

*На правах рукописи*



Солёнова Елена Александровна

**Влияние изоликвиритигенина на течение  
экспериментальной стафилококковой инфекции**

3.3.6. – фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Улан-Удэ – 2022**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова».

**Научный руководитель:**

**Павлова Светлана Ивановна** - доктор медицинских наук, доцент.

**Официальные оппоненты:**

**Боброва Ольга Петровна** - доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации / кафедра фармакологии и клинической фармакологии с курсом последипломного образования, доцент.

**Гуляев Сергей Миронович** – кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей и экспериментальной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук / лаборатория экспериментальной фармакологии, старший научный сотрудник.

**Ведущая организация:**


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «30» июня 2022 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета 99.0.045.03 при ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН по адресу: 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Бурятского научного центра СО РАН и на сайте ИОЭБ СО РАН: <http://igeb.ru>.

Автореферат разослан «28» апреля 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук, доцент

 В. Б. Хобракова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

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 средств способствует селекции полирезистентной условно-патогенной флоры, являющейся впоследствии причиной нозокомиальных инфекций и ограничивающей эффективность лечебно-профилактических мероприятий (С. В. Яковлев и др., 2018).

По данным ВОЗ, метициллинрезистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA), умеренно чувствительные/устойчивые к ванкомицину *Staphylococcus aureus* (VISA/VRSA) относятся к группе высокого уровня приоритетности. 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% (А.Ю. Кузьменков и др., 2021). С начала XXI в., благодаря своевременно принятым мерам по сдерживанию антибиотикорезистентности, наблюдается устойчивая тенденция к снижению MRSA. Несмотря на это, на сегодняшний день *S. aureus* остается одним из наиболее распространенных возбудителей генерализованных инфекций человека с высокой заболеваемостью и смертностью (Nielsen et al., 2012). 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 опережают время, необходимое для полного цикла их исследования и внедрения медицинскую практику (F.R. DeLeo et al., 2010; G. Yunlei et al., 2020), а эффективных вакцин от инфекций, вызванных *S.*

*aureus*, на сегодняшний день не разработано (С. Pozzi et al., 2016). 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/С в модели генерализованной стафилококковой инфекции (С. И. Павлова, 2012). Однако наибольший интерес для современной фармакологии представляет изучение не суммы веществ, а отдельных субстанций. Таким образом, весьма актуальным представляется изучение антимикробных и иммуностропных эффектов изоликвиртигенина (ИЛГ), основного полифенола корня солодки, в различных экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*.

### **Степень разработанности темы**

В доступной литературе не встречаются работы, посвященные изучению эффективности ИЛГ при генерализованной стафилококковой инфекции. Однако имеются публикации, описывающие наличие у различных полифенольных соединений растительного происхождения иммуностропных, антимикробных и противовоспалительных эффектов (F. Peng et al., 2015; M. Cuendet et al., 2010; X. Zhang et al., 2014; M. Maggiolini et al., 2002; D.S. Jang et al., 2003; M. Cuendet et al., 2006). Продемонстрировано, что полифенолы корней солодки повышают выживаемость лабораторных животных при генерализованной стафилококковой инфекции (С.И. Павлова, 2012). Кроме того, в различных моделях они увеличивают секрецию IL-17, который играет ключевую роль в защите от бактериальных и грибковых инфекций.

### **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, об-

суждения полученных экспериментальных данных, заключения, выводов, списка литературы. Библиографический указатель включает 11 отечественных и 169 зарубежных источников литературы.

**Цель исследования** – определить влияние изоликувиритигенина 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-индуцированную 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 $\gamma$ ) 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 $\gamma$ ), и цитокинов, регулирующих Th-17 ответ (IL-22, IL-23, IL-17A, IL-17F, MIP-3a / CCL20, IL-10) Кона-активированными спленоцитами.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные в результате исследования данные об антистафилококковых и иммуномодулирующих эффектах ИЛГ и его комбинаций с антибиотиками расширяют представления о его фармакодинамике и являются предпосылкой для дальнейшего изучения антимикробных 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».

### **Методология и методы исследования**

**Характеристика бактериальных штаммов и условия их поддержания.** Коллекционные штаммы *S. aureus* ATCC 4330, ATCC 29213, ATCC 25923 и клинические изоляты *S. aureus* (№№ 1, 6, 10, 74, 77, 83) для экспериментальных целей были любезно предоставлены отделом молекулярной микробиологии и медицинской эпидемиологии под руководством профессора Сидоренко С.В. (ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России). Бактерии культивировали в бульоне Мюллера-Хинтона. Расчет колониеобразующих единиц (КОЕ) осуществляли путем измерения оптической плотности (OD) с использованием микропланшетного фотометра (1 единица OD =  $8,5 \times 10^8$  КОЕ/мл при 630 нм).

