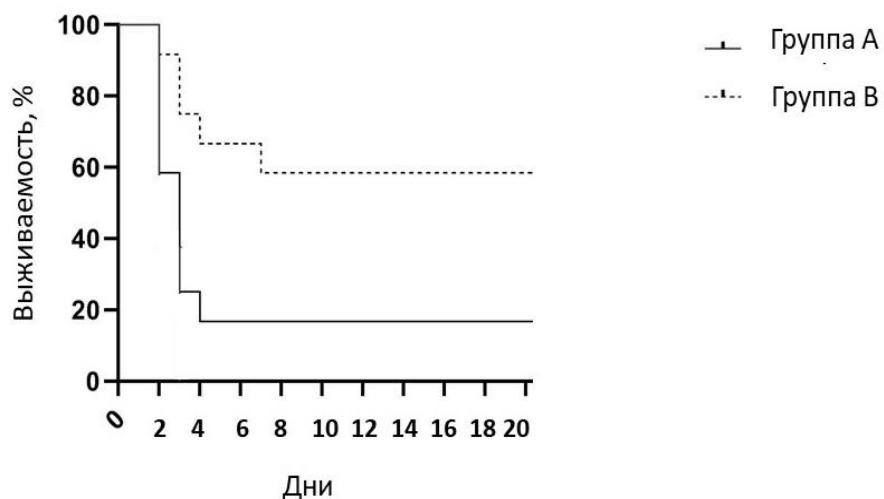


Рисунок 3-11. Выживаемость мышей Balb/C, зараженных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Примечание: группа А – контроль, 10^9 КОЕ/мышь; группа В – предварительное введение изоликвиритигенина (30 мг/кг), 10^9 КОЕ/мышь.

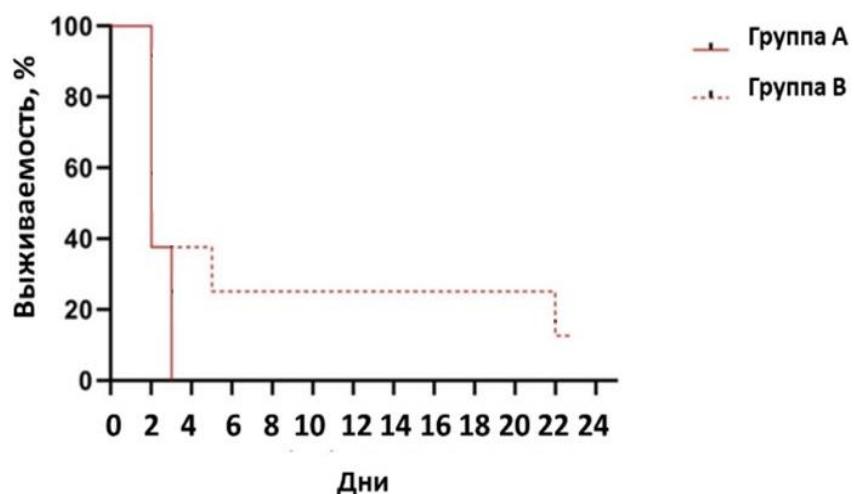
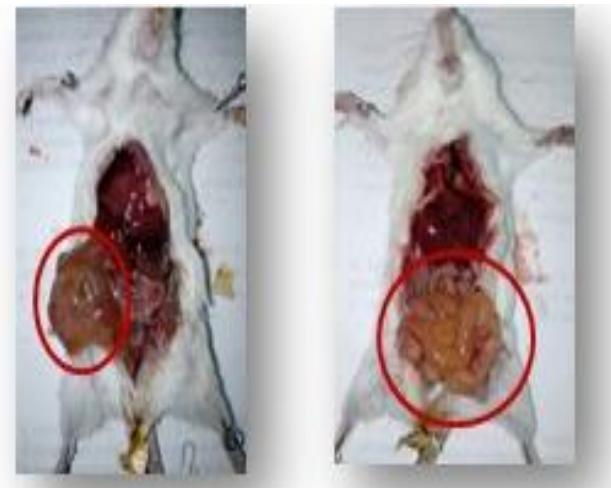


Рисунок 3-12. Выживаемость мышей Balb/C (самцы), зараженных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Примечание: группа А - контроль, $1,5 \times 10^9$ КОЕ /мышь; группа В – предварительное введение изоликвиритигенина (30 мг/кг), $1,5 \times 10^9$ КОЕ /мышь.

Павшие в первые дни опыта



Контроль

Выраженная инъекция сосудов,
вздутие петель кишечника

Павшие на 15 день опыта



Контроль

Истончение брыжейки, стенок кишечника,
межкишечные спайки

Выжившие, вскрытие через 30 суток



ИЛГ

Забрюшинные абсцессы, плотные спайки,
спленомегалия

Рисунок 3-13. Морфологические изменения органов брюшной полости животных при генерализованной стафилококковой инфекции на фоне предварительного введения изоликвиритигенина.

Влияние ИЛГ и его комбинаций с оксациллином на выживаемость мышей после внутрибрюшинного заражения *S. aureus*. Для воспроизведения модели генерализованной стафилококковой инфекции у самцов Balb/C использовали такую дозу *S. aureus* ATCC 25923, которая способствовала развитию септического шока, приводя к гибели большинства особей в течение 24-48 ч после заражения. ИЛГ и антибиотик сравнения (оксациллин) вводили в течение 6-8 ч после внутрибрюшинного введения бактериальной суспензии. Учитывая, что при изучении прямой и антибиопленочной активностей комбинации «ИЛГ+оксациллин» *in vitro* отмечено усиление антистафилококкового эффекта в отношении некоторых штаммов *S. aureus*, в качестве препарата сравнения для оценки влияния ИЛГ на выживаемость мышей после внутрибрюшинного заражения мышей *S. aureus* использовали оксациллин.

Установлено, что при внутрибрюшинном заражении дозой $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мышь в первые 3 суток во всех опытных и контрольных группах отмечалась массивная гибель животных (Рисунок 3-13). Выживаемость в контрольных группах, получавших ФСБ или ДМСО, достоверно не отличалась друг от друга ($p=0,3$). Динамика гибели животных, получавших ИЛГ, не имела достоверных отличий от контрольной группы ($p=0,3$), и к 3 дню эксперимента все животные, получавшие ИЛГ, погибли.

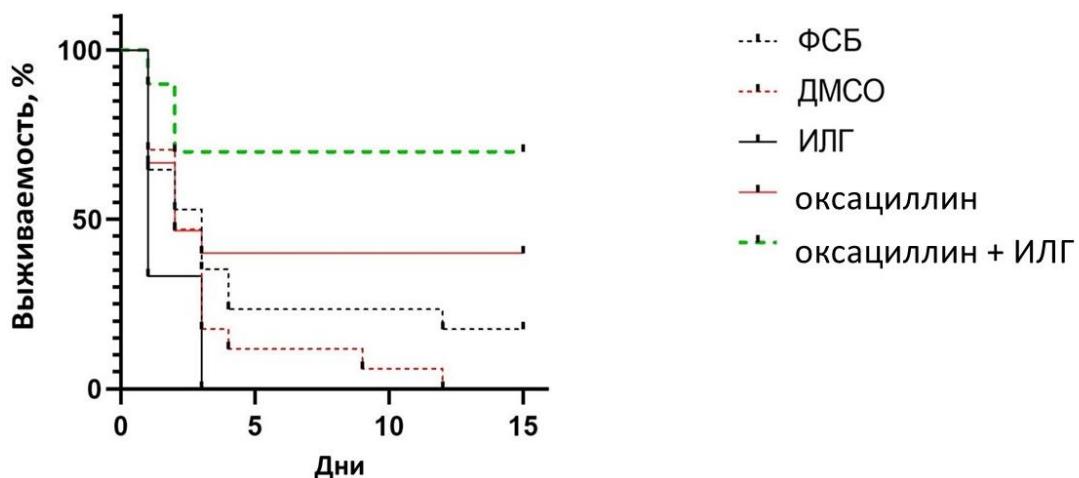


Рисунок 3-13. Выживаемость мышей Balb/C, зараженных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, на фоне введения изоликвиритигенина в комбинации с оксациллином.

Динамика гибели животных, получавших оксациллин в дозе 400 мг/кг/сут, также не имела достоверных отличий от контрольной группы ($p=0,4$). Так, к концу первого дня выживаемость в опытной группе составила 67%, второго дня – 47%, после чего данный показатель составлял 40% до конца периода наблюдения.

В опытной группе, получавшей ИЛГ в комбинации с оксациллином отличия от группы, получавшей оксациллин, были недостоверными ($p=0,14$): в первый день эксперимента выживаемость составила 90%, а со второго дня в течение всего периода эксперимента данный показатель составлял 70%. Однако на 2 день после заражения мыши, получавшие оксациллин в комбинации с ИЛГ, стали более активными в сравнении с животными, получавшими только ИЛГ, у них появился аппетит и снизилась выраженность диареи.

Таким образом, при развитии генерализованной инфекции предварительное внутрибрюшинное введение ИЛГ в дозе 30 мг/кг подавляет развитие бактериемии самцов Balb/C, а также достоверно увеличивает их выживаемость в сравнении с контрольной группой. При внутрибрюшинном введении ИЛГ, а также его комбинации с оксациллином после развития генерализованной стафилококковой инфекции мышей не выявлено достоверных отличий от контрольных групп.

3.3.2. Влияние изоликвиритигенина на секрецию цитокинов клетками лимфатических узлов и селезенки при генерализованной стафилококковой инфекции у мышей

Влияние предварительного введения ИЛГ на динамику числа мононуклеарных клеток селезенки и паховых лимфатических узлов мышей при генерализованной стафилококковой инфекции. Для изучения изменения количества лимфоцитов в лимфоидных органах на фоне генерализованной стафилококковой инфекции, после внутрибрюшинного

инфицирования сублетальной концентрацией бактерий (5×10^8 КОЕ/мышь) в течение 2 недель ежедневно эксплантировали селезенку и паховые лимфатические узлы и подсчитывали абсолютное количество мононуклеаров в этих органах (Рисунок 3-14).

В 1-е сутки после заражения количество клеток в паховых лимфатических узлах у мышей, получавших ИЛГ, ($0,4 \pm 0,2 \times 10^6$ клеток/мышь) и контрольных мышей ($0,9 \pm 0,4 \times 10^6$ клеток/мышь) уменьшилось по сравнению с интактными мышами ($2,3 \pm 1,1 \times 10^6$ клеток/мышь), и только после 3-го дня оно постепенно увеличивалось в обеих группах, достигая максимальных значений на 7-й день ($9,3 \pm 0,5 \times 10^6$ клеток/мышь) или на 10-й день ($10,6 \pm 0,5 \times 10^6$ клеток/мышь, группа, получавшая ИЛГ).

После достижения пика на 9-10 дни развития инфекции, число клеток лимфатических узлов постепенно уменьшалось, достигая нормальных значений (у интактных животных) к 16-му дню в обеих группах.

В первые дни после инфицирования количество спленоцитов в обеих группах было сопоставимым и меньше, чем у неинфицированных мышей ($363,0 \pm 125,4 \times 10^6$ клеток/мышь), вплоть до 6-го дня. С 3-го по 9-й дни число спленоцитов постепенно нарастало в обеих группах. Количество спленоцитов мышей, получавших ИЛГ, достигало максимума к 10-му дню ($3328,0 \pm 166,4 \times 10^6$ клеток/мышь). Контрольная группа имела сходную динамику с максимумом к 10-му дню, но с меньшим пиковым значением ($1488,0 \pm 74,4 \times 10^6$ клеток/мышь).

Таким образом, изучение нарастания «клеточности» в паховых лимфатических узлах и селезенке позволило установить наиболее оптимальные сроки для исследования цитокинов при формировании иммунного ответа – 4-5 сутки после заражения.

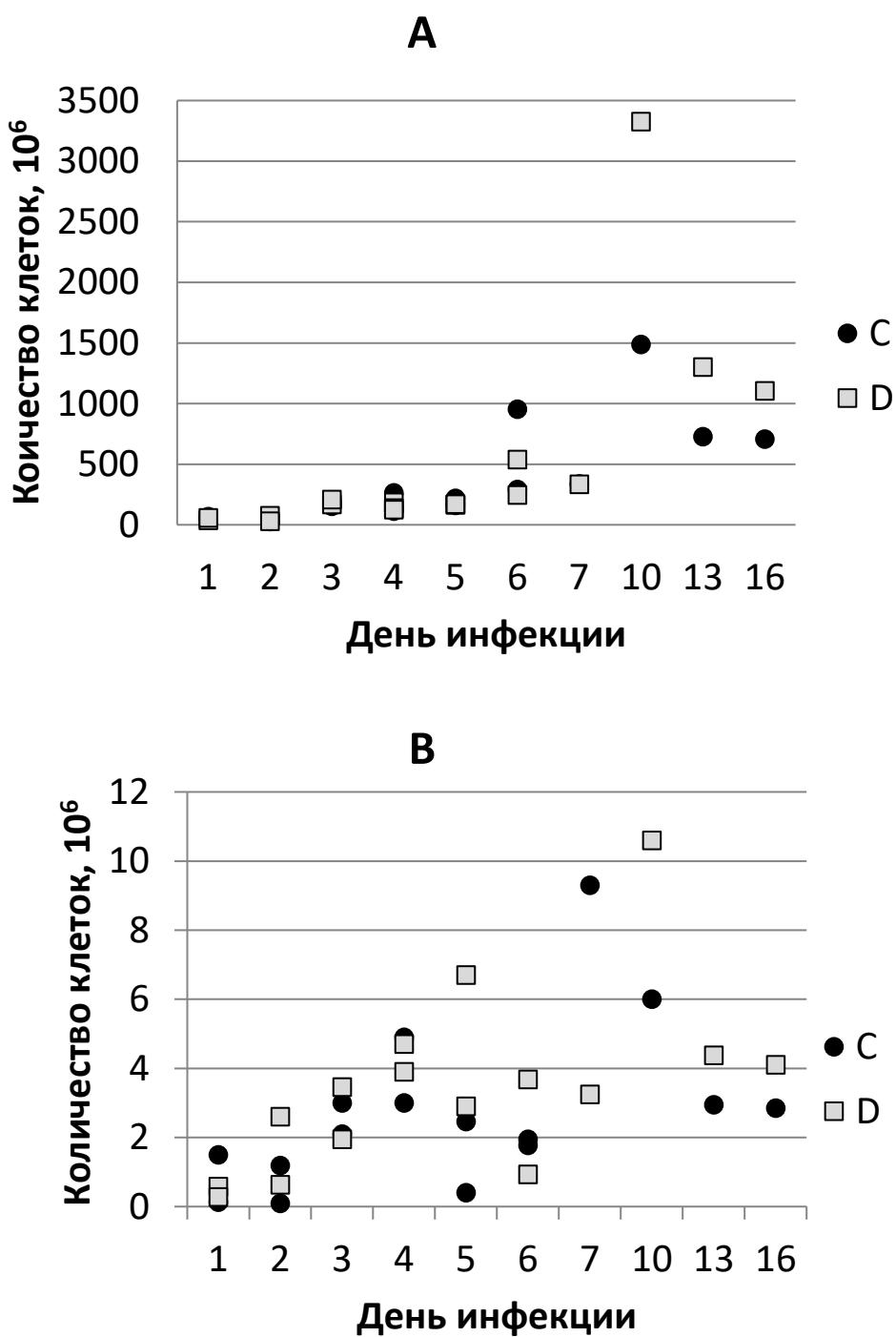


Рисунок 3-14. Динамика спленоцитов (А) и клеток паховых лимфатических узлов (В) в модели стафилококковой инфекции мышей Balb/C
 Примечание: С - контрольная группа, 5×10^8 КОЕ/мышь; D - Предварительное введение изоликвиритигенина (30 мг/кг), 5×10^8 КОЕ/мышь. Интактные мыши: количество спленоцитов = $363,0 \pm 125,4 \times 10^6$ клеток/мышь, количество клеток паховых лимфатических узлов = $2,3 \pm 1,1 \times 10^6$ клеток/мышь.