**Экспериментальные животные.** Эксперименты проведены на мышах-самцах Balb/C (20-22 г, 6-8 недель, НПП «Питомник лабораторных животных» Института биологии РАН, г. Пущино, Россия) и одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО «ЧГУ им. И. Н. Ульянова» (протокол №20-04 от 17.04.2020г.).

**Исследуемое вещество и антибиотики сравнения.** Для экспериментальных целей использовали ИЛГ (чистота 98%, Xi'An Yiyang Bio-Tech Co., Китай), матричный раствор готовили на диметилсульфоксиде (ДМСО). В качестве антибиотиков сравнения использовали оксациллин и ванкомицин (ООО «ХимТехЛаб», Россия), которые растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). *In vitro* ИЛГ тестировали в диапазоне концентраций 0,1-128 мкг/мл (содержание в лунках ДМСО <1%), оксациллин – 0,03125-1024 мкг/мл, ванкомицин – 0,125-2 мкг/мл. Для парентерального введения экспериментальным животным вводили ИЛГ (10 мг/кг, трехкратно, ДМСО

<5%), оксациллин (100-400 мг/кг), ванкомицин (40-160 мг/кг) в объеме не более 0,5 мл однократно. Животным контрольных групп вместо ИЛГ и антибиотиков сравнения вводили соответствующие объемы и концентрации растворителей.

**Определение антимикробной активности и влияние на формирование биопленок.** Методом серийных разведений в бульоне определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) ИЛГ, оксациллина, ванкомицина в отношении штаммов *S. aureus* (CLSI, 2004), их влияние на формирование бактериальных биопленок оценивали с помощью МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид)-теста (E. Grela et al., 2018).

**Оценка пролиферации митоген-активированных мононуклеарных клеток** проводилась в МТТ-тесте (M. Niks et al., 1990). Мононуклеары селезенки мышей выделяли методом щадящей гомогенизации, удаляли эритроцитарную фракцию и культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина и стрептомицина, активацию проводили КоНА (15 мкг/мл).

**Оценка секреции цитокинов лимфоидными клетками.** Секрецию цитокинов лимфоидными клетками селезенки/паховых лимфатических узлов мышей оценивали на мультиплексном анализаторе с помощью набора *MILLIPLEX MAP, Mouse Th17 MAGNETIC BEAD PANEL KIT (США)* после экспозиции с ИЛГ *in vitro*, а также после внутрибрюшинного введения ИЛГ в модели генерализованной стафилококковой инфекции ( $5 \times 10^8$  КОЕ/мышь).

**Оценка хемотаксиса фагоцитов** проводилась в модели пептон-индуцированной миграции фагоцитов в брюшную полость мышей (S. Miyazaki et al., 2004), подсчитывали количество клеток через 24 ч (хемотаксис преимущественно нейтрофилов) и 72 ч (хемотаксис преимущественно макрофагов) и индекс стимуляции.

**Оценка поглотительной активности фагоцитов** венозной крови здоровых добровольцев (протокол этического комитета ФГБОУ ВО «ЧГУ им. Т.Н. Ульянова» № 20-04 от 17.04.2020 г.) в отношении ФИТЦ (флуоресцеинзотиоцианат)-меченого *S. aureus* оценивали с помощью проточной цитометрии (Б.В. Пинегин и др., 2001).



**Оценка продукции активных форм кислорода фагоцитами** венозной крови человека проводилась с помощью проточной цитометрии (Б. В. Пинегин и др., 2001) с определением доли ФМА-активированных нейтрофилов, моноцитов и показателей спонтанной и стимулированной интенсивности флуоресценции.

**Модель стафилококковой инфекции.** Мышей заражали штаммом *S. aureus ATCC 25923* внутрибрюшинно и проводили прямое параллельное сравнение экспериментальных групп. Выживаемость отражали с помощью кривых Каплан-Мейера. Для изучения динамики числа мононуклеаров, их пролиферации и секреции цитокинов часть мышей выводили из эксперимента, извлекали селезенку и паховые лимфатические узлы. Для оценки бактериемии производили посев крови из магистральных сосудов шеи на чашки Петри с кровавым агаром (N. Sharma-Chawla et al., 2019).

**Статистический анализ.** Эксперименты выполнены не менее, чем в трех сериях. Данные статистически обработаны с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 8.4.0, а также Microsoft Excel 365. 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 определяли по критерию Стьюдента. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ , где  $p$  – уровень значимости.

### **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 $\gamma$ , TNF $\alpha$ , 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 posere!» (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.

### Благодарности

Выражаем благодарность сотрудникам отдела молекулярной микробиологии и медицинской эпидемиологии под руководством профессора Сидоренко С.В. (ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА РФ) за ценные советы при интерпретации результатов, а также коллективу кафедры общей патологии под руководством профессора Бойчука С.В. (ФГБОУ ВО «КГМУ» МЗ РФ) за содействие в исследованиях уровней цитокинов.

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

**Прямая антибактериальная активность ИЛГ.** ИЛГ обладает низкой антибактериальной активностью в отношении музейных штаммов и клинических изолятов *S. aureus* (Таблица 1).

Таблица 1. Минимальные подавляющие концентрации изоликвиритигенина в отношении различных штаммов *Staphylococcus aureus*.

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

Динамика бактериального роста штамма *S. aureus* ATCC 25923 в суспензии в присутствии ИЛГ в концентрациях 8-64 мкг/мл, что соответствовало МПК/8 - МПК, показана на Рисунке 1. В образцах с «положительным» контролем и в присутствии ИЛГ в первые 4 ч наблюдений ОД (630 нм) существенно не отличались друг от друга. Через 8 ч различия ОД (630 нм) между «положительным» контролем и образцами с ИЛГ во всех исследуемых концентрациях стали нарастать, а через 24 ч ОД (630 нм) образцов с ИЛГ достоверно ( $p < 0,05$ ) отличались от «положительного» контроля.

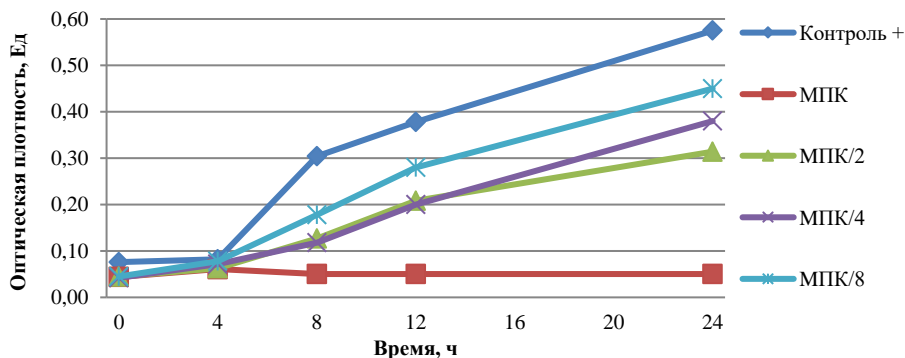


Рисунок 1. Влияние изоликирвитигина на суспензионный рост *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 в бульоне.

**Прямая антибактериальная активность ИЛГ в комбинации с оксациллином/ванкомицином.** Через 24 ч инкубации выявлено, что при добавлении ИЛГ с оксациллином в концентрациях каждого из агентов, используемых в комбинации ниже МПК, наблюдалось подавление роста *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330. 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.

**Антибио пленочная активность ИЛГ.** Через 24 ч (предварительно определенный оптимальный срок) в присутствии ИЛГ (128 мкг/мл) не наблюдалось видимого бактериального роста ни одного из исследуемых штаммов. При оценке способности штамма *S. aureus* ATCC 25923 к адгезии к пластику OD (492 нм) смыва с поверхности пластика в контрольных образцах были значительно выше, чем в лунках с ИЛГ. Это свидетельствует о том, что ИЛГ в концентрациях меньше МПК снижает формирование биопленок *S. aureus* ATCC 25923. Антибио пленочный эффект ИЛГ был концентрационно зависимым (4-128 мкг/мл), что, вероятно, является следствием прямого антибактериального эффекта ИЛГ.

**Влияние комбинации ИЛГ с оксациллином/ванкомицином на формирование бактериальных биопленок.** Через 24 ч инкубации антибио пленочная активность комбинаций «ИЛГ + окса-

циллин»» в концентрациях меньших, чем МПК, выявлена в отношении *S. aureus* ATCC 25923 и *S. aureus* 1, а комбинации «ИЛГ + ванкомицин» - *S. aureus* 1. Как и антибактериальная активность, антибиопленочная активность была концентрационно-зависимой.

**Влияние ИЛГ на пептон-индуцированную миграцию фагоцитов мышей.** Через 24 ч и 72 ч в контрольных и опытных группах количество фагоцитов в промывных водах брюшной полости мышей не имело достоверных отличий друг от друга. Таким образом, ИЛГ не оказал подавляющего влияния на миграцию нейтрофилов и макрофагов у мышей Balb/C.

**Влияние ИЛГ на поглотительную способность фагоцитов.** В контрольных образцах фагоцитарный индекс нейтрофилов составил  $93,9 \pm 6,0$  %, а моноцитов –  $73,9 \pm 14,1$ %. В концентрации ИЛГ 128 мкг/мл наблюдалась недостоверная тенденция к его снижению у нейтрофилов ( $92,5 \pm 5,5$  %) и моноцитов ( $64,1 \pm 13,7$  %). В образцах с добавлением ИЛГ (128 мкг/мл) доля флуоресцирующих нейтрофилов ( $184,8 \pm 44,8$  vs.  $145,5 \pm 41,1$ ) и моноцитов ( $58,5 \pm 17,2$  vs.  $64,1 \pm 18,1$ ) увеличивалась. Таким образом, ИЛГ (16-128 мкг/мл) не снижал долю нейтрофилов и моноцитов, способных поглощать бактериальные клетки.