Влияние ИЛГ на цитокины, продуцируемые лимфоцитами паховых лимфатических узлов мышей Balb/C при стафилококковой инфекции. Секрецию цитокинов, модулирующих иммунный ответ Th17 типа, клетками паховых лимфатических узлов определяли на 4 и 5 сутки после заражения (5×10^8 КОЕ/мышь), инкубируя клетки в течение 24-48 ч *in vitro*, с последующим определением их концентрации с помощью магнитной панели *MILLIPLEX MAP*.

Как показано на Рисунках 3-15 и 3-16, продукция многих обнаруживаемых на 4-й день инфекции цитокинов была выше по сравнению с 5-м днем после заражения. К 48 ч инкубации уровни IL-2, IFN γ , IL-6, GM-CSF и IL-17A характеризовались довольно высокими значениями у контрольных инфицированных мышей.

Внутрибрюшинное введение ИЛГ до заражения мышей в сравнении с контролем значительно снижало продукцию таких цитокинов, как IL-2 ($5524,3 \pm 669,8$ пг/мл vs. $1265,0 \pm 94,8$ пг/мл, $p < 0,05$), IFN γ ($3936,3 \pm 567,8$ пг/мл vs. $587,6 \pm 20,9$ пг/мл, $p < 0,05$), IL-6 ($4861,3 \pm 361,8$ пг/мл vs. $412,3 \pm 11,8$ пг/мл, $p < 0,05$), GM-CSF ($553,3 \pm 64,6$ пг/мл vs. $80,3 \pm 6,3$ пг/мл, $p < 0,05$), и IL-17A ($6804,0 \pm 754,9$ пг/мл vs. $1129,0 \pm 31,1$ пг/мл, $p < 0,05$).

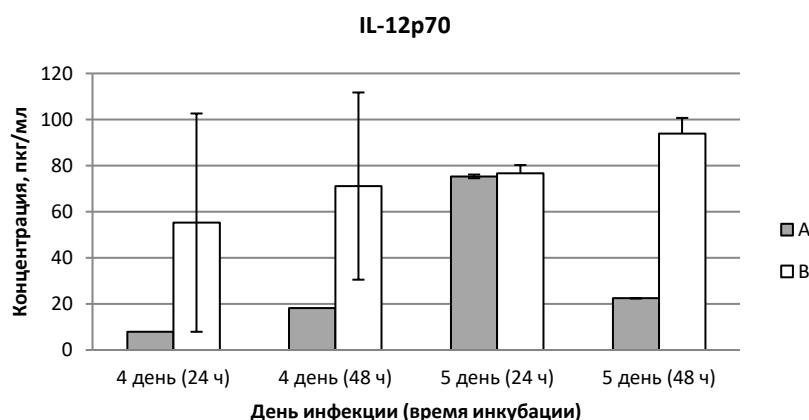


Рисунок 3-15. Влияние предварительного введения изоликвиритигенина на уровни цитокинов (группа Th1 и IL-10), продуцируемых клетками паховых лимфатических узлов мышей Balb/C, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (5×10^8 КОЕ/мышь). Примечание: А - предварительное введение изоликвиритигенина; В - контрольная группа; * - достоверные изменения при $p < 0,05$.

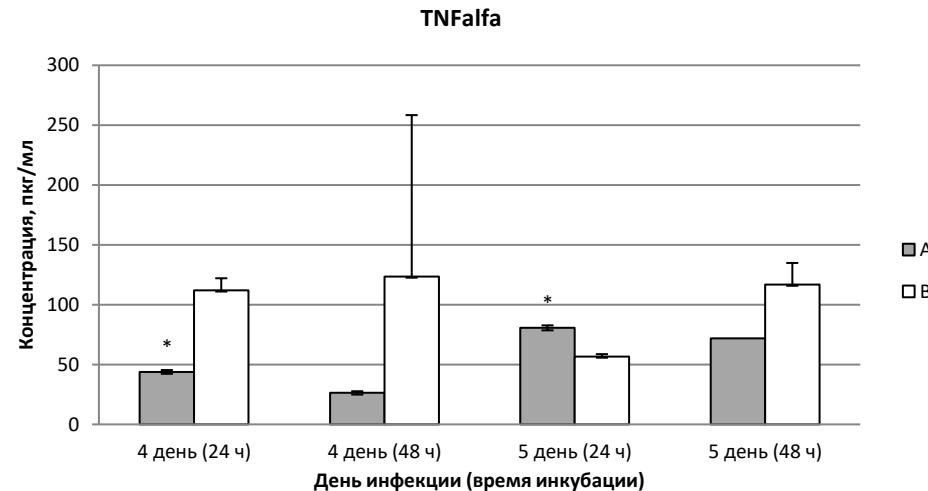
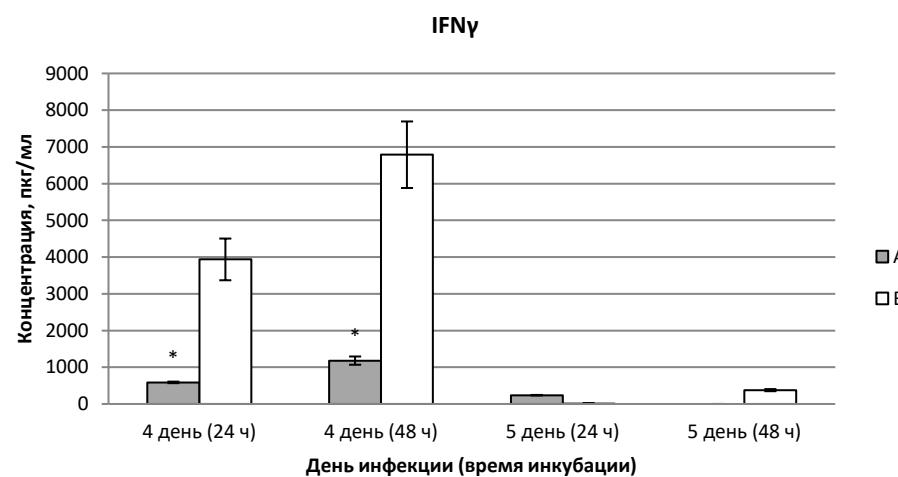
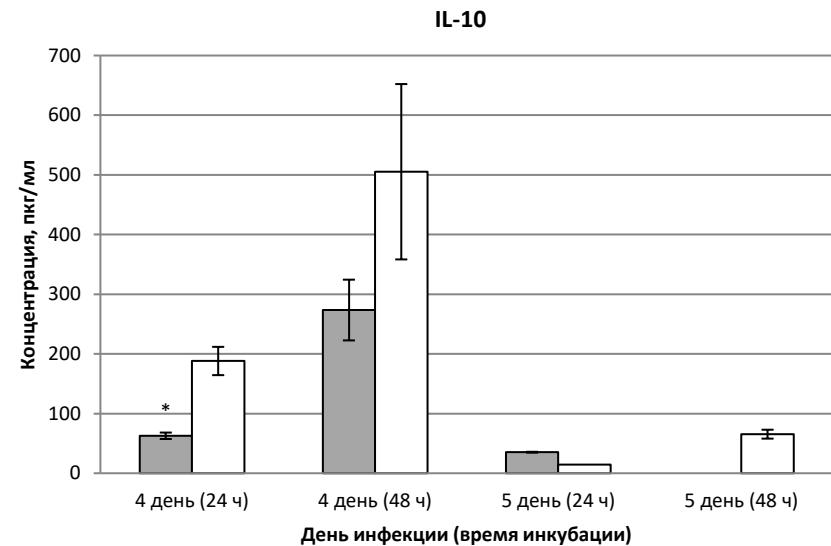
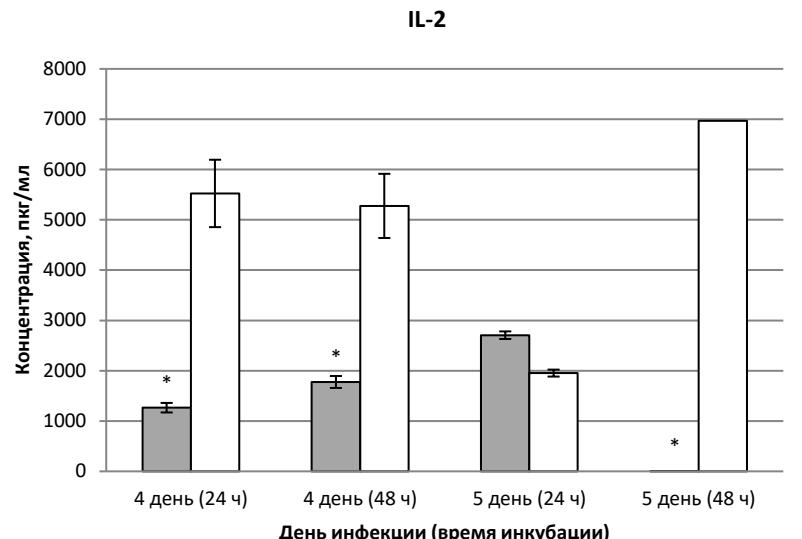


Рисунок 3-15. Продолжение. Влияние предварительного введения изоликвиритигенина на уровни цитокинов (группа Th1 и IL-10), продуцируемых клетками паховых лимфатических узлов мышей Balb/C, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (5×10^8 КОЕ/мышь). Примечание: А - предварительное введение изоликвиритигенина; В - контрольная группа;
* - достоверные изменения при $p < 0,05$.

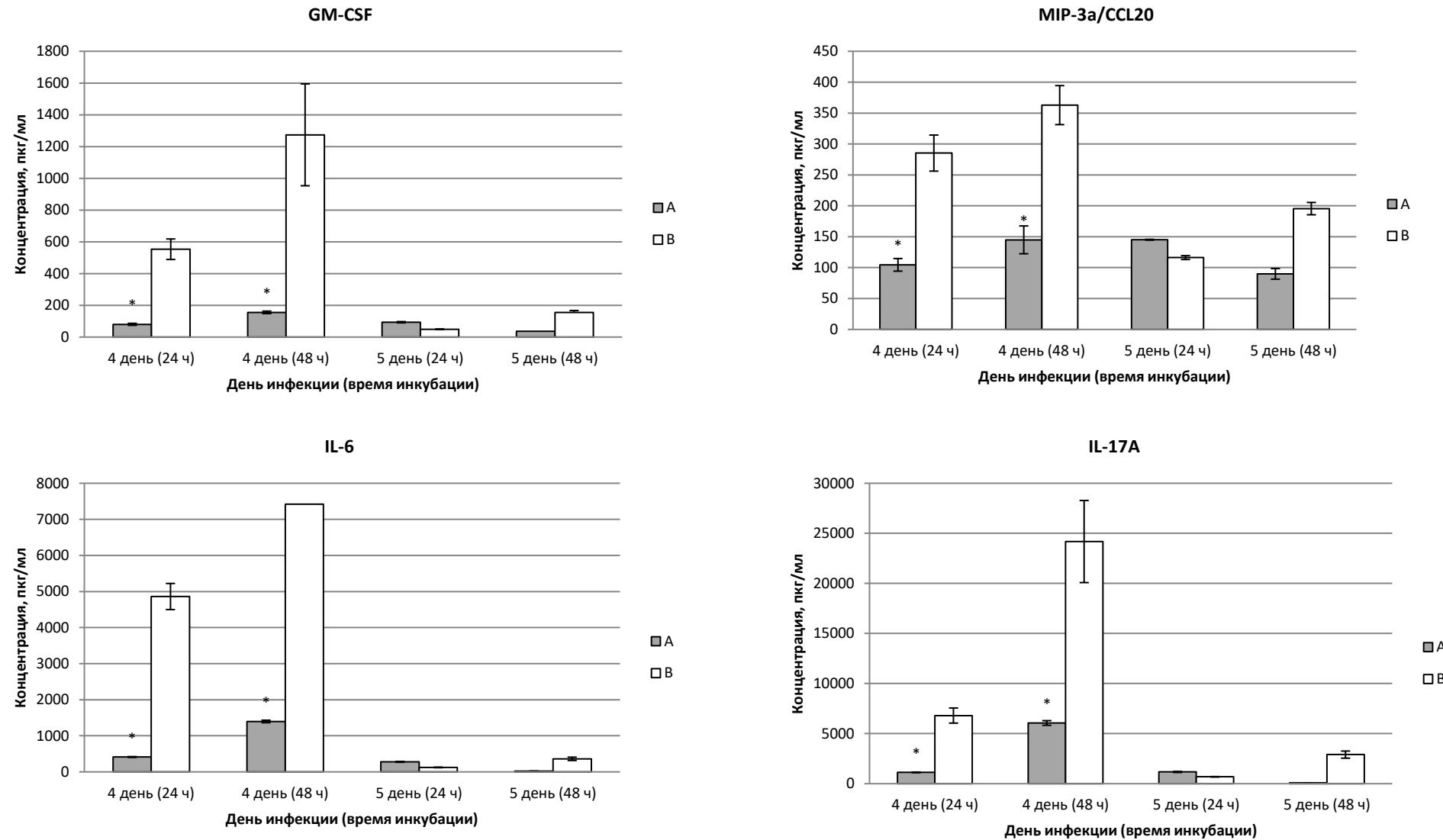


Рисунок 3-16. Влияние предварительного введения изоликвиритигенина на уровни цитокинов (группа Th17), продуцируемых клетками пашиховых лимфатических узлов мышей Balb/C, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (5×10^8 КОЕ/мышь).

Примечание: А - группа, получавшая изоликвиритигенин (30 мг/кг); В – контроль; * - достоверные изменения при $p < 0,05$.