**Влияние ИЛГ на продукцию активных форм кислорода фагоцитами.** В контроле без ФМА и ИЛГ доля флуоресцирующих нейтрофилов ( $3,9 \pm 1,8$  %) и моноцитов ( $3,0 \pm 2,0$  %) была очень низкой. По сравнению с контролем добавление ИЛГ увеличивало долю флуоресцирующих нейтрофилов в концентрациях 128 мкг/мл ( $100,0 \pm 0,1$  %,  $p < 0,05$ ), 64 мкг/мл ( $99,6 \pm 0,5$  %,  $p < 0,05$ ), 16 мкг/мл ( $34,7 \pm 8,9$  %,  $p < 0,05$ ), а процент флуоресцирующих моноцитов – в концентрациях 128 мкг/мл ( $86,2 \pm 11,7$  %,  $p < 0,05$ ), 64 мкг/мл ( $47,2 \pm 18,7$  %,  $p < 0,05$ ) (Рисунок 2). Интенсивность флуоресценции нейтрофилов достоверно отличалась от контроля ( $2,5 \pm 0,3$ ) 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 ( $3,0 \pm 0,15$ ,  $p < 0,05$ ).

В образцах с добавлением ФМА по сравнению с контролем ( $11,3 \pm 3,7$ ), в присутствии ИЛГ 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. При оценке функций моноцитов в присутствии ИЛГ (128 мкг/мл,  $97,8 \pm 1,8$  %,  $p < 0,05$ ), (64 мкг/мл,  $88,1 \pm 7,8$  %,  $p < 0,05$ ).

$p < 0,05$ ) наблюдалось дозозависимое увеличение количества флуоресцирующих клеток по сравнению с контролем ( $44,5 \pm 27,2$ ).

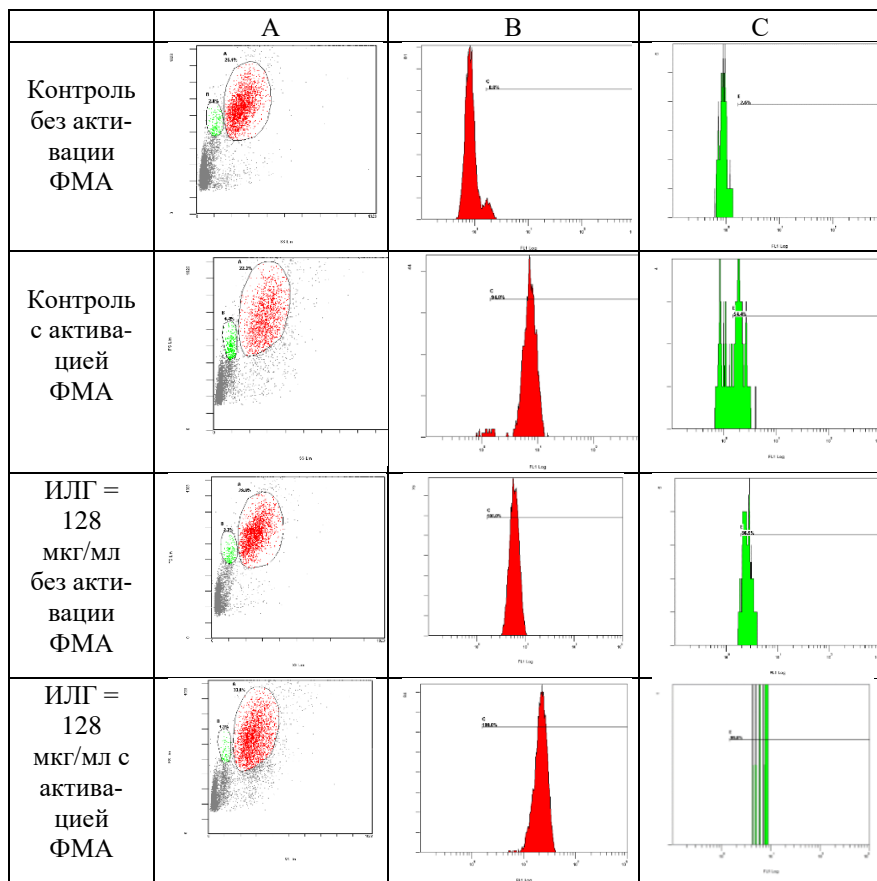


Рисунок 2. Распределение клеток крови по боковому светорассеянию (А) и гистограммы флуоресценции, соответствующие гейтам нейтрофилов (красный) и моноцитов (зеленый) (В, С) при цитометрической оценке продукции активных форм кислорода форбол-12-миристат-13-ацетат-активированными фагоцитами.

Таким образом, добавление ИЛГ (16-128 мкг/мл) даже к не активированным ФМА клеткам дозозависимо увеличивало долю флуоресцирующих нейтрофилов и моноцитов, а также интенсив-

ность флуоресценции, 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.

**Оценка влияния ИЛГ на активацию спленоцитов и продукцию ими цитокинов *in vitro*.** Спустя 24 ч инкубации ИЛГ (16-64 мкг/мл) выраженно снижал долю жизнеспособных клеток, при 8 мкг/мл подавление происходило более, чем в два раза ( $50,0 \pm 7,5\%$ ,  $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем и имело тенденцию к снижению при экспозиции с ИЛГ в концентрации 4 мкг/мл ( $88,0 \pm 22,0\%$ ). При этом даже в концентрации 4 мкг/мл ИЛГ секреция спленоцитами всего изучаемого спектра цитокинов IL-2, IL-12p70, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , 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, а в концентрациях ИЛГ 16-64 мкг/мл большинство цитокинов (IL-2, IL-12p70, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , 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 более выраженные супрессивные свойства в отношении эффекторов адаптивного иммунитета, не затрагивая основные врожденные иммунные реакции фагоцитов.

**Влияние предварительного введения ИЛГ на бактериемии при генерализованной стафилококковой инфекции.** Через сутки после заражения в дозе  $5 \times 10^8$  КОЕ/мышь в контроле наблюдался рост большого количества колоний ( $10^5$  КОЕ/мл). В течение первых 5 суток в образцах мышей, получавших ИЛГ, а также в других образцах контрольных и опытных групп роста не наблюдалось.

**Влияние предварительного введения ИЛГ на выживаемость мышей при генерализованной стафилококковой инфекции.** При заражении  $10^9$  КОЕ/мышь в контроле к 4 дню выживаемость составила 17 % (Рисунок 3). В группе, получавшей ИЛГ, выживаемость на 7 день эксперимента составила 67 % ( $p < 0,05$ ). Заражение  $1,5 \times 10^9$  КОЕ/мышь вызывало гибель 100% животных контроля в течение 48-72 ч. В группе ИЛГ через 2 дня погибало 62,5% мышей, к 24 дню выживали 12,5% мышей (Рисунок 3).

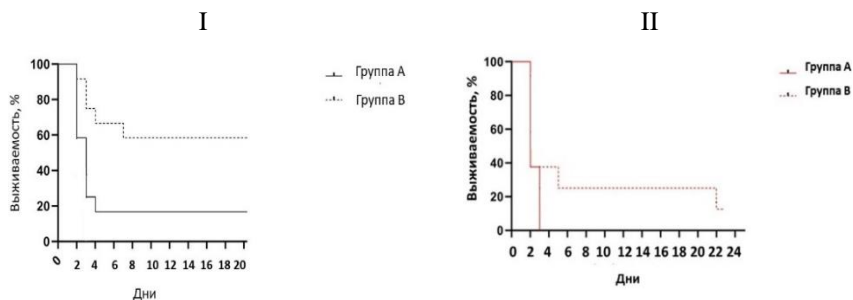


Рисунок 3. Выживаемость мышей Balb/C, зараженных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923  $10^9$  КОЕ/мышь (I) и  $1,5 \times 10^9$  КОЕ /мышь (II). Примечание: группа А – контроль; группа В – предварительное введение изоликвиригенина (30 мг/кг).

**Влияние ИЛГ и его комбинаций с оксациллином на выживаемость мышей после заражения *S. aureus*.** При заражении  $1,5 \times 10^9$  КОЕ/мышь при сравнении контрольных групп, получавших ФСБ или ДМСО, ( $p=0,3$ ), групп, получавших ИЛГ ( $p=0,3$ ) или оксациллин ( $p=0,4$ ), а также групп, получавших ИЛГ в комбинации с оксациллином, с получавшими оксациллин, ( $p=0,14$ ) выживаемость не имела достоверных отличий. Таким образом, в отличие от введения ИЛГ, а также его комбинации с оксациллином после заражения животных, предварительное введение ИЛГ до бактериального заражения значительно увеличивало выживаемость мышей.

**Влияние ИЛГ на динамику мононуклеаров селезенки и паховых лимфатических узлов мышей при генерализованной стафилококковой инфекции.** После 3-го дня количество мононуклеаров постепенно увеличивалось в обеих группах, достигая максимальных значений на 7-й день в контроле ( $9,3 \pm 0,5 \times 10^6$  клеток/мышь) или на 10-й день в группе, получавшей ИЛГ ( $10,6 \pm 0,5 \times 10^6$  клеток/мышь). С 3-го до 9-го дня число спленоцитов постепенно нарастало в обеих группах и достигало максимума к 10-му дню (ИЛГ:  $3328,0 \pm 166,4 \times 10^6$  клеток/мышь, контроль:  $1488,0 \pm 74,4 \times 10^6$  клеток/мышь).