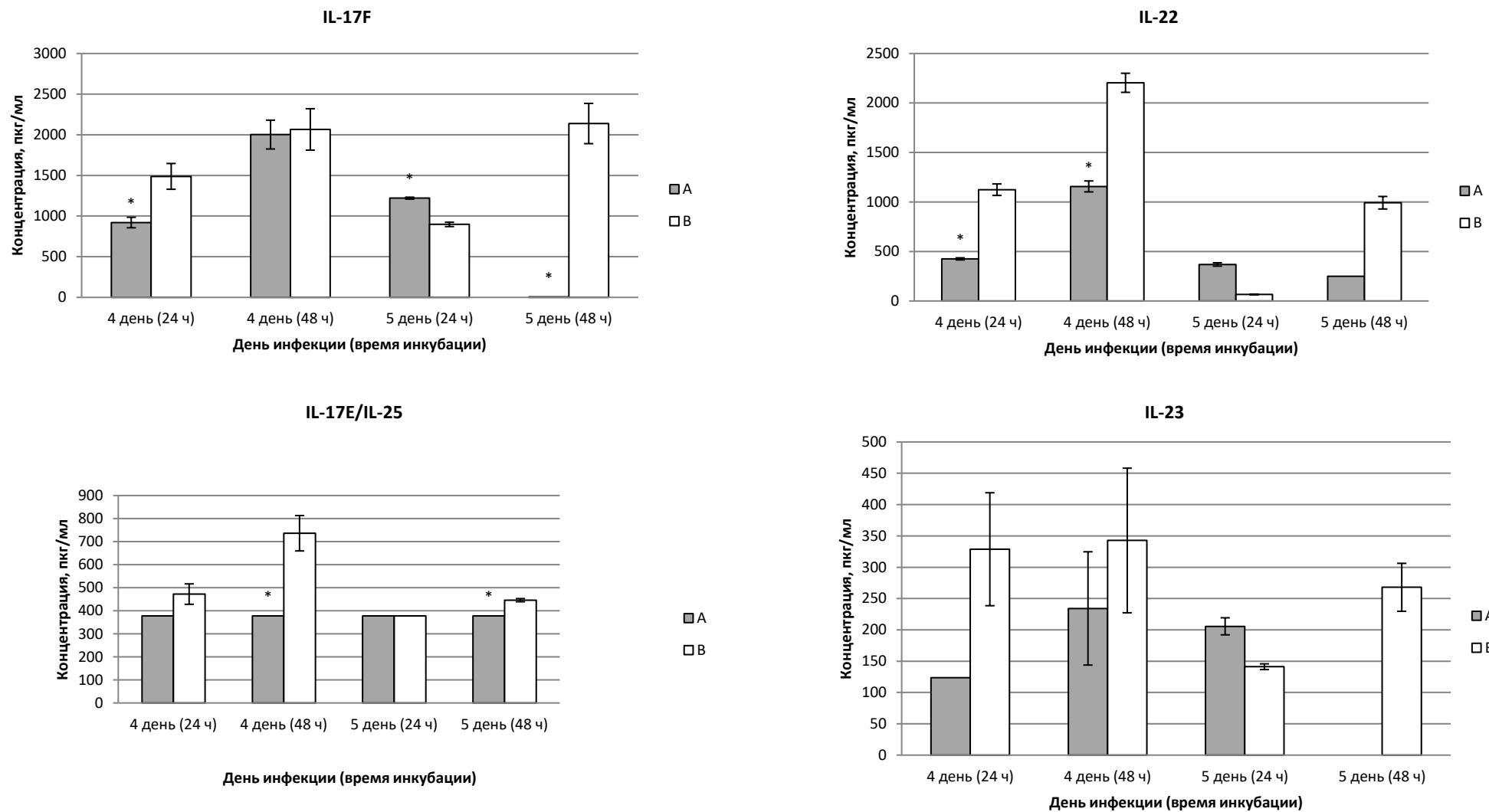


Рисунок 3-16. Продолжение. Влияние предварительного введения изоликвиритигенина на уровни цитокинов (группа Th17), продуцируемых клетками паховых лимфатических узлов мышей Balb/C, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (5×10^8 КОЕ/мышь).

Примечание: А - группа, получавшая изоликвиритигенин (30 мг/кг); В – контроль; * - достоверные изменения при $p < 0,05$.

Влияние ИЛГ на цитокины, продуцируемые спленоцитами при стафилококковой инфекции мышей Balb/C. Секрецию цитокинов спленоцитами, модулирующих иммунный ответ Th17 типа, определяли на 4-ый и 5-ый день после заражения животных в дозе 5×10^8 КОЕ/мышь (Рисунок 3-17, Рисунок 3-18). После инкубации выделенных спленоцитов в течение 24-48 ч *in vitro* и анализа концентрации с помощью магнитной панели *MILLIPLEX MAP* установлено, что введение ИЛГ мышам приводило к постепенному увеличению секреции цитокинов от 4-го к 5-му дню после заражения. Как показано на Рисунке 3-16, на 4-й день после заражения значения GM-CSF ($586,7 \pm 95,5$ пг/мл vs. $306,5 \pm 11,4$ пг/мл, $p < 0,05$) были значительно выше у мышей, получавших ИЛГ, чем в контрольной группе. На 5-й день после заражения в группе, получавшей ИЛГ, уровень секреции таких исследуемых цитокинов, как IL-2, IL-12p70, IFN γ , IL-22, IL-23, IL-17A, IL-17F, MIP-3a/CCL20, IL-10 (в момент инкубации 24 ч и/или 48 ч) был достоверно выше по сравнению с контрольными мышами (Таблица 3-9).

Таблица 3-9. Влияние изоликвитигенина на цитокины, продуцируемые спленоцитами при стафилококковой инфекции мышей Balb/C.

Наименование цитокинов	Концентрация цитокинов, пг/мл	
	Контроль	ИЛГ
IL-2	$2158,5 \pm 140,7$	$3818,0 \pm 265,9$ *
IL-12p70	$31,8 \pm 4,6$	$100,6 \pm 2,6$ *
IFN γ	$2356,0 \pm 179,6$	$7191,0 \pm 0,0$ *
IL-22	$604,4 \pm 45,4$	$1028,5 \pm 33,2$ *
IL-23	$186,3 \pm 0,0$	$374,0 \pm 17,8$ *
IL-17	$756,9 \pm 20,3$	$3094,5 \pm 95,5$ *
L-17F	$865,45 \pm 39,4$	$1223,5 \pm 79,9$ *
MIP-3a/CCL20	$302,0 \pm 0,8$	$428,8 \pm 16,7$ *
IL-10	$56,0 \pm 2,7$	$664,0 \pm 23,7$ *

Примечание: * - достоверные изменения при $p < 0,05$

Таким образом, внутрибрюшинное введение ИЛГ до заражения мышей на 5ый день инфекции значительно снижало продукцию таких цитокинов паховыми лимфатическими узлами, как, как IL-2, IFN γ , IL-6, GM-CSF, и IL-17A. Напротив, уровень секреции таких цитокинов, как IL-2, IL-12p70, IFN γ , IL-22, IL-23, IL-17A, IL-17F, MIP-3a/CCL20, IL-10, GM-CSF, секретируемых селезенкой мышей, получавших ИЛГ, был достоверно выше по сравнению со значениями контрольной группы.

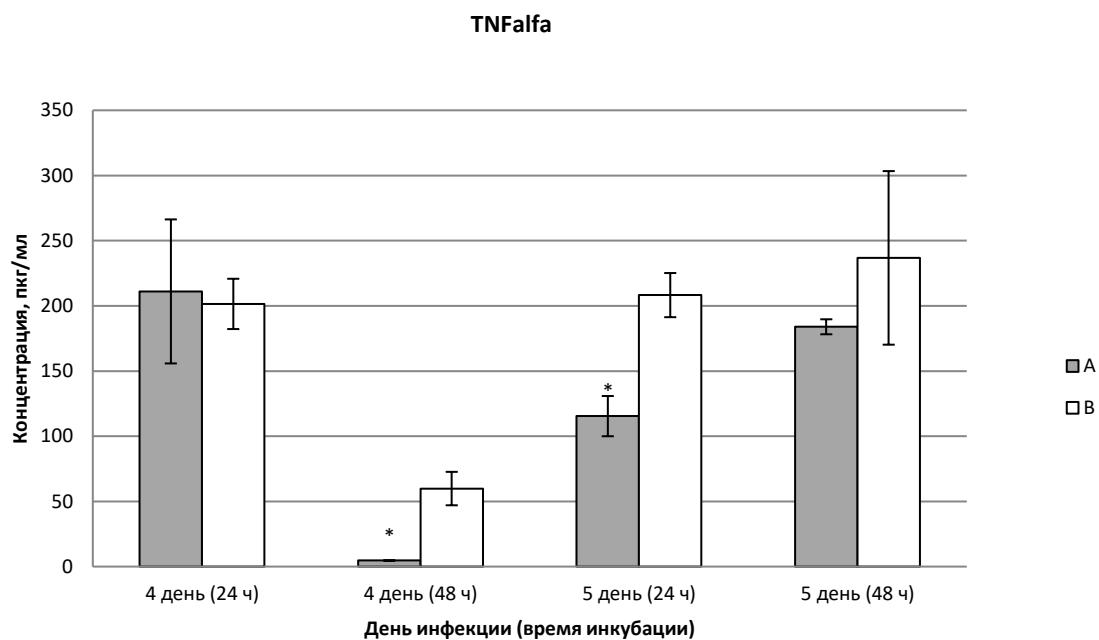


Рисунок 3-17. Влияние предварительного введения изоликвиритигенина на уровни цитокинов (группа Th1 и IL-10), продуцируемых спленоцитами мышей Balb /C, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (5×10^8 КОЕ/мышь, внутрибрюшинно).

Примечание: А - группа, получавшая изоликвиритигенин (30 мг/кг);
В - контрольная группа; * - достоверные изменения при $p < 0,05$.

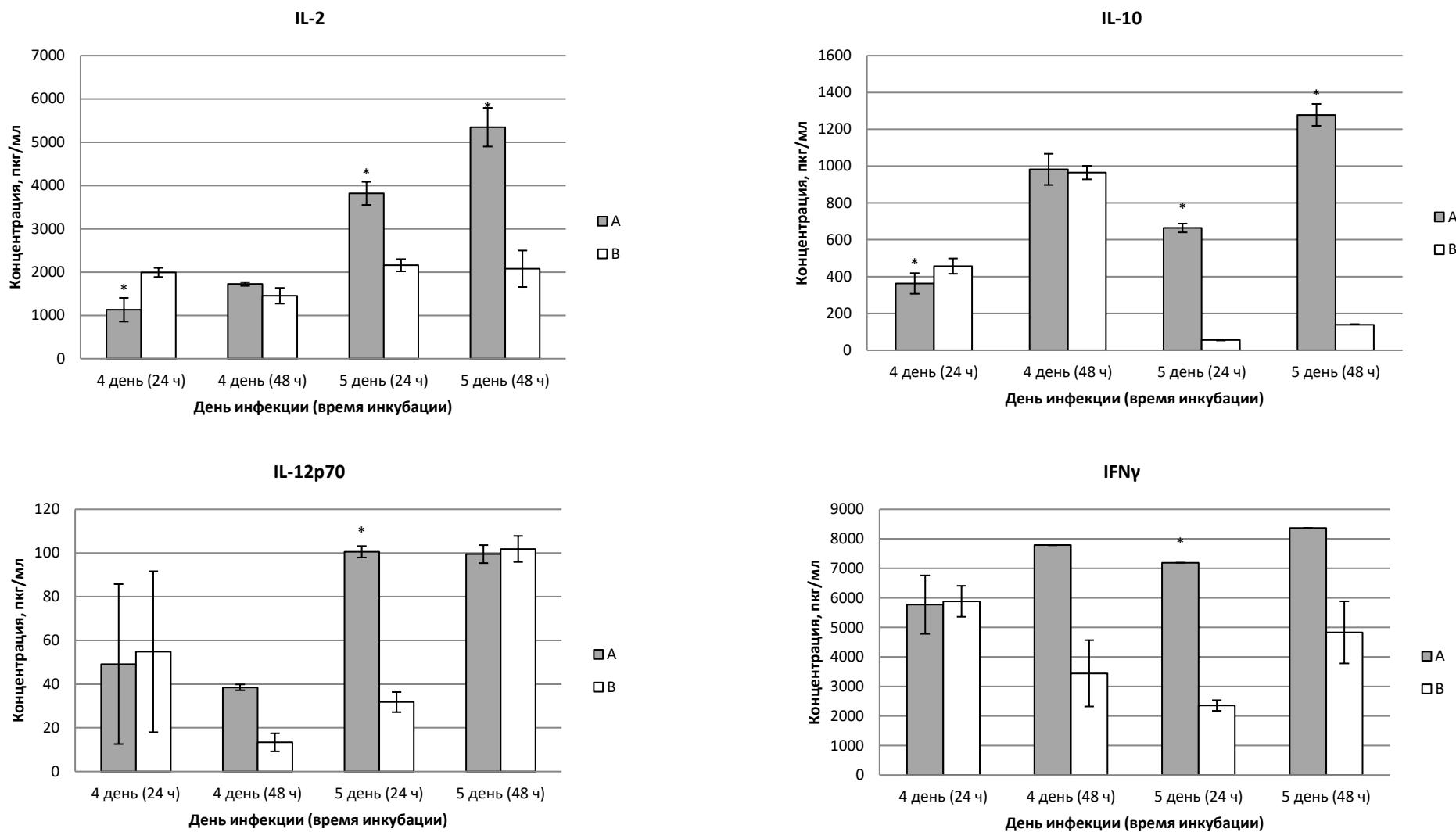


Рисунок 3-17. Продолжение. Влияние предварительного введения изоликвиритигенина на уровень цитокинов (группа Th1 и IL-10), продуцируемых спленоцитами мышей Balb /C, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (5×10^8 КОЕ/мышь, внутрибрюшно). Примечание: А - группа, получавшая изоликвиритигенин (30 мг/кг); В - контрольная группа; * - достоверные изменения при $p < 0,05$.

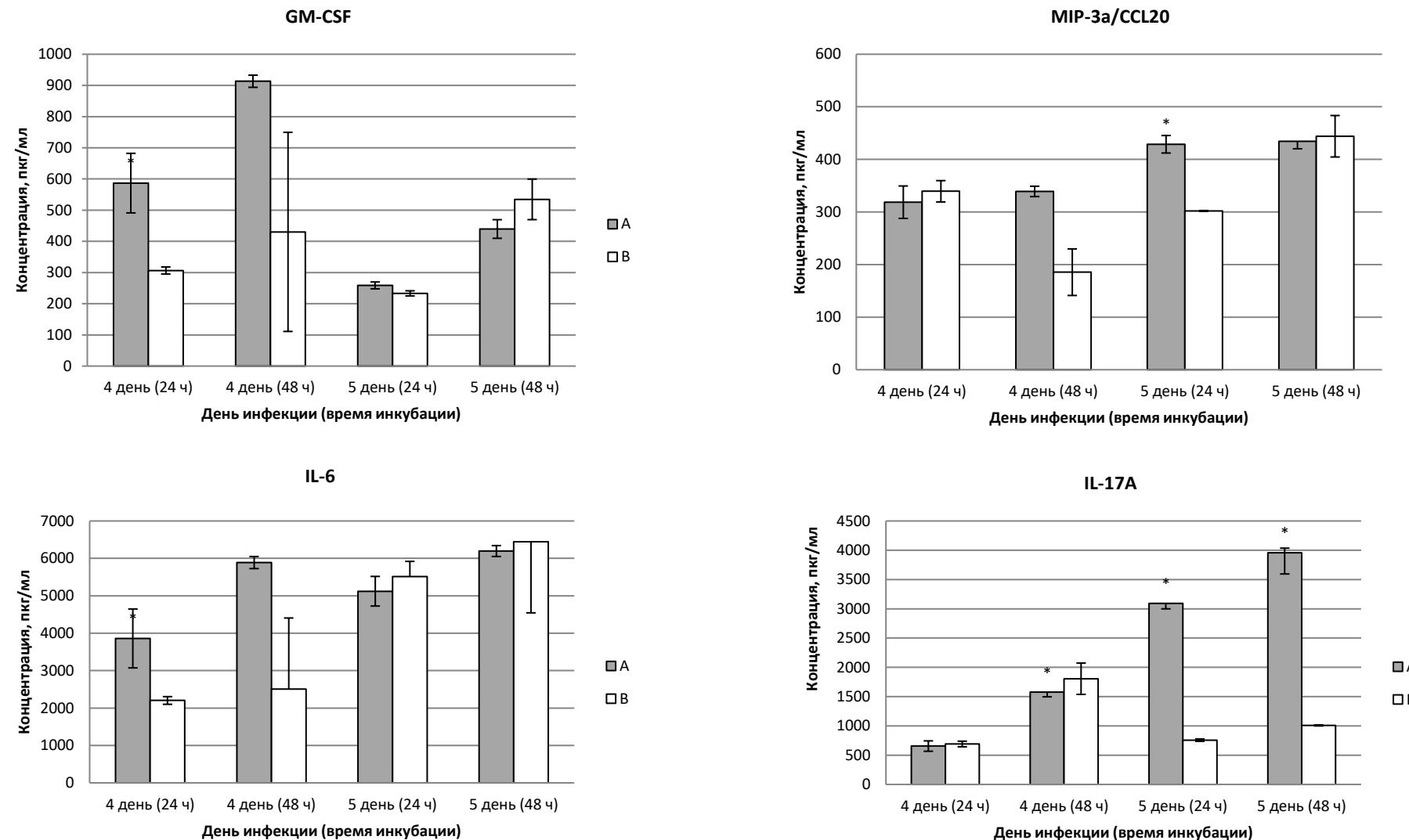


Рисунок 3-18. Влияние предварительного введения изоликвиритигенина на уровни цитокинов (группа Th17), продуцируемых спленоцитами мышей Balb/C, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (5×10^8 КОЕ/мышь, внутрибрюшинно).