**Влияние ИЛГ на цитокины, продуцируемые лимфоцитами паховых лимфатических узлов мышей при стафилококковой инфекции.** На 4-й день инфекции после 48 ч инкубации в группе, получавшей ИЛГ, в сравнении с контролем продукция таких



цитокинов, как IL-2 ( $5524,3 \pm 669,8$  пг/мл vs.  $1265,0 \pm 94,8$  пг/мл,  $p < 0,05$ ), IFN $\gamma$  ( $3936,3 \pm 567,8$  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,  $p < 0,05$ ), была достоверно ниже (Рисунок 4). Таким образом, ИЛГ подавляет секрецию как провоспалительных (IL-2, IFN $\gamma$ , 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.

**Влияние ИЛГ на цитокины, продуцируемые спленоцитами при стафилококковой инфекции мышей.** 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 (Рисунок 5). На 5-й день после заражения в группе, получавшей ИЛГ, уровень секреции цитокинов IL-2, IL-12p70, IFN $\gamma$ , 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 контролем. Таким образом, предварительное введение ИЛГ до заражения достоверно увеличивало продукцию цитокинов спленоцитов мышей, активирующего иммунный ответ по типу Th-1 (IL12p70, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) и Th-17 (IL22, IL23, IL6, IL17). Учитывая, что экспансия большого количества Т-клеток после стимуляции суперантигеном может вызывать истощение IL-2, ограничивая развитие Т-клеточного ответа (M. Llewelyn et al., 2002), возможно, сдерживание секреции цитокинов (в частности, IL-2) и меньшая бактериальная нагрузка на фоне введения ИЛГ способствовали более эффективному участию спленоцитов в иммунном ответе.

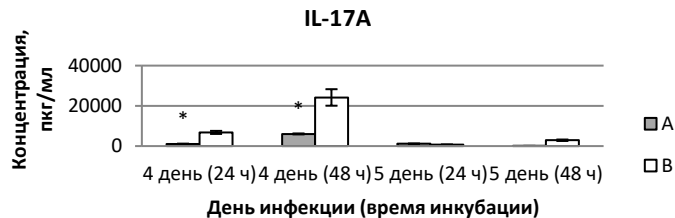
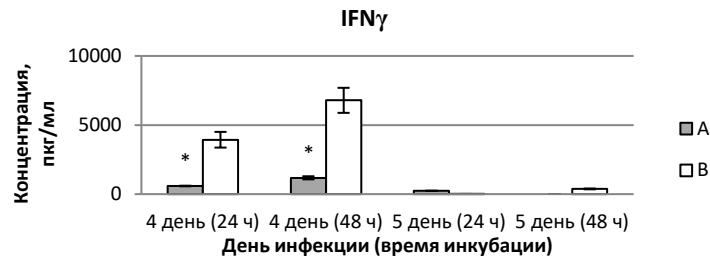
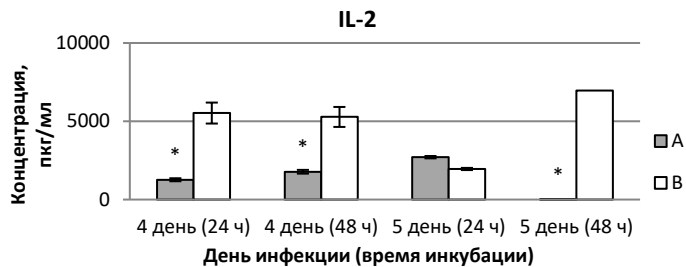


Рисунок 4. Влияние предварительного введения изоликвиригенина на уровни цитокинов, продуцируемых клетками паховых лимфатических узлов мышей Balb/C, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ( $5 \times 10^8$  КОЕ/мышь).

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

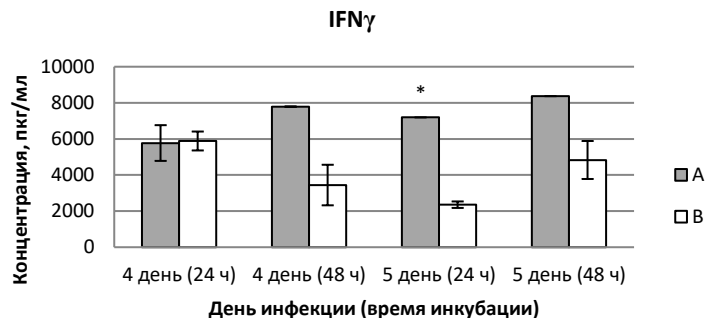
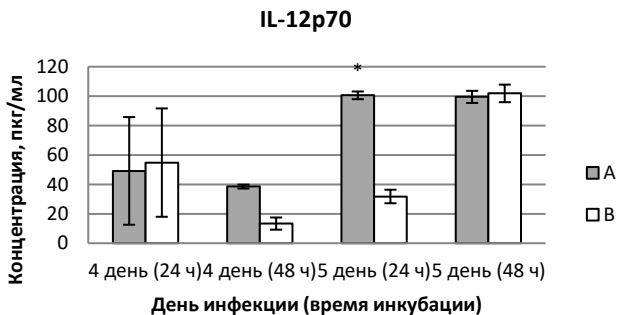
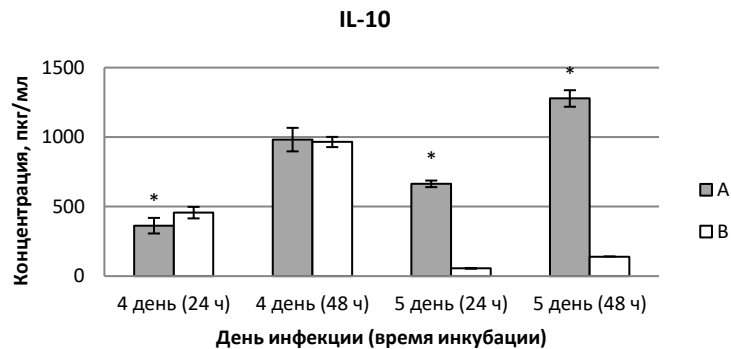
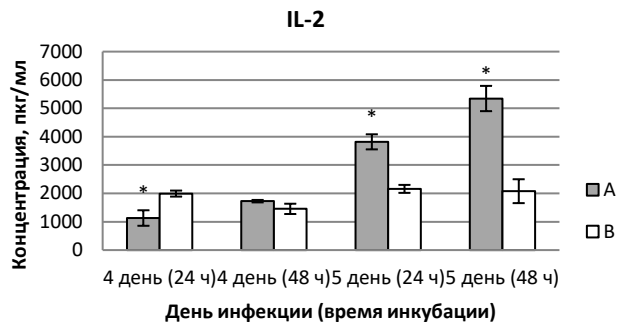


Рисунок 5. Влияние предварительного введения изоликвиригенина на уровни цитокинов, продуцируемых спленocyтaми мышей Balb /C, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ( $5 \times 10^8$  КОЕ/мышь, внутрибрюшинно). Примечание: А - группа, получавшая изоликвиригенин (30 мг/кг); В - контрольная группа; \* - достоверные изменения при  $p < 0,05$ .

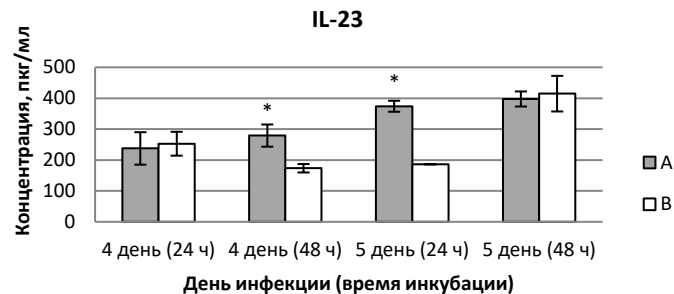
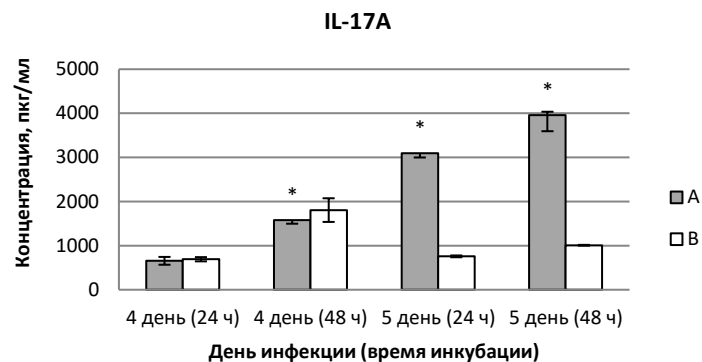
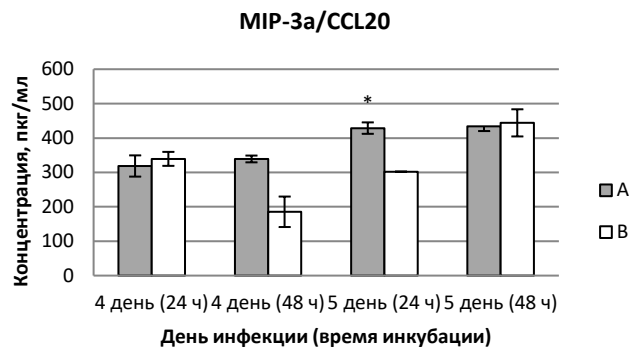


Рисунок 5. Продолжение. Влияние предварительного введения изоликивиритигенина на уровни цитокинов, продуцируемых спленocyтocyтами мышей Balb/C, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ( $5 \times 10^8$  КОЕ/мышь, внутрибрюшинно).

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

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

## 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 суспензионный 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 иммуотропных 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 ИЛГ при других бактериальных инфекциях.

## ВЫВОДЫ:

- ИЛГ обладает низкой антибактериальной активностью, ингибируя суспензионный 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 $\gamma$ ) и Th17 (IL-22, IL-23, IL-17A, IL-17F, MIP-3a/CCL20) иммунного ответа.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Солёнова, Е.А. Антибактериальные и иммуномодулирующие эффекты флавоноидов / Е. А. Солёнова, С. И. Павлова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т. 83. – № 10. – С. 33–39.