Примечание: А - предварительное введение изоликвиритигенина (30 мг/кг); В - контрольная группа;

* - достоверные изменения при $p < 0,05$.

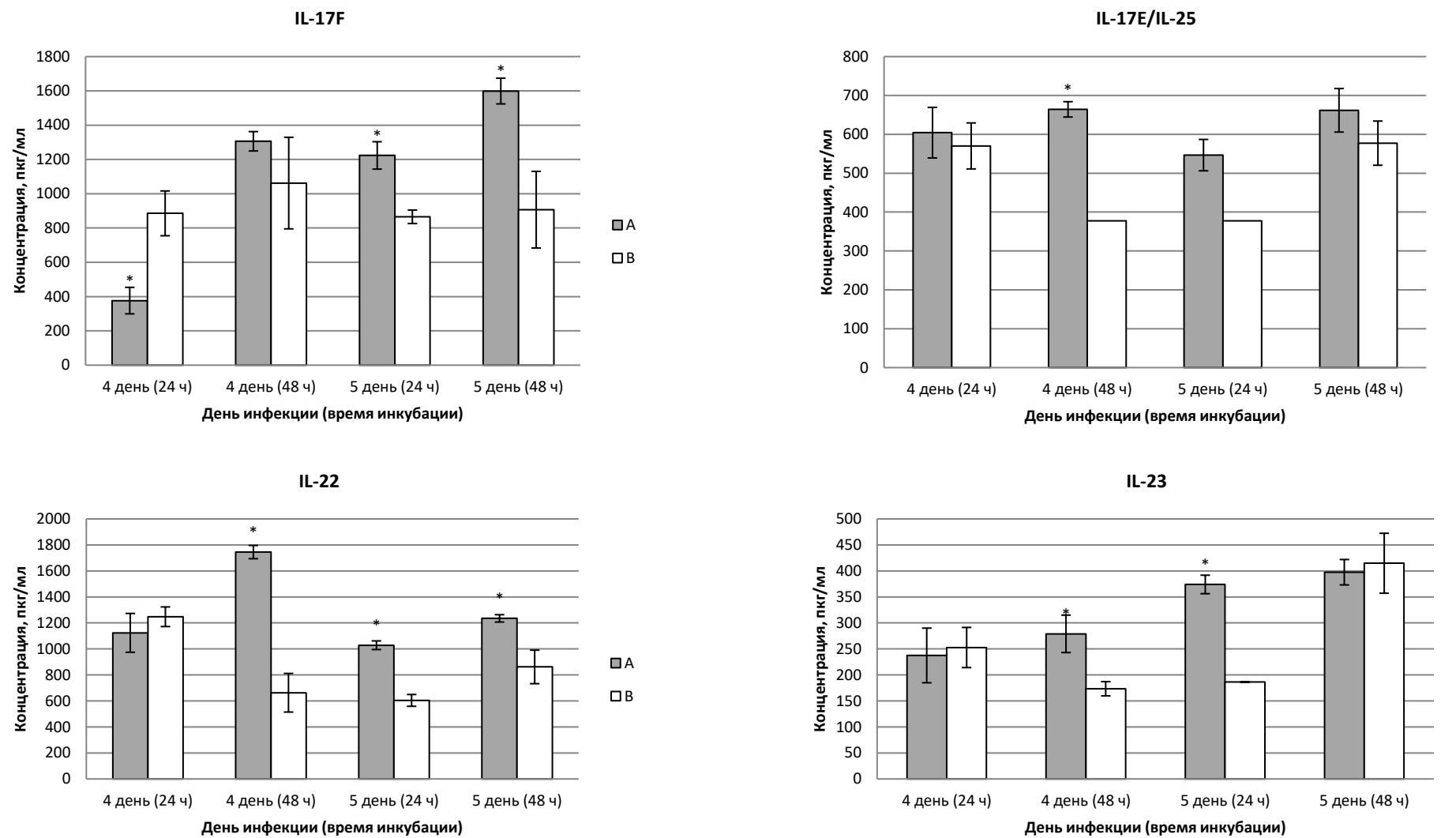


Рисунок 3-18. Продолжение. Влияние предварительного введения изоликвиритигенина на уровни цитокинов (группа Th17), продуцируемых спленоцитами мышей Balb/C, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (5×10^8 КОЕ/мышь, внутрибрюшинно). Примечание: А - предварительное введение изоликвиритигенина (30 мг/кг); В - контрольная группа; * - достоверные изменения при $p < 0,05$.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Стафилококк способен вызывать развитие как местных, так и тяжелых системных жизнеугрожающих (в том числе внутрибольничных) инфекций. Особенностью стафилококковых инфекций у человека является способность к персистированию, несмотря на выработку специфических антител против *S. aureus*, вследствие подавления механизмов врожденного и адаптивного иммунитета [145, 152]. Кроме того, причиной персистирования инфекции, вызванной *S. aureus*, является способность данного микроорганизма формировать бактериальные биопленки на поверхности сердечных клапанов, имплантов и других медицинских изделий [27].

Генерализованные стафилококковые инфекции у человека характеризуются высокой смертностью вследствие развития сепсиса и септического шока [175]. Токсины *S. aureus* (например, токсин синдрома токсического шока) как суперантагены индуцируют развитие «цитокинового шторма» [65], при котором назначение антибактериальных препаратов не всегда эффективно из-за развития неконтролируемого системного воспаления, а также возможной устойчивости бактерий к антибиотикам [149].

Таким образом, многие аспекты лечения стафилококковой инфекции и сепсиса требуют углубленного фундаментального изучения и комплексного подхода к фармакотерапии препаратами, обладающими как антибактериальными, так и иммуномодулирующими средствами.

В последнее время появилось достаточно публикаций о биологической активности полифенольных соединений (флавоноидов), демонстрирующих antimикробные и иммуномодулирующие эффекты. Так, флавоноиды корня солодки повышали резистентность [16] мышей к острой стафилококковой инфекции и их выживаемость [32]. Наблюдались предотвращение активации и пролиферативного ответа лимфоцитов [16], увеличение секреции IL-17 активированными Т-клетками *in vitro* [79]. Из корней солодки выделены десятки

различных флавоноидов, одним из основных является ИЛГ, обладающий антимикробным [79], а также противовоспалительным и иммуномодулирующим эффектами [7, 16], что обуславливает актуальность исследования его в качестве агента при стафилококковой инфекции.

Целью настоящего исследования явилось изучение эффектов ИЛГ в модели генерализованной стафилококковой инфекции, в частности – антибактериальных и иммунотропных свойств. Для того, чтобы изучить влияние ИЛГ на механизмы выживаемости животных при развитии генерализованной стафилококковой инфекции, мы изучили прямую антибактериальную, антибиопленочную активности ИЛГ в отношении различных штаммов *S. aureus*, его влияние на функции фагоцитов и лимфоцитов *in vitro* и *in vivo* при развитии генерализованной стафилококковой инфекции у животных.

При изучении влияния ИЛГ на выживаемость мышей была использована модель генерализованной стафилококковой инфекции у мышей линии Balb/c. Несмотря на то, что мышиные модели *S. aureus*-инфекции слабо коррелируют со стафилококковой инфекцией у человека [171], они широко используются в экспериментальной медицине и фармакологии. Причем для воспроизведения инфекции *S. aureus* у животных требуются очень высокие инокулянты. Так, в настоящей работе генерализованную инфекцию воспроизводили у мышей линии Balb/C внутрибрюшинным введением суспензии штамма *S. aureus* ATCC 25923 в количестве 5×10^8 - $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мышь. Генерализация инфекции (сепсис) была подтверждена (наличие бактериемии, абсцессов во внутренних органах) даже в случае бактериальной нагрузки 5×10^8 КОЕ/мышь, которая практически не вызывала гибели животных. Массивная гибель экспериментальных животных наблюдалась только при заражении $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мышь. При этом большая часть мышей погибала в ранние сроки инфекции (на 2-3 сутки), что могло свидетельствовать о развитии септического шока [108]. Визуальная оценка при аутопсии мышей, получавших ИЛГ, показала, что в сравнении с контрольной группой у них наблюдался более выраженный спаечный процесс с формированием абсцессов с плотной капсулой. Таким образом, в отличие от введения ИЛГ, а также

его комбинации с оксациллином после заражения животных, введение ИЛГ за 1 час до бактериального заражения значимо увеличивало выживаемость мышей. Ранее в работах других авторов влияние ИЛГ на увеличение выживаемости было продемонстрировано в модели острого повреждения легких, вызванного *S. aureus* [12]. В частности, внутрибрюшинное введение ИЛГ в дозе 160 мг/кг/сут приводило к снижению бактериальной нагрузки в легких у мышей через 24 ч после заражения.

Учитывая наличие на сегодняшний день разнообразных фармакодинамических мишеней у лекарственных средств, применяемых для лечения генерализованного инфекционного процесса, феномен увеличения выживаемости на фоне предварительного введения ИЛГ при генерализованной стафилококковой инфекции может быть рассмотрен как с позиции непосредственного влияния ИЛГ на бактериальный рост, так и его влияния на иммунный ответ.

Первоочередным этапом явилось изучение прямой антибактериальной активности ИЛГ в отношении различных штаммов *S. aureus*. Было выявлено, что ИЛГ обладает низкой антибактериальной активностью: он подавляет рост музейных штаммов (*S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, *S. aureus* ATCC 25923) и клинических изолятов (*S. aureus* 10, *S. aureus* 74, *S. aureus* 83, *S. aureus* 1, *S. aureus* 6, *S. aureus* 77) в достаточно больших концентрациях (≥ 64 мкг/мл), что было сопоставимо с данными некоторых авторов, которые изучали действие ИЛГ на другие бактерии рода *Staphylococcus* [12]. В литературе не представлено исчерпывающих данных, описывающих механизмы антибактериальной активности ИЛГ в отношении *S. aureus*. Однако имеются сведения о способности синтетического производного ИЛГ – халкона IMRG4 – повреждать бактериальные мембранны VISA путем влияния на проницаемость и процессы деполяризации [19].

В качестве одного из путей преодоления антимикробной резистентности изучена прямая антибактериальная активность ИЛГ в комбинации с антибиотиками. При добавлении ИЛГ в комбинации с оксациллином в концентрациях ниже МПК наблюдалось подавление роста штаммов *S. aureus* ATCC

25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330. Это коррелирует с данными немногочисленных исследований, которые демонстрируют способность ИЛГ снижать МПК β-лактамных антибиотиков (пенициллина, ампициллина, оксациллина) в отношении тес А-содержащих штаммов *MRSA* до 16 раз [45]. При добавлении ИЛГ и ванкомицина в концентрациях ниже МПК также наблюдалось подавление роста штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330, *S. aureus* 6, *S. aureus* 10, *S. aureus* 77.

При дальнейшем исследовании была выявлена способность ИЛГ подавлять формирование на пластиковой поверхности бактериальных биопленок у изучаемых клинических изолятов и музейных штаммов *S. aureus*, что дополняет ранее опубликованные данные о таковой способности у других коллекционных штаммов [154] и клинических изолятов *MSSA* и *MRSA* [110]. Используя атомно-силовую микроскопию и МТТ-тест, мы выявили, что штамм *S. aureus* ATCC 25923 формирует биопленки, а внесение ИЛГ в концентрациях меньше МПК снижает скорость их формирования. Антибиопленочный эффект ИЛГ был концентрационно зависимым (4-128 мкг/мл) и коррелировал с выраженностю ингибирования суспензионного роста бактерий, что косвенно может свидетельствовать о том, что данный эффект явился следствием прямого антибактериального эффекта ИЛГ. Другими исследователями антибиопленочная активность ИЛГ описана в отношении *S. xylosus* [128], однако механизмы влияния ИЛГ на биопленки бактерий рода *Staphylococcus* глубоко не изучены, хотя есть сведения о других флавоноидах, влияющих на систему *quorum sensing* *S. aureus*.

Антибиопленочная активность комбинаций «ИЛГ + оксациллин» и «ИЛГ + ванкомицин» в концентрациях меньших, чем МПК, выявлена лишь в отношении единичных штаммов *S. aureus* и так же, как и прямая антибактериальная активность, была концентрационно зависимой. Однако учитывая, что вероятность достижения и поддержания таких концентраций в биологических жидкостях/очагах инфекции в условиях *in vivo* низка, а также довольно короткий период полувыведения ИЛГ [130], в настоящей работе был сделан акцент на изучение влияния ИЛГ на функции врожденного и адаптивного иммунитета.

На ранних сроках инфекции именно врожденные иммунные реакции наиболее значимы для предотвращения генерализации и ограничения гнойно-воспалительного процесса. Поэтому нами был изучен еще один потенциальный механизм протекции ИЛГ при развитии генерализованной стафилококковой инфекции, в частности - влияние ИЛГ на некоторые механизмы врожденного иммунитета (функции фагоцитов) как возможных факторов, влияющих на выживаемость в ранние сроки бактериальной инфекции.

Фагоциты представляют собой эффекторные клетки врожденного иммунитета, осуществляющие первую линию защиты при инвазии инфекционных патогенов. Основными этапами фагоцитарных реакций являются хемотаксис (миграция), поглощение, киллинг и переваривание инфекционного патогена.

В модели индуцированной пептоном миграции фагоцитов в брюшную полость мышей установлено, что ИЛГ не оказывает подавляющего влияния на миграцию фагоцитов как через 24 ч (хемотаксис преимущественно нейтрофилов), так и 72 ч (хемотаксис преимущественно макрофагов) в ответ на стандартный активатор миграции пептон у мышей Balb/C. Выявленное отсутствие подавляющего влияния ИЛГ на миграцию фагоцитов в очаг внедрения патогена, на наш взгляд, является положительным.

Следующий этап фагоцитоза (поглощение фагоцитами инфекционного агента) реализуется за счет таких механизмов, как сближение фагоцита и патогена, установление контакта, подготовка к погружению, обволакивание патогена, замыкание мембранны и поглощение объекта. Данные этапы суммарно оценивались с применением цитометрического метода и ФИТЦ-меченых бактерий. В качестве бактериального агента для фагоцитоза использовали коллекционный штамм *S. aureus* ATCC 25923. В исследуемом диапазоне концентраций (16-128 мкг/мл) ИЛГ не снижал долю нейтрофилов и моноцитов, способных поглощать бактериальные клетки. Однако интенсивность флуоресценции моноцитов при экспозиции с некоторыми концентрациями ИЛГ имела тенденцию к снижению. Но данный факт не является значимым, так как в больших концентрациях ИЛГ способен реализовывать прямую антибактериальную активность.

Киллинг и переваривание фагоцитами бактериальных патогенов происходят за счет кислородного (продукция АФК) и азотного метаболизма. АФК – группа высокореактивных кислородсодержащих химических веществ, связанных не только с патологическими (хроническое воспаление, патологическая пролиферация клеток) [144], но и с физиологическими процессами (выживание, рост, пролиферация и дифференциация клеток, иммунный ответ) [134]. В частности, важным звеном в реализации врожденных иммунных реакций является запуск массивной продукции АФК («кислородный взрыв») в фагоцитах. Инициирует начало «кислородного взрыва» НАДФН-оксидаза (в фагоцитах - НАДФН-оксидаза 2 типа) [150], активация которой может происходить в сигнальном каскаде, связанном с протеинкиназой С, форболовыми эфирами (например, ФМА) [147]. В связи с этим влияние ИЛГ на переваривающую способность фагоцитов оценивали по продукции АФК нейтрофилами и моноцитами с применением флуорогенного субстрата ДГР 123, который взаимодействует с АФК с образованием флуорохрома родамина 123. В ходе экспериментов установлено, что добавление ИЛГ (16-128 мкг/мл) даже к не активированным ФМА клеткам концентрационно зависимо увеличивало долю флуоресцирующих нейтрофилов и моноцитов, а также интенсивность флуоресценции по сравнению с контрольными пробами, что свидетельствует о накоплении АФК в фагоцитах. Добавление ИЛГ к ФМА-активированным фагоцитам также увеличивало продукцию АФК в сравнении с ФМА-активацией без экспозиции с ИЛГ. При этом наблюдались суммационные эффекты по показателю интенсивности флуоресценции. Так, сумма интенсивности флуоресценции ФМА-активированных нейтрофилов ($11,3 \pm 3,7$) и нейтрофилов, не активированных ФМА, но инкубированных с ИЛГ (128 мкг/мл) ($6,6 \pm 1,6$), сопоставима со значениями интенсивности флуоресценции ФМА-активированных нейтрофилов, инкубированных с ИЛГ (128 мкг/мл) ($15,8 \pm 3,0$). Аналогичная суммация эффекта выявлена в образцах моноцитов.

С другой стороны, флавоноиды хорошо известны как антиоксиданты, которые могут снижать продукцию АФК фагоцитами. Так, например, ресвератрол

подавляет активность НАДФН-оксидазы, миелопероксидазы и, как следствие, образование хлорноватистой кислоты [178]. АФК участвуют в реализации одного из механизмов врожденного иммунного ответа – формировании «нейтрофильных ловушек» [118]. Активированные бактериями (*S. aureus* и *E. coli*) либо химическими веществами (ФМА) нейтрофины производят АФК и образуют нейтрофильные внеклеточные конгломераты, которые направлены на сдерживание бактериального диссеминирования из очага инфекции [137]. Однако имеются данные, что чрезмерная активация НЛ ухудшает микроциркуляцию в очаге воспаления [117]. Продемонстрировано, что флавоноиды (эпикатехин, катехингидрат и тригидрат рутина, а также лютеолин, кемпферол) подавляют образование АФК-зависимых «нейтрофильных ловушек» [62, 105], а ресвератрол улучшает функции легких во время острых инфекций дыхательных путей или хронических воспалительных заболеваний легких [111].

В некоторых биологических системах, а также в больших концентрациях природные полифенолы могут демонстрировать прооксидантные свойства [22, 50, 107, 138]. Так, ИЛГ повышает продукцию АФК в различных опухолевых клетках [98], что рассматривают, как один из его противоопухолевых механизмов. По-видимому, аналогичные механизмы продукции АФК при участии флавоноидов возможны в нейтрофилах и моноцитах, что продемонстрировано в настоящем исследовании в образцах с ИЛГ. Возможно, что это имеет значение в реализации антистафилококковых эффектов флавоноидных соединений. Однако, следует учитывать и возможность необратимого повреждения митохондрий, гибели макрофагов, вызванное увеличением выработки АФК и диссеминации поглощенных бактерий при незавершенном фагоцитозе, что было показано при исследовании ресвератрола в отношении микобактерий [30].

Выявленный в экспериментах с использованием высокой бактериальной нагрузки протективный эффект ИЛГ при стафилококковом сепсисе мог быть реализован путем сдерживания симптомов токсического шока, которые в значительной степени являются результатом гиперпродукции цитокинов (IL-2, INF- γ и TNF- α) [32] Т-лимфоцитами, активированными суперантителом [163]. В

настоящем эксперименте ИЛГ, как и некоторые другие флавоноиды [15], проявлял иммуносупрессивные свойства. В культуре мононуклеаров, активированных Т-клеточным митогеном КонА, ИЛГ дозозависимо ингибировал пролиферацию: в концентрации 8 мкг/мл пролиферация подавлялась примерно вдвое, тогда как в концентрациях более 16 мкг/мл практически полностью отсутствовал пролиферативный ответ. Кроме того, ИЛГ в культуре КонА-активированных спленоцитов дозозависимо ингибировал продукцию цитокинов даже в концентрациях, в которых не вызывал снижения пролиферации. Так, в присутствии ИЛГ (4 мкг/мл) секреция всего изучаемого спектра цитокинов IL-2, IL-12p70, IFN γ , TNF α , IL-6, IL-22, IL-23, IL-17A, IL-17F, IL-17E/IL-25, GM-CSF, MIP-3a/CCL20, IL-10 была ниже контрольных показателей, при добавлении в культуру лимфоидных клеток ИЛГ в концентрациях 16-64 мкг/мл большинство цитокинов (IL-2, IL-12p70, IFN γ , TNF α , IL-23, IL-17A, IL-17F, IL-17E/IL-25, GM-CSF, MIP-3a/CCL20) не определялись. Это свидетельствует о том, что ИЛГ в диапазоне концентраций 16-128 мкг/мл проявляет селективные супрессивные свойства в отношении эффекторов адаптивного иммунитета, не затрагивая основные врожденные иммунные реакции фагоцитов.

Другие исследователи также показали эффективность ИЛГ при сепсисе, вызванным иными механизмами. Так, в модели сепсиса, вызванного перевязкой и пункцией слепой кишки, ИЛГ снижает концентрации провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, активность NO-синтазы, циклооксигеназы 2 [139], а также обладает антиоксидантными и противовоспалительными эффектами [94].

Опираясь на выявленные результаты, а также учитывая достаточно короткий период полувыведения ИЛГ [130], подобные вещества могут потенциально представлять интерес в качестве альтернативы ГКС, предотвращающей летальность при системном воспалении. Кроме того, положительным в сравнении с ГКС является то, что ИЛГ обладает прямым антистафилококковым действием. Несмотря на то, что антистафилококковая активность была не высокая, ИЛГ дозозависимо ингибировал суспензионный рост *S. aureus* ATCC 25923 в концентрациях меньше, чем МПК (8-32 мкг/мл), что позволяет предположить о

значении антибактериально активности ИЛГ в повышении выживаемости животных.

В последние годы появились публикации о том, что *S. aureus* активно избегает иммунного надзора, «выключая» различные механизмы адаптивного иммунного ответа в организме хозяина [69], что позволяет бактериям персистировать даже на фоне антигенспецифического ответа.

Известно, что пул Т-клеток, в частности - подкласс Th17, продуцирующий IL-17A, играет важную роль в защите от *S. aureus*. Установлено, что введение суммы флавоноидов *Glycyrrhiza* увеличивает секрецию IL-17 активированными КонА Т-клетками *in vitro* [17], а также в модели контактной чувствительности мышей [3]. При этом в модели генерализованной стафилококковой инфекции на фоне предварительного введения суммы флавоноидов отмечено увеличение выживаемости мышей [7]. По-видимому, ИЛГ, как один из основных флавоноидов корня *Glycyrrhiza*, может быть ответственным за механизмы выживаемости мышей в модели генерализованной стафилококковой инфекции.

Для изучения влияния ИЛГ на иммунный ответ мы использовали мышнюю модель генерализованной инфекции, в которой при заражении 5×10^8 КОЕ/мышь не наблюдалось гибели животных. Проведена оценка динамики количества клеток паразитических узлов и селезенки, а также выработки ими цитокинов после заражения.

Обращает на себя внимание тот факт, что в первые дни после заражения животных количество клеток в регионарных лимфатических узлах и селезенке было значительно меньше, чем у интактных животных. По-видимому, массированная бактериальная инвазия послужила развитию неспецифического ответа – стресс-реакции, вследствие чего причиной лимфолитического эффекта могла быть повышенная секреция кортикостероидов в первые дни септического процесса [75]. Только после 3-го дня инфекции наблюдалось постепенное нарастание количества лимфоцитов в регионарных лимфатических узлах с достижением максимальных значений на 7-й день (в контрольной группе) и на 10-й день (в группе, получавшей ИЛГ).

Известно, что при активации лимфоцитов сначала продуцируется IL-2, а потом и другие цитокины, необходимые для дифференцировки различных Th-субпопуляций. О функциональном состоянии Th-субпопуляций принято судить по продукции иммунокомпетентными клетками характерного спектра цитокинов: IFN γ служит маркером Th1, IL-4 – маркером Th2, а IL-17A – основной цитокин Th17. Th17-клетки участвуют в антистафилококковом иммунитете, усиливая эффекторную функцию нейтрофилов [91] и, таким образом, выступая наиболее важной протективной популяцией при стафилококковой инфекции. Однако, учитывая пластичность Th-субпопуляций в условиях динамично изменяющегося микроокружения *in vivo*, в эксперименте оценивались и цитокины Th17-зависимых эффекторов, таких как GM-CSF, MIP-3a/CCL20.

Исследование супернатантов клеток паховых лимфатических узлов инфицированных мышей контрольной группы выявило преобладание таких цитокинов, как IL-12p70, IFN γ , IL-6, IL-22, IL-23, IL-17A, IL-17F, IL-17E/IL-25. Это могло свидетельствовать о дифференцировке активированных CD4 $^{+}$ -клеток в Th1 и Th17. В поддержку гипотезы дифференцировки также свидетельствует увеличение сывороточных концентраций GM-CSF, а также антибактериального хемокина MIP-3a/CCL20. Растворимые компоненты *S. aureus* способствуют индукции Foxp3 $^{+}$ Treg и помимо нарастания секреции провоспалительных цитокинов в контрольной группе нами отмечено повышение секреции IL-10, который, вероятно, вырабатывался Т-регуляторными клетками, содержащими чрезмерное воспаление, супрессируя Th1 и Th17. В группе мышей, получавших ИЛГ, выявлено подавление секреции как провоспалительных (IL-2, IFN γ , IL-6, IL-17A, GM-CSF) цитокинов, так и IL-10 клетками паховых лимфатических узлов, концентрация которых была меньше контрольных значений более чем в 2 раза.

Таким образом, несмотря на наличие антибактериальных механизмов, ИЛГ потенциально мог провоцировать генерализацию инфекции. Однако при посеве крови в первые сутки инфекции бактериемия в группе контрольных мышей была значительно выше и достигала 10⁵ КОЕ/мл, тогда как на фоне введения ИЛГ на плотной среде вырастали единичные колонии, свидетельствующие о бактериемии

<10³ КОЕ/мл, в последующие дни в течение недели, как показывал посев крови, бактериемия определялась не у всех животных в обеих группах на низких уровнях (<10³ КОЕ/мл). В доступной литературе также имеются данные о способности производного ИЛГ IMRG4 уменьшать внутриклеточную инвазию *S. aureus* в клеточной линии НЕК-293, полученной из эмбриональных клеток почек человека, а также снижать бактериальную нагрузку в различных органах мышей, инфицированных *S. aureus* [19].

Учитывая, что селезенка играет важную роль в сдерживании гематогенного распространения инфекции [26], также была исследована продукция цитокинов спленоцитами на 4-5 сутки после заражения, где были получены неожиданные результаты. В селезенках обеих групп максимальное количество клеток наблюдалось на 10-й день инфекции, но в группе, получавшей ИЛГ, их количество было в 2 раза больше контрольных значений. Спленоциты мышей, которым вводили ИЛГ до заражения, достоверно увеличивали продукцию цитокинов, активирующих иммунный ответ по типу Th1 (IL12p70, TNF α , IFN γ) и Th17 (IL22, IL23, IL6, IL17). Описано предположение, что экспансия большого количества Т-клеток после стимуляции суперантigenом может вызывать истощение IL-2, тем самым ограничивая развитие защитного Т-клеточного ответа [104]. Возможно, сдерживание секреции цитокинов (в частности, IL-2) и меньшая бактериальная нагрузка на фоне введения ИЛГ способствовали более эффективному участию спленоцитов в иммунном ответе.

На фоне введения ИЛГ обращает на себя внимание более эффективный Th17 ответ с повышением цитокинов эффекторов врожденного иммунитета (GM-CSF, MIP-3 α /CCL20). Установлено, что такие хемокины как MIP-3 α /CCL20, обладают выраженной антибактериальной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [166]. Предполагают, что провоспалительные Th17-клетки первой волны активно секретируют в тканях-мишенях IL-17, который индуцирует секрецию антибактериального пептида МИР-3 α /CCL20 разнообразными клетками. Вероятно, что недостаточная активность

MIP-3 α /CCL20 может приводить к снижению опосредованного Т-клетками контроля эрадикации бактериального возбудителя.

В завершение обсуждения следует отметить, что полученные в настоящем исследовании результаты характеризуют ИЛГ как перспективную основу для дальнейшего изыскания средств для лечения стафилококковой генерализованной инфекции. Наличие прямой антибактериальной и антибиопленочной активности в отношении *S. aureus*, отсутствие подавляющего влияния на врожденные иммунные реакции, влияние на уровень цитокинов, модулирующих Th1 и Th17 иммунный ответ на ранних этапах инфекции, обуславливают необходимость дальнейших изысканий, направленных на разработку на основе ИЛГ лекарственных средств для лечения стафилококкового сепсиса с комбинированными фармакодинамическими характеристиками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе представлены результаты исследования антибактериальных и иммуномодулирующих эффектов ИЛГ при генерализованной стафилококковой инфекции мышей.

Установлено антибактериальное действие ИЛГ в отношении коллекционных штаммов и клинических изолятов *S. aureus*. В ходе экспериментов было показано, что ИЛГ обладает антистафилококковой активностью, подавляя супензионный рост и формирование бактериальных биопленок. При этом комбинации ИЛГ с антибиотиками сравнения (оксациллином и ванкомицином) проявляют антибактериальную активность в концентрациях ниже МПК в отношении некоторых штаммов.

Исследование иммунотропных эффектов ИЛГ показало, что данный полифенол не подавляет миграцию фагоцитов мышей, не снижает поглотительную активность нейтрофилов и моноцитов человека, но увеличивает продукцию ими АФК и интенсивность «кислородного взрыва». ИЛГ дозозависимо ингибирует пролиферацию активированных спленоцитов, а также секрецию ими цитокинов *in vitro*.

При генерализованной стафилококковой инфекции у мышей продемонстрировано повышение выживаемости животных на фоне предварительного внутрибрюшинного введения ИЛГ. При развитии генерализованной стафилококковой инфекции у мышей предварительное введение ИЛГ способствует подавлению продукции цитокинов группы Th-1 и Th-17 клетками регионарных лимфатических узлов, увеличивает продукцию цитокинов-регуляторов Th-1 ответа, Th-17 ответа спленоцитами.

Результаты настоящего исследования расширяют имеющиеся представления о фармакодинамике ИЛГ и являются основой для дальнейшего изучения антимикробных и иммуномодулирующих эффектов данного полифенола при других бактериальных инфекциях.

ВЫВОДЫ:

- ИЛГ обладает низкой антибактериальной активностью, ингибируя супензионный рост *S. aureus* ATCC 25923 и клинических изолятов 1, 6, 74, 77, 83 при МПК = 64 мкг/мл, а штаммов ATCC 29213, ATCC 4330, 10 при МПК = 128 мкг/мл; комбинации «ИЛГ + оксациллин/ванкомицин» не снижают активность антибиотиков *in vitro* и могут уменьшать МПК оксациллина/ванкомицина в отношении некоторых штаммов;
- ИЛГ дозозависимо ингибирует формирование бактериальной биопленки *S. aureus* ATCC 25923; комбинация «ИЛГ + оксациллин» в концентрациях меньших, чем МПК, подавляет образование бактериальных биопленок *S. aureus* ATCC 25923 и *S. aureus* 1, а комбинация «ИЛГ + ванкомицин» - *S. aureus* 1;
- ИЛГ дозозависимо подавляет пролиферацию КонА-активированных спленоцитов мышей Balb/C *in vitro*, а также секрецию ими цитокинов;
- ИЛГ не подавляет пептон-индуцированную миграцию фагоцитов в брюшную полость мышей Balb/C, не ингибирует поглотительную активность фагоцитов крови человека в отношении *S. aureus* ATCC 25923, но дозозависимо увеличивает продукцию АФК и интенсивность «кислородного взрыва»;
- предварительное внутрибрюшинное введение ИЛГ повышает выживаемость мышей Balb/C при генерализованной стафилококковой (ATCC 25923) инфекции, подавляя на ранних сроках ее развития продукцию цитокинов клетками лимфатических узлов и увеличивая секрецию спленоцитами IL-10, а также цитокинов-регуляторов Th1 (IL-2, IL-12p70, IFN γ) и Th17 (IL-22, IL-23, IL-17A, IL-17F, MIP-3a/CCL20) иммунного ответа.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
- БМХ – бульон Мюллера-Хинтона
- ГКС - глюкокортикоиды
- ДГР 123 –дигидрородамин 123
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ИЛГ – изоликвиритигенин
- ИС – индекс стимуляции
- КОЕ – колониеобразующие единицы
- КонА – конканавалин А
- МПК – минимальная подавляющая концентрация
- МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенил-тетразолиум бромид
- ФИТЦ – флюоресцеинизотиоцианат
- ФМА - форбол-12-миристат-13-ацетат
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- E. coli* - *Escherichia coli*
- IFN γ - интерферон-гамма
- IL - интерлейкин
- МIP-3 α / CCL20 - макрофагальный белок воспаления-3 α / хемокиновый лиганд (CC) 20
- C. albicans* - *Candida albicans*
- F. nucleatum* - *Fusobacterium nucleatum*
- K. pneumoniae* - *Klebsiella pneumoniae*
- M. tuberculosis* - *Mycobacterium tuberculosis*
- MRSA – метициллинрезистентный *Staphylococcus aureus*
- MSSA – метициллинчувствительный *Staphylococcus aureus*

OD – оптическая плотность

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

P. gingivalis - *Porphyromonas gingivalis*

S. anginosus - *Streptococcus anginosus*

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

S. mutans - *Streptococcus mutans*

S. pyogenes - *Streptococcus pyogenes*

S. sobrinus - *Streptococcus sobrinus*

S. xylosus – *Staphylococcus xylosus*

SD – стандартное отклонение

Th - Т-хелперы

TLR - Toll-подобные рецепторы

TNF α – фактор некроза опухоли альфа

VISA – умеренно чувствительный к ванкомицину *Staphylococcus aureus*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными»: межгос. Стандарт Рос. Федерации / разраб. Неком. партнерством "Объед. специалистов по раб. с лаб. животными" (Rus-LASA). — Введ. 2016-07-01. — Изд. офиц. — Москва : Стандартинформ, 2015. — 7 с. Изд. офиц. — Москва : Стандартинформ, 2019. — 17 с.
2. Ивановская, Т.Е. Особенности современного сепсиса у детей / Т. Е. Ивановская, Е. Л. Кипарисова // Архив патологии. — 1982. — № 3. — С. 48–53.
3. Механизмы иммуносупрессивной активности флавоноидов корня солодки при контактной чувствительности у мышей / С. И. Павлова, Д. З. Албегова, А. А. Кягова, И. Г. Козлов // Российский иммунологический журнал. — 2010. — Т. 4. — № 3 — С. 248-254.
4. Мишнев, О.Д. Современные подходы в клинико-морфологической диагностике и лечении заболеваний человека / О. Д. Мишнев, Л. М. Гринберг, Л. В. Леонова. — СПб., 2015.
5. Овцына, А. О. Структура, функции и возможность практического применения сигнальных молекул, инициирующих развитие бобово-ризобиального симбиоза / А. О. Овцына, И. А. Тихонович // Экологическая генетика. — 2004. — Т. 2. — № 3.
6. Онлайн-платформа анализа данных резистентности к антимикробным препаратам в России. — 2021. — URL: AMRmap.ru (дата обращения 27.10.2021)
7. Павлова, С.И. Иммуносупрессивные и противоопухолевые фармакодинамические эффекты флавоноидов корней солодки: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.06, 14.03.09 / Павлова Светлана Ивановна. — Москва, 2012. 236 с.
8. Патологическая анатомия болезней плода и ребенка. Руководство для врачей / Ивановская Т.Е., Леонова Л.В. (ред.). — М., 1989. — Т. 2. — 416 с.
9. Патология тимуса у детей / Т. Е. Ивановская, О. В. Зайратьянц, Л. В. Леонова [и др.]. — СПб.: СОТИС, 1996.

10. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека / Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В. [и др.]. — Москва: ГНЦ Институт иммунологии МЗ РФ, 2001.
11. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи: Российские клинические рекомендации / [С. В. Яковлев и др.]; под ред. С. В. Яковлева. — М.:Изд-во «Перо», 2018. – 156 с.
12. Protective effect of Jie-Geng-Tang against *Staphylococcus aureus* induced acute lung injury in mice and discovery of its effective constituents / Y. Liu, Z. Hong, J. Qian [et al.] // *J Ethnopharmacol.* — 2019. — Vol. 243. — № 28.
13. Флавоноиды корня солодки подавляют индуцированную *in vitro* и *in vivo* пролиферацию лимфоцитов / С. И. Павлова, И. В. Гладков, А. А. Кягова, И. Г. Козлов // Российский иммунологический журнал. — 2007. — № 1. — С. 279-282.
14. Савельева, М. И. Возможности фармакокинетического моделирования венотоников на примере флавоноидов / М. И. Савельева, Д. А. Сычев // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2018. — Том 24. — № 4. — С. 76-79.
15. Флавоноиды как потенциальные иммуносупрессанты, воздействующие на внутриклеточные сигнальные пути (обзор) / С. И. Павлова, Д. З. Албегова, Ю. С. Воробьев [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. — 2015. — Т.49. — №10. — С. 3-10.
16. Флавоноиды корня солодки влияют на функции активированных Т-лимфоцитов мыши и человека / С. И. Павлова, Д. З. Албегова, Н. В. Дмитриева [и др.] // Российский иммунологический журнал. — 2011. — Т. 5. — № 14. — С. 62-68.
17. Флавоноиды корня солодки и функции фагоцитов / С.И. Павлова, Р.С. Насибов, М.А. Тимаков [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. — 2009. — Том 24. — № 2-1. — С. 50-51.
18. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилов, Е.Н. Музрафов. — Пущино, 2013.

19. A novel bi-functional chalcone inhibits multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and potentiates the activity of fluoroquinolones / V. K. Gupta, R. Gaur, A. Sharma [et al.] // Bioorg Chem. — 2019. — Vol. 83. — P. 214-225.
20. A review: The pharmacology of isoliquiritigenin / F. Peng, Q. Du, C. Peng [et al.] // Phytother. Res. — 2015. - № 29. -P. 969–977.
21. Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK-STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses / A. Majoros, E. Platanitis, E. Kernbauer-Hölzl [et al.] // Front Immunol. — 2017. – Vol. 8. – № 29.
22. Alarcon de la Lastra, C. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications / C. Alarcon de la Lastra, I. Villegas // Biochemical Society Transactions. — 2007. — Vol. 35. — № 5.
23. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps / K. Beiter, F. Wartha, B. Albiger [et al.] // Curr Biol. — 2006. — Vol. 16. — P.401–407.
24. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus* / J. H. Lee, J. H. Park, H. S. Cho [et al.] // Biofouling. — 2013. — Vol. 5. — № 29. — P. 491-499.
25. Anti-methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds from *Bauhinia kockiana* Korth and their mechanism of antibacterial activity / Y. L. Chew, A. M. Mahadi , K. M. Wong, J. K.Goh // BMC Complement Altern Med. — 2018. — Vol. 18. — № 1. — P. 70.
26. Antiviral and Antimicrobial Activities of Licorice, a Widely-Used Chinese Herb / L. Wang, R. Yang, B. Yuan [et al.] // Acta Pharmaceutica Sinica B. — 2015. — Vol .5. — № 4. — P.310-315.
27. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections / S. J. McConoughey, R. Howlin, J. F. Granger [et al.] // Future Microbiol. — 2014. — Vol. 9. — P. 987–1007.
28. Biotransformation of the chemopreventive agent 4,2',4'-trihydrozachalcone (isoliquiritigenin) by UDP-glucuronosyltransferases / J. Guo, A. Liu, H. Cao [et al.] // Drug Metab Dispos. — 2008 – Vol. 36. — № 10.— P. 2104–2112.

29. Blockade of TLR9 agonist-induced type I interferons promotes inflammatory cytokine IFN-gamma and IL-17 secretion by activated human PBMC / J. A. Meyers, A. J. Mangini, T. Nagai [et al.] // Cytokine. — 2006. — Vol.35. — № 5–6. — P. 235–246.
30. Calabrese, E.J. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance / E. J. Calabrese, M. P. Mattson, V. Calabrese // Hum Exp Toxicol. — 2010. — Vol. 29. — № 12. — P.980-1015.
31. Cancer chemopreventive activity and metabolism of isoliquiritigenin, a compound found in licorice / M. Cuendet, J. Guo, Y. Luo [et al.] // Cancer Prev. Res. – 2010. -№ 3. – P. 221–232.
32. Chen, P. Differences Between Murine and Human Sepsis / P. Chen, M. Stanojcic, M. G. Jeschke // Surgical Clinics of North America. — 2014. — Vol. 94. — № 6. — P.1135-1149.
33. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children / C. Liu, A. Bayer, S. E. Cosgrove [et al.] // Clin Infect Dis. —Vol. 52. — №3. —P. 18–55.
34. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study / D. R. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B [et al.] // Arch Intern Med. – 2009. - № 169. P. 463–473.
35. CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline. — 2004. — URL: <https://www.semanticscholar.org/paper/Method-for-antifungal-disk-diffusionsusceptibility-Rex-Clinical/65de3bf5c2b026c9e3b0995780e7fa790e7c0295> (дата обращения 06.08.2020).
36. Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* / F.R. DeLeo, M. Otto, B.N. Kreiswirth, H.F.Chambers // Lancet. - 2010. - № 375. -P. 1557–1568.
37. Comparison of Single and Combined Use of Catechin, Protocatechuic, and Vanillic Acids as Antioxidant and Antibacterial Agents against Uropathogenic *Escherichia Coli* at Planktonic and Biofilm Levels / A. T. Bernal-

Mercado, F. J. Vazquez-Armenta, M. R. Tapia-Rodriguez [et al.] // Molecules. — 2018. — Vol. 23. — № 11.

38. Cushnie, T. P. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss / T. P. Cushnie, A. J. Lamb // J. Ethnopharmacol. — 2005. — Vol. 101. — P. 243–248.
39. Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria / J. M. Doisne, V. Soulard, C. Becourt [et al.] // J Immunol. — 2011. — Vol. 186. - № 2. — P. 662–666.
40. D. Kunthalert, S. Baothong, P. Khetkam, A chalcone with potent inhibiting activity against biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenza*, Microbiol Immunol., 58(10), 581-589 (2014).
41. Daidzein pretreatment improves survival in mouse model of sepsis / S. Parida, T.U. Singh, R. Thangamalai [et al.] // J Surg Res. — 2015. — Vol. 197. — № 2. — P. 363-373.
42. Daidzein pretreatment improves survival in mouse model of sepsis / S. Parida, T.U. Singh, R. Thangamalai [et al.] // J Surg Res. — 2015. — Vol. 197. — № 2. — P. 363-373.
43. De Jong, N. W. M. Immune Evasion by *Staphylococcus aureus* / N. W. M. de Jong, K. P. M. van Kessel, J. A. G. van Strijp // Microbiol Spectr. — 2019. — Vol. 7. — № 2.
44. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses / H. Ishigame, S. Kakuta, T. Nagai [et al.] // Immunity. — 2009. — Vol. 30. — № 1. — P. 108–119.
45. Drug Resistance Reversal Potential of Isoliquiritigenin and Liquiritigenin Isolated from *Glycyrrhiza glabra* Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / R. Gaur, V. K. Gupta, P. Singh [et al.] // Phytother Res. — 2016. — Vol. 30. — № 10. — P. 1708-1715.
46. Duda-Chodak, A. The inhibitory effect of polyphenols on humangut microbiota / A. Duda-Chodak // J Physiol Pharmacol. — 2012. — Vol. 63. — № 5. — P. 497-503.

47. Effect of Catechins, Green tea Extract and Methylxanthines in Combination with Gentamicin Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: - Combination therapy against resistant bacteria / B. S. Fazly Bazzaz , S. Sarabandi, B. Khameneh, H. Hosseinzadeh // . — 2016 . — Vol. 19. — № 4. — P. 312-318.
48. Effect of Soy Isoflavones on Growth of Representative Bacterial Species from the Human Gut / L. Vazquez, A.B. Florez, L. Guadamuro, B. Mayo // Nutrients. — 2017.— Vol. 9. — № 7.
49. Effects of coadministration of natural polyphenols with doxycycline or calcium modulators on acute *Chlamydia pneumoniae* infection in vitro / O. P. Salin, L. L. Pohjala, P. Saikku, H. J. Vuorela // J Antibiot. — Vol. 64. — № 11. — P. 747-752.
50. Eghbaliferiz, S. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals / S. Eghbaliferiz, M. Iranshahi // Phytother Res. — 2016. — Vol. 30. — № 9. — P. 1379-1391.
51. Enhancement of gastrointestinal absorption of isoliquiritigenin by nanostructured lipid carrier / X. Zhang, H. Qiao, T. Zhang [et al.] // Adv. Powder Technol. – 2014. - №25. – P. 1060–1068.
52. Enhancement of gastrointestinal absorption of isoliquiritigenin by nanostructured lipid carrier / X. Zhang, H. Qiao, T. Zhang [et al.] // Adv. Powder Technol. — 2014. — Vol. 25. — P. 1060–1068.
53. Enhancement of Oral Bioavailability and Anti-hyperuricemic Activity of Isoliquiritigenin via Self-Microemulsifying Drug Delivery System / K. Zhang, Q. Wang, Q. Yang [et al.] // AAPS PharmSciTech. — 2019. — Vol. 20. — № 5. — P. 218.
54. Epigallocatechin Gallate Remodels Overexpressed Functional Amyloids in *Pseudomonas aeruginosa* and Increases Biofilm Susceptibility to Antibiotic Treatment / M. Stenvang, M. S. Dueholm, B. S. Vad [et al.] // J Biol Chem. — 2016. — Vol. 291. — № 51. — P. 26540-26553.
55. Epigallocatechin-3-gallate alleviates paraquat-induced acute lung injury and inhibits upregulation of toll-like receptors / H. Shen, N. Wu, Z. Liu [et al.] // Life Sci. — 2017. —Vol. 170. — № 1. — P. 25-32.

56. Espin, J. C. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols / J.C. Espin, A. Gonzalez-Sarrias, F. A. Tomas-Barberan // Biochem Pharmacol. — 2017. — Vol. 139. — № 1. — P. 82-93.
57. Estrogenic and antiproliferative activities of isoliquiritigenin in mcf7 breast cancer cells / M. Maggiolini, G. Statti, A. Vivacqua [et al.] // J. Steroid. Biochem. — 2002. - № 82. P. 315–322.
58. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). European Centre for Disease Prevention and Control. — 2018. — URL: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx> (дата обращения 27.10.2021)
59. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes / Chung Y, Yang X, Chang SH [et al.] // Cell Res. — 2006. — Vol. 16. — № 11. — P. 902–907.
60. Feldman, I. M. Comparative evaluation of two structurally related flavonoids, isoliquiritigenin and liquiritigenin, for their oral infection therapeutic potential / I. M. Feldman, J. Santos, D. Grenier // J Nat Prod. — 2011. — Vol. 74. — № 9. — P. 1862-1867.
61. Fitness cost: a bacteriological explanation for the demise of the first international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic / K. L. Nielsen, T. M. Pedersen, K. I. Udekwu [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. — 2012. — Vol. 67. — P. 1325–1332.
62. Flavonoids and 5-aminosalicylic acid inhibit the formation of neutrophil extracellular traps / T. Kirchner, E. Hermann, S. Moller [et al.] //Mediators Inflamm. — 2013.
63. Flavonoids from the halophyte *Apocynum venetum* and their antifouling activities against marine biofilm-derived bacteria / N.N. Kong, S. T. Fang, Y. Liu [et al.] // Nat Prod Res. — 2014. — Vol. 28. — № 12. — P. 928-931.
64. Flavonoids from *Sophora moorcroftiana* and their synergistic antibacterial effects on MRSA / S. Y. Wang, Z. L. Sun, T. Liu [et al.] // Phytother Res. — 2014. —Vol. 28. — № 7. — P. 1071-1076.

65. Fraser, J.D. Clarifying the Mechanism of Superantigen Toxicity / J. D. Fraser // PLoS Biology. — 2011. — Vol.9. — № 9.
66. Fraser, J.D. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins / J. D. Fraser, T. Proft // Immunol Rev. — 2008. — Vol. 225. — P. 226–243.
67. Glucuronides of phytoestrogen flavonoid enhance macrophage function via conversion to aglycones by β -glucuronidase in macrophages / A. Kaneko, T. Matsumoto, Y. Matsubara [et al.] // Immun Inflamm Dis. — 2017. — Vol. 5. — № 3. — P. 265-279.
68. Glycyrrhiza uralensis flavonoids present in anti-asthma formula, ASHMITM, inhibit memory Th2 responses in vitro and in vivo /N. Yang, S. Patil, J. Zhuge [et al.] // Phytother Res. — 2013. —Vol. 27. — № 9. — P. 1381-1391.
69. Goldmann, O. Staphylococcus aureus strategies to evade the host acquired immune response / O. Goldmann, E. Medina // Int J Med Microbiol. — 2017. — Vol. 308. — № 6. — P. 625–630.
70. Goriely, S. Interleukin-12 family members and type I interferons in Th17-mediated inflammatory disorders / S. Goriely, R. Cavoy, M. Goldman // Allergy. — 2009. — Vol. 64. — № 5. — P. 702–709.
71. Grela, E. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review / E. Grela, J. Kozłowska, A. Grabowiecka // Acta Histochemica. — 2018. — Vol.120. —№ 4. — P.303-311.
72. Hirohata, S. Suppressive influences of IFN-alpha on IL-17 expression in human CD4+ T cells / S. Hirohata, H. Shibuya, S. Tejima // Clin Immunol. — 2010. —Vol. 134. — № 3. — P. 340–344.
73. Host response signature to Staphylococcus aureus alpha-hemolysin implicates pulmonary Th17 response / K. M. Frank, T. Zhou, L. Moreno-Vinasco [et al.] // Infect Immun. — 2012. — Vol. 80. — № 9. — P. 3161–3169.
74. Hostetler, G. L. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity / G. L. Hostetler, R. A. Ralston, S. J. Schwartz // Adv Nutr. — 2017. — Vol. 8. — № 3. — P. 423-435.

75. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in lethal canine *Staphylococcus aureus* pneumonia / I. Cortes-Puch, C. W. Hicks, J. Sun [et al.] // Am J Physiol Endocrinol Metab. — 2014. — Vol. 307. — № 11. — P.E994-E1008.
76. IFN- alpha blocks IL-17 production by peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic active hepatitis B Infection / F. Cui, J. Meng, P. Luo, P. Chen // BMC Infect Dis. — 2014. — Vol. 55. — № 14.
77. IgG opsonization of bacteria promotes Th17 responses via synergy between TLRs and FcgammaRIIa in human dendritic cells / J. den Dunnen, L. T. Vogelpoel, T. Wypych [et al.] // Blood. — 2012. — Vol. 120. — № 1. — P. 112–121.
78. IL-27, a cytokine, and IFN-lambda1, a type III IFN, are coordinated to regulate virus replication through type I IFN / Y. Cao, R. Zhang, W. Zhang [et al.] // J Immunol. — 2014. — Vol. 192. — № 2. — P. 691–703.
79. In vitro activity and In vivo efficacy of Isoliquiritigenin against *Staphylococcus xylosus* ATCC 700404 by IGPD target / Q. Qu, J. Wang, W. Cui [et al.] // PLoS One. — 2019. — Vol. 14. — № 12.
80. In Vitro Antistaphylococcal Synergistic Effect of Isoflavone Metabolite Demethyltexasin with Amoxicillin and Oxacillin / J. Rondevaldova, J.Hummelova, J. Tauchen, L. Kokoska // Microb Drug Resist. — 2018. — Vol. 24. — № 1. — P. 24-29.
81. In vitro effects of anthocyanidins on sinonasal epithelial nitric oxide production and bacterial physiology / B. M. Hariri, S. J. Payne, B. Chen [et al.] // Am J Rhinol Allergy. — 2016. — Vol. 30. — № 4. — P. 261-268.
82. In vitro effects of the citrus flavonoids diosmin, naringenin and naringin on the hepatic drug-metabolizing CYP3A enzyme in human, pig, mouse and fish / V. Burkina, V. Zlabek, R. Halsne [et al.] // Biochem Pharmacol. — 2018. — Vol. 110. — P. 109-116.
83. In vitro metabolism of isoliquiritigenin by human liver microsomes / J. Guo, D. Liu, D. Nikolic [et al.] // Drug Metab Dispos. — 2008. — Vol. 36. — № 2. — P. 461–468.
84. In Vitro Synergism and Anti-biofilm Activity of Quercetin-Pivaloxymethyl Conjugate against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* Species / M. K. Kim, T. G.

Lee, M. Jung [et al.] // Chem Pharm Bull (Tokyo). —2018. — Vol. 66. — № 11. — P. 1019-1022.

85. In vivo prediction of CYP-mediated metabolic interaction potential of formononetin and biochanin A using in vitro human and rat CYP450 inhibition data / S. Arora, I. Taneja, M. Challagundla [et al.] // Toxicol Lett. — 2015. — Vol. 239. — № 1. — P. 1-8.

86. Influence of natural and synthetic compounds on cell surface expression of cell adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1 / S. Tanaka, Y. Sakata, K. Morimoto [et al.] // Planta Med. — 2001. — Vol. 67. — № 2. — P. 108-113.

87. Influence of renal function on the steady-state pharmacokinetics of the antiarrhythmic propafenone and its phase I and phase II metabolites / M. F. Fromm, S. Botsch, G. Keinkele [et al.] // Eur J Clin Pharmacol. — 1995. — Vol. 48. — № 3-4. — P. 279–283

88. Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice / A. Kudva, E. V. Scheller, K. M. Robinson [et al.] // J Immunol. — 2011. — Vol. 186. — № 3. — P. 1666–1674.

89. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides / S. C. Liang, X. Y. Tan, D. P. Luxenberg [et al.] // J Exp Med. — 2006. — Vol. 203. — № 10. — P. 2271–2279.

90. Intraperitoneal Injection of Lipopolysaccharide Induces Dynamic Migration of Gr-1^{high} Polymorphonuclear Neutrophils in the Murine Abdominal Cavity / S. Miyazaki, F. Ishikawa, T. Fujikawa [et al.] // Clinical Diagn Lab Immunol. — 2004. — Vol. 11. — № 3. — P. 452–457.

91. Isoflavones Enhance interleukin-17 Gene Expression via Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptors α and γ / H. Kojima, Y. Takeda, R. Muromoto [et al.] // Toxicology. — 2015. — № 329. — P. 32-39.

92. Isolation, identification and characterization of apigenin from *Justicia gendarussa* and its anti-inflammatory activity / K.S. Kumar, V. Sabu, G. Sindhu [et al.] // Int Immunopharmacol. — 2018. — Vol. 59. — P. 157-167.

93. Isoliquiritigenin attenuates spinal tuberculosis through inhibiting immune response in a New Zealand white rabbit model / W. Wang, B. Yang, Y. Cui, Y. Zhan // Korean J Physiol Pharmacol. — 2018. — Vol. 22. — № 4. — P. 369-377.
94. Isoliquiritigenin inhibits IkappaB kinase activity and ROS generation to block TNF-alpha induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells / S. Kumar, A. Sharma, B. Madan [et al.] // Biochemical Pharmacology. — 2007. — Vol. 73. — №10. — P.1602-1612.
95. Isoliquiritigenin inhibits TNF- α -induced release of high-mobility group box 1 through activation of HDAC in human intestinal epithelial HT-29 cells / J.-H. Chi, G. S. Seo, J. H. Cheon, S. H. Lee // Eur J Pharmacol. — 2017. — Vol. 796. — P. 101-109.
96. Isoliquiritigenin Protects Against Sepsis-Induced Lung and Liver Injury by Reducing Inflammatory Responses / X. Chen, X. Cai, R. Le [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2018. — Vol. 496. — № 2. — P.245-252.
97. Isoliquiritigenin suppresses human T Lymphocyte activation via covalently binding cysteine 46 of I κ B kinase / F. Yan, F. Yang, R. Wang [et al.] // Oncotarget. — 2017. — Vol. 21. — № 8. — P. 34223-34235.
98. Isoliquiritigenin treatment induces apoptosis by increasing intracellular ROS levels in HeLa cells / X. Yuan, B. Zhang, N. Chen [et al.] // J Asian Nat Prod Res. — 2012. — Vol.14. — № 8. — P. 789-798.
99. Isotrifoliol inhibits pro-inflammatory mediators by suppression of TLR/NF- κ B and TLR/MAPK signaling in LPS-induced RAW264.7 cells / H. Li, J.H.Yoon, H.J.Won [et al.] // Int Immunopharmacol. — 2017. — Vol. 45. — P. 110-119.
100. Jung, J. Y. The presence of interleukin-27 during monocyte-derived dendritic cell differentiation promotes improved antigen processing and stimulation of T cells / J. Y. Jung, L. L. Roberts, C. M. Robinson // Immunology. — 2015. — Vol. 144. — № 4. — P. 649–660.
101. Kobayashi, S.D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses / S. D. Kobayashi, N. Malachowa, F.R. DeLeo // Am J Pathol. – 2015. – Vol. 185. - № 6. – P. 1518–1527.

102. Kroemer, H.K. Glucuronidation of drugs. A re-evaluation of the pharmacological significance of the conjugates and modulating factors / H. K. Kroemer, U. Klotz // Clin Pharmacokinet. — 1992. — Vol. 23. — № 4. — P. 292–310.
103. Lee, S. Antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its synergism with β -lactam antibiotics sensitizing carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* / S. Lee, G. S .Razqan, D. H. Kwon // Phytomedicine. — 2017. — Vol. 24. —P. 49-55.
104. Llewelyn, M. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity / M. Llewelyn, J. Cohen // The Lancet Infectious Diseases. — 2002. — Vol. 2. — № 3. — P.156-162.
105. Luteolin attenuates neutrophilic oxidative stress and inflammatory arthritis by inhibiting Raf1 activity / S. C. Yang, P.-J. Chen, S.-H. Chang [et al.] // BiochemPharmacol. — 2018. — Vol. 154. — P. 384-396.
106. Luteolin decreases the attachment, invasion and cytotoxicity of UPEC in bladder epithelial cells and inhibits UPEC biofilm formation / X. F. Shen, L. B. Ren, Y. Teng [et al.] // Food Chem Toxicol. – 2014. – Vol 72. – P. 204-211.
107. Madrigal-Perez, L.A. Resveratrol Inhibition of Cellular Respiration: New Paradigm for an Old Mechanism / L. A. Madrigal-Perez, M. Ramos-Gomez // Int J Mol Sci. — 2016. — Vol.17. — № 3. — P. 368.
108. Magrone, T. Sepsis: From Historical Aspects to Novel Vistas. Pathogenic and Therapeutic Considerations / T. Magrone, E. Jirillo // Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets. — 2019. — Vol. 19. — № 4. — P.490-502.
109. Mechanical and aesthetics compatibility of Brazilian red propolis micellar nanocomposite as a cavity cleaning agent / I. C. C. de Moraes Porto, D. C. C. de Almeida, G. V. C. de Oliveira Costa [et al.] // BMC Complement Altern Med. — 2018. —Vol. 18. — № 1.
110. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus* / H. McCarthy, J. K. Rudkin, N. S. Black [et al.] // Fronties in Cellular and Infection Microbiology. — 2015. — Vol.5. — № 1.

111. Modulatory potential of resveratrol during lung inflammatory disease / J. E. Vargas, A. A. Souto, P. M. C. Pitrez [et al.] // Med Hypotheses. — 2016. — Vol. 96. — P. 61-65.
112. Montgomery, C. P. Host factors that contribute to recurrent staphylococcal skin infection / C. P. Montgomery, M. Z. David, R. S. Daum // Curr Opin Infect Dis. — 2015. — Vol. 28. — № 3. — P. 253–258.
113. N. Buathong, S. Poonyachoti, C. Deachapunya, Anti-inflammatory Effect of Genistein in Human Endometrial Cell Line Treatment with Endotoxin Lipopolysaccharide, J Med Assoc Thai., 8 (99), 134-141 (2016).
114. N.A. El-Shitany, B. Eid, Proanthocyanidin protects against cisplatin-induced oxidative liver damage through inhibition of inflammation and NF-κβ/TLR-4 pathway, Environ Toxicol., 32(7), 1952-1963 (2017).
115. Naringin Decreases TNF- α and HMGB1 Release from LPS-Stimulated Macrophages and Improves Survival in a CLP-Induced Sepsis Mice / M. Gil, Y.K. Kim, S.B.Hong, K.J. Lee // PLoS One. — 2016. — Vol. 10. — № 11. — P. 164-186.
116. Natural molecules induce and synergize to boost expression of the human antimicrobial peptide β-defensin-3 / E. Sechet, E. Telford, C. Bonamy // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2018. — Vol. 115. — № 4. — P. 9869-9878.
117. NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans / G. P. Fadini, L. Menegazzo, M. Rigato [et al.] // Diabetes. — 2016. — Vol. 65. — P.1061–1071.
118. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview / V. Delgado-Rizo, M. A. Martinez-Guzman, L. Iniguez-Gutierrez [et al.] //Front Immunol. — 2017. — Vol. 8. — № 81.
119. New Isoflavonoids from the extract of Rhynchosia precatoria (Humb. & Bonpl. ex Willd.) DC. and their antimycobacterial activity / E. W. Coronado-Aceves, G. Gigliarelli, A. Garibay-Escobar [et al.] // J Ethnopharmacol. — 2017. — Vol. 12. — P. 92-100.
120. Newly-synthesized chalcones-inhibition of adherence and biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus / D.D. Bozic, M. Milenkovic, B. Ivkovic, I. Cirkovic // Braz J Microbiol. — 2014. — Vol. 45. — № 1. — P. 263-270.

121. Nlrp-3-driven interleukin 17 production by gammadeltaT cells controls infection outcomes during *Staphylococcus aureus* surgical site infection / B. M. Maher, M. E. Mulcahy, A. G. Murphy [et al.] // Infect. Immun. — 2013. — Vol. 81. — № 12. — P. 4478–4489.
122. Novel strategy for biofilm inhibition by using small molecules targeting molecular chaperone DnaK / K. Arita-Morioka, K. Yamanaka, Y. Mizunoe [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. — 2015. — Vol. 1. — № 59. — P. 633-641.
123. O’Riordan, K. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides / K. O’Riordan, J. C. Lee // Clin Microbiol Rev. — 2004. — Vol. 17. — № 1. — P. 218–234.
124. Oenothein B, a cyclic dimeric ellagitannin isolated from *Epilobium angustifolium*, enhances IFN γ production by lymphocytes / A. G. Ramstead, I. A. Schepetkin, M. T. Quinn, M. A. Jutila // PLoS One. — 2012. — Vol. 11. — № 7.
125. Ouyang, W. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation / W. Ouyang, J. K. Kolls, Y. Zheng // Immunity. — 2008. — Vol. 28. — № 4. — P. 454–467.
126. P. Marinelli, I. Pallares, S. Navarro, S. Ventura, Dissecting the contribution of *Staphylococcus aureus* α -phenol-soluble modulins to biofilmamyloid structure, Sci Rep., 6 (2016).
127. Park, S.-J. Suppression of homodimerization of toll-like receptor 4 by isoliquiritigenin / S.-J. Park, H.-S. Youn // Phytochemistry. — 2010. — Vol. 71. — № 14-15. — P. 1736-1740.
128. Park, S.-J. Suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of toll-like receptors by isoliquiritigenin in RAW264.7 macrophages / S.-J. Park, H.-Y. Song, H.-S. Youn // Mol Cells. — 2009. — Vol. 28. — № 4. — P. 365-368.
129. Pharmacokinetic Study of Bioactive Flavonoids in the Traditional Japanese Medicine Keigairengyoto Exerting Antibacterial Effects against *Staphylococcus aureus* / T. Matsumoto, A. Kaneko, J. Koseki [et al.] // Int J Mol Sci. — 2018. — Vol. 19. — № 2.

130. Pharmacokinetics, biodistribution and bioavailability of isoliquiritigenin after intravenous and oral administration / H. Qiao, X. Zhang, T. Wang [et al.] // Pharm Biol. — 2014. — Vol. 52. — № 2. — P. 228-236.
131. Potential cancer chemopreventive constituents of the seeds of dipteryx o dorata (tonka bean) / D.S. Jang, E. J. Park, M. E. Hawthorne [et al.] // J. Nat. Prod. — 2003. - № 66. — P. 583–587.
132. Potential cancer chemopreventive constituents of the seeds of dipteryx o dorata (tonka bean) / D. S. Jang, E. J. Park, M. E. Hawthorne [et al.] // J. Nat. Prod. — 2003. — Vol. 66. — P. 583–587.
133. Preclinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Characterization of Selected Chiral Flavonoids: Pinocembrin and Pinostrobin / C.L. Sayre, S. Alrushaid, S. E. Martinez [et. al.] // J Pharm Pharm Sci. — 2015. — Vol. 18. — № 4. —P. 368-395.
134. Preiser, J.-C. Oxidative stress / J.-C. Preiser // J Parenter Enteral Nutr. — 2012. — Vol. 36. — № 2. — P. 147-154.
135. Preparation and evaluation of isoliquiritigenin-loaded F127/P123 polymeric micelles / Y.-J. Xie, Q.-L. Wang , M. Adu-Frimpong [et al.] // Drug Dev Ind Pharm. — 2019. — Vol. 45. — № 8. — P. 1224-1232.
136. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus* / G. Yunlei, S. Guanghui, S. Meiling [et al.] // Front Cell Infect Microbiol. — 2020. - Vol. 10. - №107.
137. Probiotic Lactobacillus rhamnosus inhibits the formation of neutrophil extracellular traps / L. Vong, R. J. Lorentz, A. Assa [et al.] // J Immunol. — 2014. – Vol. 192. – P. 1870–1877.
138. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxy radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics / G. Galati, O. Sabzevari, J. X. Wilson, P. J. O'Brien // Toxicology. — 2002. — Vol.177. — № 1. — P. 91-104.
139. Protective effect of isoliquiritigenin against cerebral injury in septic mice via attenuation of NF-κB / P. Zou, H. M. Ji, J. W. Zhao [et al.] // Inflammopharmacology. — 2019. — Vol. 27. — № 4. — P.809-816.

140. Protective effect of Jie-Geng-Tang against *Staphylococcus aureus* induced acute lung injury in mice and discovery of its effective constituents / Y.Liu, Z. Hong, J. Qian [et al.]// *J Ethnopharmacol.* — 2019. — Vol. 243. — № 28.
141. Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* / J. Ouyang, F. Sun, W. Feng [et al.] // *J Appl Microbiol.* — 2016. — Vol. 120. — № 4. — P. 966-974.
142. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention / M. Cuendet, C. P. Oteham, R. C. Moon, J. M. Pezzuto // *J. Nat. Prod.* – 2006. № 69.- P. 460–463.
143. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention / M. Cuendet, C. P. Oteham, R. C. Moon, J. M. Pezzuto // *J. Nat. Prod.* — 2006. — Vol. 69. — № 3. — P. 460–463.
144. Reactive oxygen species in the immune system / Y. Yang, A. V. Bazhin, J. Werner, S. Karakhanova // *Int Rev Immunol.* – 2013. — Vol. 32. — №3. — P. 249-270.
145. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus* / H. K. Kim , V. Thammavongsa, O. Schneewind, D. Missiakas // *Current Opinion in Microbiology* — 2012. — Vol. 15. — № 1. — P. 92-99.
146. Reinvestigation of the Synthesis of Isoliquiritigenin: Application of Horner–Wadsworth–Emmons Reaction and Claisen–Schmidt Condensation / S. Sano, Y. Okubo, A. Handa [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* – 2011. — Vol. 59. — № 7. — P. 885–888.
147. Relation of Human Neutrophil Phorbol Ester Receptor Occupancy and NADPH-Oxidase Activity / A. I. Tauber, D. B. Brettler, E. A. Kennington, P. M. Blumberg // *Blood.* — 1982. — Vol. 60. — № 2. — P. 333-339.
148. Rigby, K. M. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections / K. M. Rigby, F. R. DeLeo - *Semin Immunopathol.* – 2012. - Vol. 34. - № 2. – P. 237–259.
149. Role of Interleukin-17A in Cell-Mediated Protection against *Staphylococcus aureus* Infection in Mice Immunized with the Fibrinogen-Binding Domain of Clumping

- Factor A / K. Narita, D. L. Hu, F. Mori [et al.] // Infection and Immunity. — 2010. — Vol.78. — № 10. — P.4234–4242.
150. Segal, A.W. How neutrophils kill microbes / A.W. Segal // Annu Rev Immunol. — 2005. — Vol. 23. — P. 197-223.
151. Sharma-Chawla, N. In vivo Neutralization of Proinflammatory Cytokines During Secondary Streptococcus pneumoniae Infection Post Influenza A Virus Infection / N. Sharma-Chawla, S. Stegemann-Koniszewski, H. Christen// Frontiers in immunology. — 2019. — № 10. — P.1864.
152. Staphylococcus aureus skin infection recurrences among household members: an examination of host, behavioral, and pathogen-level predictors / L. G. Miller , S. J. Eells , M. Z. David [et al.] // Clin Infect Dis. — 2015. — Vol. 60. — № 5. — P. 753–763.
153. Strieter, R.M. Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils / R. M. Strieter, S. L. Kunkel // J. Invest. Med. — 1994. — Vol. 42. — № 4. - P. 640–651.
154. Structural and Functional Dynamics of Staphylococcus aureus Biofilms and Biofilm Matrix Proteins on Different Clinical Materials / A. K. Hiltunen, K. Savijoki, T. A Nyman [et al.] // Microorganisms. — 2019. — Vol.7. — № 12. — P.584.
155. Structure-Activity and Lipophilicity Relationships of Selected Antibacterial Natural Flavones and Flavanones of Chilean Flora / J. Echeverria, J. Opazo, L. Mendoza [et al.]. // Molecules. — 2017. — Vol. 22. — № 4.
156. Sunden-Cullberg, J. The role of high mobility group box-1 protein in severe sepsis / J. Sunden-Cullberg, A. Norrby-Teglund, C. J. Treutiger // Curr. Opin. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 19. — №3. - P. 231–236
157. Synergistic effects of baicalein with cefotaxime against Klebsiella pneumoniae through inhibiting CTX-M-1 gene expression / W. Cai, Y. Fu, W. Zhang, et al. // BMC Microbiol. — 2016. — Vol. 16. — № 1. — P. 181.
158. Synergy between baicalein and penicillins against penicillinase-producing Staphylococcus aureus / M. Qian, S. Tang, C. Wu [et al.] // Int J Med Microbiol. — 2015. — Vol. 305. — № 6. — P. 501-504.

159. Thammavongsa. V. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death / V. Thammavongsa, D. M. Missiakas, O. Schneewind // *Science*. — 2013. — Vol. 342. — № 6160. — P.863–866.
160. The anti-HSV-1 effect of quercetin is dependent on the suppression of TLR-3 in Raw 264.7 cells / S. Lee, H. H. Lee, Y. S. Shin [et al.] // *Arch Pharm Res*. — 2017. — Vol. 40. — № 5. — P. 623-630.
161. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research / N. Percie du Sert, V. Hurst, A. Ahluwalia [et al.] // *PLoS Biol*. — 2020. — Vol. 177. — № 16. — P. 3617-3624.
162. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study / K.B. Laupland, O. Lyytikainen, M. Sogaard [et al.] // *Clin Microbiol Infect*. – 2013. - № 19. – P. 465–471.
163. The disease spectrum, epidemiology, and etiology of toxic-shock syndrome / P. J. Chesney, M. S. Bergdoll, J. P. Davis, J. M. Vergeront // *Annual Review of Microbiology*. — 1984. — № 38. — P.315-338.
164. The fall of a dogma? Unexpected high T-cell memory response to *Staphylococcus aureus* in humans / J. B. Kolata, I. Kuhbandner, C. Link [et al.] // *J Infect Dis*. — 2015. — Vol. 212. — № 5. — P. 830-838.
165. The flavonoid cyanidin blocks binding of the cytokine interleukin-17A to the IL-17RA subunit to alleviate inflammation in vivo / C. Liu, L. Zhu, K. Fukuda [et al.] // *Sci Signal*. — 2017. — Vol. 467. — № 10.
166. The Immunomodulatory Activity of *Staphylococcus Aureus* Products Derived From Biofilm and Planktonic Cultures / B. Sadowska, M. Więckowska-Szakiel, M. Paszkiewicz, B. Różalska // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Warsz). — 2013. — Vol. 61. — № 5. — P.413-420.
167. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells / I. I. Ivanov, B. S. McKenzie, L. Zhou [et al.] // *Cell*. — 2006. —Vol. 126. — № 6. — P. 1121–1133.
168. The patogenesis of Sepsis / D. Stearns-Kurosawa, M. Osuchowski, C. Valentine [et al.] // *Ann. Rev. Pathol.* — 2011. — № 6. — P. 19–48.

169. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake / J. Cao, Y. Zhang, W. Chen, X. Zhao // Br J Nutr. — 2010. — Vol. 103. — № 2. — P. 249-255.
170. The TLR7 ligand 9-benzyl-2-butoxy-8-hydroxy adenine inhibits IL-17 response by eliciting IL-10 and IL-10-inducing cytokines / A. Vultaggio, F. Nencini, S. Pratesi [et al.] // J Immunol. — 2011. — Vol. 186. — № 8. — P. 4707–4715.
171. Thomsen, I.P. Targeting Fundamental Pathways to Disrupt Staphylococcus Aureus Survival: Clinical Implications of Recent Discoveries / I. P. Thomsen, J. Y. Liu // JCI Insight. — 2018. — Vol.3. — № 5.
172. Vaccine composition formulated with a novel TLR7-dependent adjuvant induces high and broad protection against Staphylococcus aureus / F. Bagnoli, M. R. Fontana, E. Soldaini [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. — 2015. — Vol. 112. — P. 3680–3685.
173. Vaccines for Staphylococcus aureus and target populations / C. Pozzi, R. Olaniyi, L. Liljeroos [et al.] // Curr Top Microbiol Immunol. – 2016. - № 6. - P. 23–27.
174. Vaginal gel formulation based on theaflavin derivatives as a microbicide to prevent HIV sexual transmission / J. Yang, L. Li, H. Jin [et al.] // AIDS Res.Hum.Retroviruses. — 2012. — Vol. 28. — № 11. — P. 1498–1508.
175. Variations in organism-specific severe sepsis mortality in the United States: 1999–2008 / C. Ani, S. Farshidpanah, A. B. Stewart, H. B. Nguyen // Critical Care Medicine. – 2015. — Vol.43. — № 1. — P.65–77.
176. Wang, C. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* / C. Wang, T. Chang, H. Yang, M. Cui // Food Control. — 2015. — № 47. — P.231–236.
177. Wang, H. J. Dietary flavonoids modulate CYP2C to improve drug oral bioavailability and their qualitative/quantitative structure-activity relationship / H. J. Wang // AAPS J. — 2014. — Vol. 16. — № 2. — P. 258-268.
178. Winterbourn, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species / C. C. Winterbourn //Nat Chem Biol. — 2008. — Vol. 4. — № 5. — P. 278-286.

179. World Health Organization. — 2017. — URL: <http://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (дата обращения 27.10.2021)
180. Worldwide decrease in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: do we understand something? / J. M. Rolain, C. Abat, P. Brouqui, D. Raoult // Clin. Microbiol. Infect. — 2015. — Vol. 21. — P. 515–517.