2. Солёнова, Е.А. Антибактериальные и иммуностропные свойства изоликвиритигенина при генерализованной стафилококковой инфекции у мышей / Е. А. Солёнова, С. И. Павлова // Фармация и фармакология. – 2020. – Т. 8. – № 3. – С. 181–194.

3. Солёнова, Е.А. Изоликвиритигенин влияет на функции фагоцитов и повышает выживаемость мышей при стафилококковой инфекции / Е. А. Солёнова, С. И. Павлова // Фармация и фармакология. – 2021. – Т. 9. – № 2. – С. 139–148.

4. Солёнова, Е.А. Изучение антистафилококковых эффектов синтетического изоликвиритигенина / Е. А. Солёнова, С. И. Павлова // Сборник научных материалов XII международного научного конгресса «Рациональная фармакотерапия». – Санкт-Петербург, 2017. – С. 164–166.

5. Сравнительное исследование образования биопленок различными штаммами золотистого стафилококка / Е.А. Солёнова, Э.Г. Бабаева, Н.Н. Пчелова, С.И. Павлова // Сборник научных материалов XIII международного научного конгресса «Рациональная фармакотерапия». – Санкт-Петербург, 2018. – С. 136–138.

6. Солёнова, Е.А. Некоторые аспекты фармакологии полифенолов – потенциальных антимикробных субстанций / Е.А. Солёнова, С.И. Павлова // Материалы XIV международного научного конгресса «Рациональная фармакотерапия «Золотая осень»». – Санкт-Петербург, 2019. – С. 149–152.

7. Солёнова, Е.А. Изоликвиритигенин модулирует выработку цитокинов при генерализованной стафилококковой инфекции / Е. А. Солёнова, О.М. Коновалова, С.И. Павлова // Сборник материалов XV международного научного конгресса «Рациональная фармакотерапия «Золотая осень»». – Санкт-Петербург, 2020. – С. 123–125.

8. Солёнова, Е.А. Изоликвиритигенин не изменяет поглотительную функцию фагоцитов крови человека / Е.А. Солёнова, А.А.

Антонова, О.М. Коновалова, С.И. Павлова // Сборник материалов международной научно-практической конференции Современные проблемы химии, технологии и фармации. – Чебоксары, 2020. – С. 337–338.

9. Солёнова, Е.А. Антимикробные эффекты флавоноидов и их механизмы действия / Е.А. Солёнова, С.И. Павлова, Е.Н. Шамитова, Л.Н. Николаевна Величковска // Сборник научных трудов молодых ученых и специалистов. – Чебоксары, 2017. – С. 159–164.

10. Визуализация бактериальных биопленок золотистого стафилококка методом атомно-силовой микроскопии / Е.А. Солёнова, А. В. Григорьев, А.Г. Краснова, С.В. Карпов, С.И. Павлова // Сборник материалов IV Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 80-летию со дня рождения В.В. Базыльчика «Современные проблемы химической науки и фармации». – Чебоксары, 2015. – С. 131.

11. Солёнова, Е.А. Вторичные метаболиты растений в аспекте преодоления антибиотикорезистентности / Е.А. Солёнова, С.И. Павлова // Сборник научных статей Всероссийской научно-практической конференции «Безопасность фармакотерапии: Noli Nocere!». – Казань, 2018. – С. 36–37.

12. Солёнова, Е.А. Полифенольные соединения подавляют рост бактерий / Е.А. Солёнова, С.И. Павлова // Сборник тезисов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Безопасность фармакотерапии: Noli Nocere!». – Казань, 2019. – С. 113–114.

13. Влияние изоликвиритигенина на поглотительную способность фагоцитов крови / Е.А. Солёнова, К.С. Георгиева, О.М. Коновалова, А.А. Антонова, С.И. Павлова // Сборник тезисов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Безопасность фармакотерапии: Noli Nocere!». – Казань, 2020. – С. 189.

14. Оценка влияния изоликвиритигенина на функции фагоцитов методом проточной цитометрии / О.М. Коновалова, Ф.А. Фахме, Е. А. Солёнова, С.И. Павлова // Сборник тезисов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Безопасность фармакотерапии: NOLI NOCERE!» – Казань, 2021. – С. 108.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ИЛГ – изоликвиритигенин  
КОЕ – колониеобразующие единицы  
КонаА – конканавалин А  
МПК – минимальная подавляющая концентрация  
МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид  
ФИТЦ – флюоресцеинизотиоцианат  
ФМА - форбол-12-миристан-13-ацетат  
ФСБ – фосфатно-солевой буфер  
GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор  
IFN $\gamma$  - интерферон-гамма  
IL - интерлейкин  
MIP-3a / CCL20 - макрофагальный белок воспаления-3a / хемокиновый лиганд (CC) 20  
OD – оптическая плотность  
*S. aureus* - *Staphylococcus aureus*  
Th - Т-хелперы  
TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа