

УДК 615.281.9



## ИЗОЛИКВИРИТИГЕНИН ВЛИЯЕТ НА ФУНКЦИИ ФАГОЦИТОВ И ПОВЫШАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ ПРИ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Е.А. Солёнова, С.И. Павлова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»  
428015, Россия, Чувашская Республика, г. Чебоксары, пр-т. Московский, д. 15

E-mail: elensoul@mail.ru

Получено 27.02.2021

Принята к печати 20.04.2021

В данной статье представлены результаты изучения влияния изоликивиритигенина на выживаемость животных в модели стафилококковой инфекции и функции фагоцитов человека и животных.

**Цель.** Изучить влияние предварительного введения изоликивиритигенина на выживаемость животных на фоне стафилококковой инфекции, а также на функции фагоцитов мышей и человека.

**Материалы и методы.** Для оценки выживаемости мышей линии Balb/C использовали модель инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923, с построением кривых Каплан-Мейера. Влияние на функции фагоцитов изучали, оценивая пептон-индуцированную миграцию фагоцитов в брюшную полость мышей Balb/C, поглотительную активность фагоцитов (нейтрофилов и моноцитов) крови человека, а также продукцию ими активных форм кислорода с помощью проточной цитометрии.

**Результаты.** Установлено, что предварительное трехкратное внутривнутрибрюшинное введение изоликивиритигенина (30 мг/кг) увеличивает выживаемость мышей Balb/C при стафилококковой инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923. При этом изоликивиритигенин дозозависимо активизирует продукцию активных форм кислорода нейтрофилами и моноцитами крови человека, статистически значимо не подавляя фагоцитарную активность моноцитов и нейтрофилов в отношении флюоресцеинизотиоцианат-меченого *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923, а также пептон-индуцированную миграцию фагоцитов в брюшную полость мышей.

**Заключение.** Таким образом, предварительное введение изоликивиритигенина повышает выживаемость мышей при стафилококковой инфекции и увеличивает продукцию активных форм кислорода фагоцитами. Полученные данные могут стать основой для дальнейшего исследования антибактериальных и иммуностроительных эффектов изоликивиритигенина с целью изыскания новых лекарственных средств для лечения стафилококковой инфекции.

**Ключевые слова:** изоликивиритигенин; *Staphylococcus aureus*; врожденный иммунитет; фагоцитоз; кислородный взрыв; миграция фагоцитов

**Сокращения:** АФК – активные формы кислорода; ДГР 123 – дигидрородамин 123; ДМСО – диметилсульфоксид; ИЛГ – изоликивиритигенин; КОЕ – колониеобразующие единицы; Кона – конканавалин А; НАДФН-оксидаза – никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидаза; НЛ – нейтрофильные ловушки; ФИТЦ – флюоресцеинизотиоцианат; ФМА – форбол-12-миристал-13-ацетат; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид; OD – оптическая плотность.

## ISOLYQUIRITIGENIN AFFECTS PHAGOCYTES FUNCTIONS AND INCREASES MICE SURVIVAL RATE IN STAPHYLOCOCCAL INFECTION

Е.А. Solenova, S.I. Pavlova

Chuvash State University n. a. I.N. Ulyanov  
15, Moskovsky Ave., Cheboksary, Chuvash Republic, Russia, 428015

E-mail: elensoul@mail.ru

Received 27 Feb 2021

Accepted 20 Apr 2021

**Для цитирования:** Е.А. Солёнова, С.И. Павлова. Изоликивиритигенин влияет на функции фагоцитов и повышает выживаемость мышей при стафилококковой инфекции. *Фармация и фармакология*. 2021;9(2):139-148. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-139-148

© Е.А. Солёнова, С.И. Павлова, 2021

**For citation:** E.A. Solenova, S.I. Pavlova. Isolyquiritigenin affects phagocytes functions and increases mice survival rate in staphylococcal infection. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(2):139-148. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-139-148

The results of studying the effect of isoliquiritigenin on animal survival in the model of staphylococcal infection and the function of human and animal phagocytes are presented in this article.

**The aim** of the investigation was to study the effect of an isoliquiritigenin preliminary administration on the survival of animals against the background of staphylococcal infection, as well as on the function of phagocytes in mice and humans.

**Materials and methods.** To assess the survival of Balb/C mice, a model of infection caused by *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923 with the construction of Kaplan-Meier curves, was used. The effect on the phagocytes functions was studied by assessing the peptone-induced migration of phagocytes into the abdominal cavity of Balb/C mice, the absorption activity of phagocytes (neutrophils and monocytes) of human blood, as well as their production of reactive oxygen intermediates (ROIs) using a flow cytometry.

**Results.** It was found out that a preliminary triple intraperitoneal administration of isoliquiritigenin (30 mg/kg) increases the survival rate of Balb/C mice in staphylococcal infection caused by *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923. At the same time, isoliquiritigenin dose-dependently activates the production of reactive oxygen intermediates by human neutrophils and monocytes without statistically significantly suppressing a phagocytic activity of monocytes and neutrophils against fluorescein isothiocyanate-labeled *Staphylococcus aureus* J49 ATCC 25923, as well as peptone-induced migration of phagocytes into the abdominal cavity of mice.

**Conclusion.** Thus, a preliminary administration of isoliquiritigenin increases the survival rate of mice with staphylococcal infection and increases the production of reactive oxygen intermediates by phagocytes. The data obtained, can become the basis for further research of antibacterial and immunotropic effects of isoliquiritigenin in order to find new drugs for the treatment of staphylococcal infection.

**Keywords:** isoliquiritigenin; *Staphylococcus aureus*; innate immunity; phagocytosis; oxidative burst; phagocyte migration

**List of abbreviations:** ROI(s) – reactive oxygen intermediate(s); DHR 123 – dihydrorhodamine 123; DMSO – dimethylsulfoxide; ISL – isoliquiritigenin; CFUs – colony-forming units; ConA – concanavalin A; NADP-oxidase – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; NTS – neutrophil traps; FITC – fluorescein isothiocyanate; PMA – phorbolmyristate acetate; phorbol-12 myristate-13-acetate; MTT – 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; OD – optical density

## ВВЕДЕНИЕ

Распознавание и элиминация микробных патогенов макроорганизмом происходит за счет активации врожденного и адаптивного звеньев иммунитета. Врожденный иммунитет предупреждает внедрение микробов в ткани и способен удалить их до включения механизмов приобретенного иммунитета. Врожденные иммунные реакции на патоген практически моментальные и основаны преимущественно на реакциях воспаления и фагоцитоза, тогда как адаптивный иммунный ответ включается лишь через несколько дней (оптимально – 7–14 дней), так как требует пролиферации и дифференцировки лимфоцитов.

Значительная бактериальная нагрузка в модели острой бактериальной инфекции вызывает летальный исход лабораторных животных в течение первых дней наблюдения. Такая модель инфекции позволяет оценить не только антибактериальные эффекты исследуемых соединений, но и его влияние на функции эффекторов врожденного иммунитета [1], среди которых фагоциты играют важнейшую роль.

Полифенольные соединения высших растений (флавоноиды) обладают широким спектром биологической активности, в том числе антимикробными и иммуномодулирующими эффектами [2]. Так, например, парентеральное введение флавоноидов корня солодки повышает резистентность мышей к острой стафилококковой инфекции в таких дозах, которые значимо не влияют на функции эффекторов врожденного иммунитета [3], но предотвращали активацию и пролиферативный ответ лимфоцитов [4]. Из корней солодки выделены десятки различных флавоноидов, одним из основных является изоликиритигенин (ИЛГ). ИЛГ в различных концентрациях проявляет ан-

тибактериальные свойства, влияет на пролиферацию лимфоцитов и секрецию ими цитокинов на ранних этапах иммунного ответа при стафилококковой инфекции у мышей [2].

**ЦЕЛЬ.** Изучение влияния ИЛГ на функцию человеческих и мышиных фагоцитов, а также его эффективности в модели стафилококковой инфекции у мышей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Тестируемый агент

В качестве тестируемого вещества использовали ИЛГ (чистота 98%, Xi'An YiyangBio-Tech Co., Китай). В экспериментах использовали раствор ИЛГ в диметилсульфоксиде (ДМСО, Panreac, Испания) так, чтобы *in vitro* конечная концентрация растворителя в опытных образцах не превышала 1%. Учитывая, что МПК ИЛГ в отношении *S. aureus* J49 ATCC 25923 64 мкг/мл [5], для экспериментов *in vitro* использовали ИЛГ в диапазоне концентраций 16–128 мкг/мл. В серии экспериментов *in vivo* матричный раствор ИЛГ в ДМСО разводили в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4, PanEcoLLC, Россия), вводили внутривентриально в объеме 0,5 мл в виде истинного раствора с концентрацией ДМСО не более 5%. Учитывая низкую токсичность и биодоступность ИЛГ [2], в экспериментах *in vivo* ИЛГ вводили внутривентриально в суммарной дозе 30 мг/кг. Контрольным образцам/группам вместо ИЛГ вводили соответствующие объемы/концентрации растворителя.

### Бактериальный штамм и условия его культивирования

Культивирование штамма *S. aureus* J49 ATCC 25923 (ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицин-

ского применения» Минздрава России (г. Москва, Россия)) осуществляли в бульоне Мюллера-Хинтона (Mediaplus 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, готовили разведения для культивирования и внутрибрюшинного введения животным. Для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) измеряли оптическую плотность (OD) бактериальной суспензии при 630 нм в микропланшетном фотометре (ImmunoChem 2100, США) с использованием стандарта МакФарланда, исходя из соотношения: 1 оптическая единица OD<sub>630</sub> = 8,5×10<sup>8</sup> КОЕ/мл.

### Экспериментальные животные

Мыши Valb/C (самцы, 20–22 г, 6–8 недель) были получены от научно-производственного предприятия «Питомник лабораторных животных» Института биологии Российской академии наук (г. Пущино, Россия). Уход за животными и обращение с ними осуществляли в соответствии с принципами ARRIVE [6]. Животные содержались при свободном доступе к воде и пище. Для экспериментов мыши случайным образом распределялись на группы по 8 особей. Выведение из эксперимента осуществляли без наркоза путем декапитации или цервикальной дислокации. При выполнении экспериментов были соблюдены положения Хельсинкской декларации (Бразилия, 2013 г.), протокол данных экспериментов был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» (протокол № 20-04 от 17.04.2020 г.).

### Получение крови здоровых добровольцев

Для определения поглотительной активности фагоцитов крови человека и продукции ими активных форм кислорода в день эксперимента производили забор крови в гепаринизированные пробирки у здоровых добровольцев (60 человек) в возрасте 18–25 лет после получения добровольного информированного согласия. Протокол данных экспериментов был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» (протокол № 20-04 от 17.04.2020 г.).

### Получение флюоресцеинизотиоцианат-меченого *S. aureus*

Для инактивации *S. aureus* J49 ATCC 25923 осуществляли экспозицию ночной бактериальной культуры на водяной бане при 95°C в течение 30–40 минут, затем центрифугировали (1000 g, 25 мин.) [7]. Убитые осажденные бактерии однократно отмывали карбонатно-бикарбонатным буфером (0,1 М, pH 9,5) и готовили клеточную суспензию с концентрацией бактерий 2×10<sup>8</sup> микробных тел на 1 мл. К инактивированной бактериальной суспензии добавляли флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), растворенный в ДМСО, из расчета 0,05 мг на 10<sup>8</sup> бактерий с последующей инкубацией в течение 1 ч. при комнатной темпе-

ратуре без доступа света. Затем инактивированные бактериальные клетки трехкратно отмывали фосфатно-солевым буфером центрифугированием (1000 g, 10 мин.) и готовили разведение взвеси ФИТЦ-меченых бактерий до концентрации 5×10<sup>8</sup> микробных тел на 1 мл. Аликвоты хранили при температуре –70°C.

### Модель инфекции *S. aureus* у мышей

Суспензию *S. aureus* в фосфатно-солевом буфере вводили внутрибрюшинно 10<sup>9</sup> КОЕ/мышь. День заражения считали нулевым днем эксперимента. Выживание мышей оценивали каждые 6 ч. в первый день; со второго дня и в последующие 20 дней эксперимента – ежедневно. Экспериментальным животным перед заражением вводили ИЛГ (общая доза 30 мг/кг, трехкратно через 4 ч., внутрибрюшинно). В качестве референта животным контрольной группы вводили соответствующие объемы и концентрации растворителя.

### Оценка хемотаксиса фагоцитов

Для оценки миграции фагоцитов в брюшную полость руководствовались методикой, предложенной Miyazaki [8]. Экспериментальные животные были разделены на 4 группы, которые получали: группа 1 (отрицательный контроль) – стерильный фосфатно-солевой буфер трехкратно (0,5 мл, внутрибрюшинно); группа 2 – стерильный раствор пептона в фосфатно-солевом буфере (3% – 3 мл, внутрибрюшинно); группа 3 – трехкратно растворитель (5% – 0,5 мл, внутрибрюшинно), затем – стерильный раствор пептона в фосфатно-солевом буфере (3% – 3 мл, внутрибрюшинно); группа 4 – ИЛГ (внутрибрюшинно, трехкратно), затем стерильный раствор пептона в фосфатно-солевом буфере (3% – 3 мл, внутрибрюшинно). Спустя 24 ч. и 72 ч. животных выводили из эксперимента и внутрибрюшинно вводили по 20 мл фосфатно-солевого-буфера. Полученные после пальпаторного массирования брюшка промывные воды отбирали в пластиковые пробирки для последующего центрифугирования. Осажденные клетки подсчитывали в камере Горяева. После рассчитывали индекс стимуляции как отношение количества клеток в группах, получавших пептон, к числу клеток в группе отрицательного контроля.

### Оценка поглотительной активности фагоцитов

Оценку поглотительной активности фагоцитов осуществляли с использованием проточной цитометрии [7]. Для этого к образцам гепаринизированной крови человека добавляли ИЛГ в концентрациях 16–128 мкг/мл. Экспериментальные образцы культивировали 30 минут (t=37°C, ф=100%, CO<sub>2</sub> = 5%). Затем к образцам добавляли ФИТЦ-меченый *S. aureus* и продолжали инкубацию также в течение 30 минут (t=37°C, ф=100%, CO<sub>2</sub>=5%). По истечению времени инкубации для лизиса эритроцитов добавляли лизирующий раствор (BacMan Coulter, USA) и

инкубировали 10 минут. Образцы анализировали на проточном цитометре Cytomics FC500 (Becton Dickinson, USA) и рассчитывали фагоцитарный индекс (количество фагоцитов, поглотивших ФИТЦ-меченные бактерии, к общему числу фагоцитов), а также интенсивность флуоресценции.

#### Оценка продукции активных форм кислорода фагоцитами

Оценку продукции активных форм кислорода фагоцитами осуществляли с использованием проточной цитометрии [7]. Для постановки теста форбол-12-миристинат-13-ацетат (ФМА)-индуцированного «кислородного взрыва» к образцам гепаринизированной крови человека, предварительно инкубированным с ИЛГ в концентрациях 16–128 мкг/мл 30 минут (условия инкубации:  $t=37^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{ф}=100\%$ ;  $\text{CO}_2=5\%$ ), добавляли ФМА (0,1 мкг/мл, образцы с активированными фагоцитами) или 0,2% ЭДТА (контрольные, не стимулированные образцы фагоцитов <1% ДМСО) и инкубировали 10 минут. После инкубации к образцам добавляли флуорогенный субстрат дигидрородамин 123 (ДГР 123) и инкубировали еще в течение 10 минут. Лизированные образцы крови анализировали на проточном цитометре Cytomics FC500 (Becton Dickinson, USA) определяли процент активированных нейтрофилов и моноцитов, а также показатели спонтанной и стимулированной интенсивности флуоресценции.

#### Статистический анализ

Все эксперименты были выполнены не менее, чем в трех повторениях. Полученные данные были статистически обработаны с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 8.4.0. Для оценки динамики гибели мышей строили кривые Каплан-Мейера. Полученные результаты подчинялись закону нормального распределения, обрабатывались методами вариационной статистики и представлялись в виде среднего арифметического значения ( $M$ )  $\pm$  стандартной ошибки среднего (SEM). Достоверность различий между группами в экспериментах определяли по критерию Стьюдента, проводя парное сравнение. Различия считались достоверными при  $p<0,05$ , где  $p$  – уровень значимости.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

##### Влияние ИЛГ на выживаемость мышей Balb/C при заражении *S. Aureus* J49 ATCC 25923

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-му дню выживаемость составила лишь  $17,0\pm 7,6\%$  (рис. 1). В группе, получавшей предварительные инъекции ИЛГ в дозе 30 мг/кг, выживаемость была достоверно выше и на 7-й день эксперимента составила  $67,0\pm 16,5\%$  ( $p<0,05$ ).

##### Влияние ИЛГ на пептон-индуцированную миграцию фагоцитов в брюшную полость мышей

Миграцию фагоцитов в брюшную полость оценивали, рассчитывая индекс стимуляции – количество клеток, стимулированных внутрибрюшинной инъекцией пептона, относительно фосфатно-солевого буфера. Индексы стимуляции у мышей, получавших ИЛГ, и контрольных животных, стимулированных пептоном, достоверно не отличались друг от друга (рис. 2). Так, через 24 ч. индекс стимуляции в контрольной группе составлял  $2,4\pm 0,1$  против  $2,0\pm 0,1$  группы, получавшей ИЛГ; через 72 ч. значения индекса стимуляции характеризовались значениями  $1,6\pm 0,1$  (контрольная группа) по сравнению с  $1,8\pm 0,1$  (группа, получавшая ИЛГ).

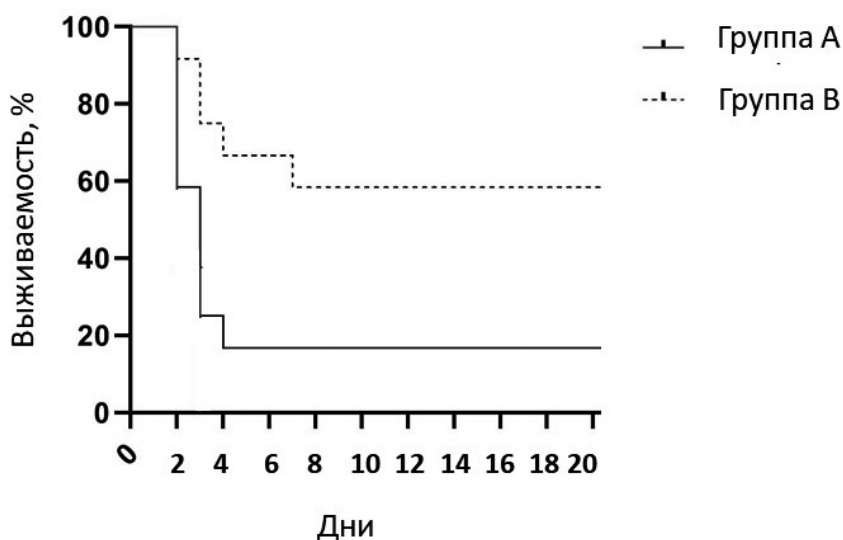
##### Влияние ИЛГ на поглотительную активность фагоцитов крови человека

Изучение влияния ИЛГ на поглотительную активность фагоцитов проводилось цитофлуориметрическим методом. Было показано, что предварительная обработка фагоцитов ИЛГ *in vitro* не приводит к достоверному изменению процента фагоцитирующих нейтрофилов и моноцитов по сравнению с контролем (табл. 1). 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 происходит увеличение доли флуоресцирующих нейтрофилов ( $184,8\pm 44,8$  Ед против  $145,5\pm 41,1$  Ед) и моноцитов ( $58,5\pm 17,2$  Ед против  $64,1\pm 18,1$  Ед).

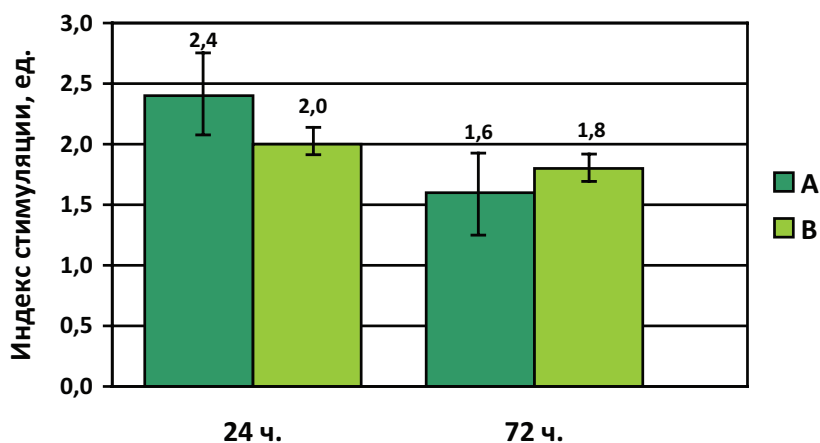
##### Влияние ИЛГ на продукцию АФК фагоцитами крови человека

Было оценено влияние ИЛГ на продукцию АФК фагоцитами без их активации ФМА (табл. 2). При этом в отсутствии ИЛГ доля флуоресцирующих нейтрофилов ( $3,9\pm 1,8\%$ ) и моноцитов ( $3,0\pm 2,0\%$ ) была очень низкой. По сравнению с контрольными показателями добавление ИЛГ дозозависимо 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 в концентрациях 128 мкг/мл ( $86,2\pm 11,7\%$ ;  $p<0,05$ ), 64 мкг/мл ( $47,2\pm 18,7\%$ ;  $p<0,05$ ) – процент флуоресцирующих моноцитов (рис. 3). В то же время интенсивность флуоресценции нейтрофилов достоверно отличалась от показателей контроля ( $2,5\pm 0,3$  Ед) в присутствии ИЛГ 128 мкг/мл ( $6,6\pm 1,6$  Ед;  $p<0,05$ ), 64 мкг/мл ( $3,8\pm 0,2$  Ед;  $p<0,05$ ), а моноцитов – при 128 мкг/мл ( $3,0\pm 0,15$  Ед;  $p<0,05$ ).





**Рисунок 1 – Выживаемость мышей Balb/C, зараженных *S. aureus* J49 ATCC 25923**  
 Примечание: группа А – контроль, 10<sup>9</sup> КОЕ/мышь; группа В – предварительное введение ИЛГ (30 мг/кг), 10<sup>9</sup> КОЕ/мышь



**Рисунок 2 – Влияние ИЛГ на миграцию фагоцитов в брюшную полость мышей Balb/C**  
 Примечание: А – контроль; В – ИЛГ

**Таблица 1 – Влияние ИЛГ на показатели фагоцитарного индекса (%) и интенсивности флуоресценции (ЕД) нейтрофилов и моноцитов крови человека**

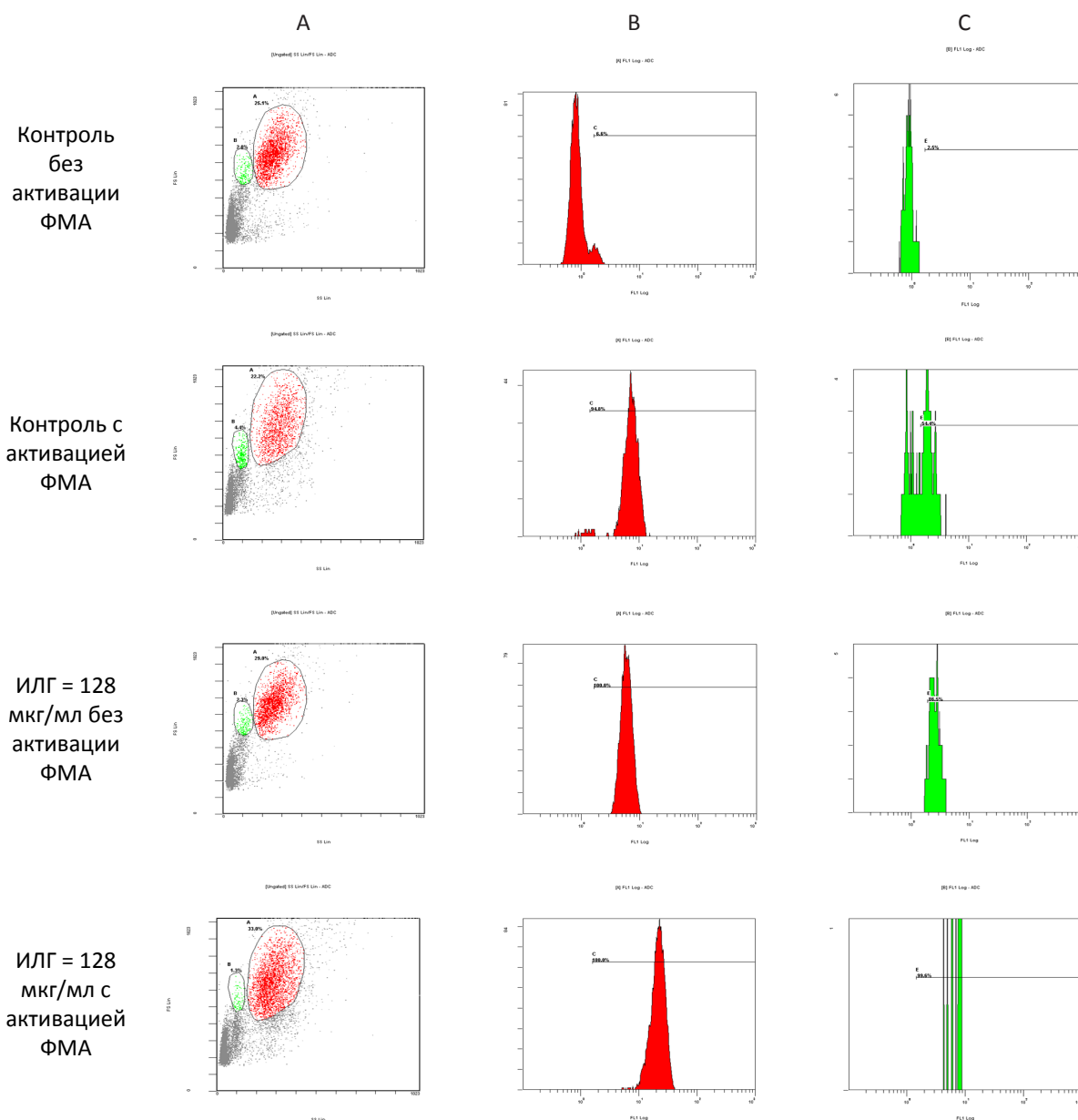
Фагоциты		Контроль	128 мкг/мл	64 мкг/мл	16 мкг/мл
Нейтрофилы	%	93,9±6,0	92,5±5,5	92,1±7,6	95,6±2,4
	Ед.	145,5±41,1	184,8±44,8 *	129,1±55,6	118,1±40,5
Моноциты	%	73,9±14,1	64,1±13,7	71,4±11,2	71,4±11,4
	Ед.	64,1±18,1	58,5±17,2 *	51,4±21,9	45,4±15,4

Примечание: \* – достоверные изменения при p < 0,05

**Таблица 2 – Влияние ИЛГ на продукцию АФК нейтрофилами и макрофагами/моноцитами крови человека**

			Контроль	ИЛГ		
				128 мкг/мл	64 мкг/мл	16 мкг/мл
Нейтрофилы	Активация ФМА	%	93,3±14,9	100,0±0,1	99,9±0,1	99,5±0,4
		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
Моноциты	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



**Рисунок 3 – Распределение клеток крови по боковому светорассеянию (А) и гистограммы флуоресценции, соответствующие гейтам нейтрофилов (красный) и макрофагов/моноцитов (зеленый) (В, С)**

Также было изучено влияние ИЛГ на способность человеческих фагоцитов продуцировать АФК в ответ на активатор протеинкиназы С – ФМА. В контрольных образцах количество нейтрофилов, продуцировавших АФК, составило  $93,3 \pm 14,9\%$ , моноцитов –  $44,5 \pm 27,2\%$  (табл. 2). 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 (рис. 2). По сравнению с контрольными образцами ( $11,3 \pm 3,7$  Ед) в присутствии ИЛГ в концентрациях 128 мкг/мл ( $15,8 \pm 3,0$  Ед,  $p<0,05$ ) и 64 мкг/мл ( $14,8 \pm 4,2$  Ед,  $p<0,05$ ) отмечено достоверное увеличение интенсивности флуоресценции, а в концентрации 16 мкг/мл – наблюдалась лишь тенденция к таковому ( $14,1 \pm 5,2$  Ед,  $p=0,09$ ). При оценке функций моноцитов в присутствии ИЛГ в концентрациях 128 мкг/мл ( $97,8 \pm 1,8\%$ ,  $p<0,05$ ), 64 мкг/мл ( $88,1 \pm 7,8\%$ ,  $p<0,05$ ) наблюдалась дозозависимое значимое увеличение количества флуоресцирующих клеток по сравнению с контрольными значениями ( $44,5 \pm 27,2$  Ед). Данные по повышению доли флуоресцирующих моноцитов при экспозиции с ИЛГ в концентрациях 64–128 мкг/мл были сопоставимы с дозозависимым увеличением степени их флуоресценции (табл. 2).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование посвящено изучению влияния ИЛГ на некоторые механизмы врожденного иммунитета (функции фагоцитов) как возможных факторов, влияющих на выживаемость в ранние сроки бактериальной инфекции. Парентеральное введение ИЛГ до заражения мышей повышало выживаемость экспериментальных животных в модели стафилококкового сепсиса и септического шока, когда на фоне выраженной бактериальной нагрузки  $1,5 \times 10^9$  КОЕ/мышь животные погибали в первые 24–48 ч [5]. В настоящем эксперименте, при инфицирующей дозе  $10^9$  КОЕ/мышь, динамика гибели отличалась (животные погибали позже), но предварительное внутрибрюшинное введение ИЛГ также было эффективным и увеличивало продолжительность жизни мышей линии Balb/C.

В экспериментах установлено, что ИЛГ обладает антибактериальной активностью [5]. Однако антибактериальная активность проявляется при достаточно больших концентрациях (64 мкг/мл), вероятность достижения и поддержания которой в биологических жидкостях/очагах инфекции в условиях *in vivo* низкая, тем более что ИЛГ имеет довольно короткий период полувыведения [9, 10]. Учитывая эти особенности, в настоящей работе был сделан акцент на изучение влияния ИЛГ на функции фагоцитов.

Фагоциты представляют собой эффекторные клетки врожденного иммунитета, осуществляющие

первую линию защиты при инвазии инфекционных патогенов. Основными этапами фагоцитарных реакций являются хемотаксис, поглощение, киллинг и переваривание инфекционного патогена. Влияние на хемотаксис было изучено в модели, индуцированной пептоном, миграции фагоцитов в брюшную полость мышей [8]. Выявлено, что ИЛГ не оказывает подавляющего влияния на миграцию фагоцитов как через 24 ч. (хемотаксис преимущественно нейтрофилов), так и через 72 ч. (хемотаксис преимущественно макрофагов).

Поглощение фагоцитами инфекционного агента реализуется за счет таких механизмов, как: сближение фагоцита и патогена; установление контакта; подготовка к погружению; обволакивание патогена; замыкание мембраны; 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 J49 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.

Таким образом, внутрибрюшинное введение ИЛГ в суммарной дозе 30 мг/кг значимо не влияет на хемотаксис нейтрофилов и макрофагов в ответ на стандартный активатор миграции пептон у мышей Balb/C, а также в диапазоне концентраций 16–128 мкг/мл не ингибирует поглотительную функцию нейтрофилов и моноцитов крови человека в отношении штамма *S. aureus J49 ATCC 25923*. Следует отметить, что в указанных концентрациях ИЛГ выражено ингибирует пролиферацию митоген-активированных Т-лимфоцитов [5], что свидетельствует о том, что ИЛГ проявляет селективные супрессивные свойства в отношении эффекторов адаптивного иммунитета, не затрагивая основные врожденные иммунные реакции фагоцитов.

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) [11], но и с физиологическими процессами (выживание, рост, пролиферация и дифференциация клеток, иммунный ответ) [12]. В частности, важным звеном в реализации врожденных иммунных реакций является запуск массивной продукции АФК («кислородный взрыв») в фагоцитах. Иницирует начало «кислородного взрыва»

никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидаза (НАДФН-оксидаза) (в фагоцитах основной изоформой является НАДФН-оксидаза 2 типа) [13], активация которой может происходить в сигнальном каскаде, связанном с протеинкиназой С, форболовыми эфирами (например, ФМА) [14]. 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. Интенсивность «кислородного взрыва» оценивалась при помощи проточной цитометрии. В ходе экспериментов установлено, что добавление ИЛГ (16-128 мкг/мл) даже к не активированным ФМА клеткам дозозависимо 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 ( $11,3 \pm 3,7$  Ед) и нейтрофилов, не активированных ФМА, но инкубированных с ИЛГ (128 мкг/мл) ( $6,6 \pm 1,6$  Ед), сопоставима со значениями интенсивности флуоресценции ФМА-активированных нейтрофилов, инкубированных с ИЛГ в дозе 128 мкг/мл ( $15,8 \pm 3,0$  Ед). 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 [15]. АФК участвуют в реализации одного из механизмов врожденного иммунного ответа – формировании «нейтрофильных ловушек» (НЛ) [16]. Активированные бактериями (*S. aureus* и *E. coli*) либо химическими веществами (ФМА) нейтрофилы производят АФК и образуют нейтрофильные внеклеточные конгломераты, которые направлены на сдерживание бактериального диссеминирования из очага инфекции [17]. Однако имеются данные, что чрезмерная активация

НЛ ухудшает микроциркуляцию в очаге воспаления [18, 19]. Продемонстрировано, что флавоноиды (эпикатехин, катехин-гидрат и тригидрат рутина, а также лютеолин, кемпферол) подавляют образование АФК-зависимых НЛ [20, 21], а ресвератрол улучшает функции легких во время острых инфекций дыхательных путей или хронических воспалительных заболеваний легких [22].

В некоторых биологических системах, а также в больших концентрациях природные полифенолы могут демонстрировать прооксидантные свойства [23–26]. Так, ИЛГ повышает продукцию АФК в различных опухолевых клетках [27], 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, вызванных увеличением выработки АФК и диссеминации поглощенных бактерий при незавершенном фагоцитозе, что продемонстрировано при исследовании ресвератрола в отношении микобактерий [28].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что предварительное внутрибрюшинное введение ИЛГ в дозе 30 мг/кг самцам мышей Balb/C достоверно увеличивает выживаемость животных в модели инфекционного процесса, вызванного *S. aureus* J 49 ATCC 25923, не ингибирует хемотаксис нейтрофилов и макрофагов у мышей Balb/C. Также выявлено, что ИЛГ в концентрациях 16–128 мкг/мл статистически значимо не влияет на поглощение моноцитами и нейтрофилами периферической крови человека *S. aureus* J49 ATCC 25923, но дозозависимо увеличивает количество фагоцитов, продуцирующих АФК, а также интенсивность «кислородного взрыва» активированных нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека. Таким образом, эти эффекты вкуче могут рассматриваться как один из возможных механизмов выживаемости мышей в ранние сроки развития стафилококковой инфекции у мышей.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность профессору Сидоренко С.В. (ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России) за научные консультации настоящего исследования.

#### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



## ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Солёнова – выполнение экспериментальных работ, статистическая обработка результатов, обработка результатов исследования, написание текста статьи; С.И. Павлова – разработка концепции и дизайна исследования, руководство проведением экспериментальных работ, обработка результатов исследования, редактирование текста статьи.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response // *Nature*. – 2007. – Vol. 449, No. 7164. – P. 819–826. DOI: 10.1038/nature06246.
- Солёнова Е.А., Павлова С.И. Антибактериальные и иммуномодулирующие эффекты флавоноидов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т. 83, №10. – С. 33–39. DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-10-33-39
- Павлова С.И., Албегова Д.З., Кягова А.А., Козлов И.Г. Механизмы иммуносупрессивной активности флавоноидов корня солодки при контактной чувствительности у мышей: угнетение функций Т-лимфоцитов-эффекторов опосредуется неэффекторными клетками // *Медицинская иммунология*. – 2010. – Т. 12, № 6. – С. 503–510. DOI: 10.15789/1563-0625-2010-6-503-510.
- Павлова С.И., Албегова Д.З., Дмитриева Н.В., Дибирова Г.О., Козлов И.Г. Флавоноиды корня солодки влияют на функции активированных Т-лимфоцитов мыши и человека // *Российский иммунологический журнал*. – 2011. – Т. 5, № 14. – С. 62–68.
- Солёнова Е.А., Павлова С.И. Антибактериальные и иммуностропные свойства изоликирителигена при генерализованной стафилококковой инфекции у мышей // *Фармация и фармакология*. – 2020. – Vol. 8, No.3. – P. 78–85. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-3-78-85.
- Percie du Sert N., Hurst V., Ahluwalia A., Alam S., Avey M.T., Baker M., Browne W.J., Clark A., Cuthill I.C., Dirnagl U., Emerson M., Garner P., Holgate S.T., Howells D.W., Karp N.A., Lalic S.E., Lidster K., MacCallum C.J., Macleod M., Pearl E.J., Petersen O., Rawle F., Reynolds P., Rooney K., Sena E.S., Silberberg S.D., Steckler T., Wurbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research // *PLoS Biol*. 2020. – Vol. 18, No.7. – e3000410. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000410.
- Lehmann A. K., Sornes S., Halstensen A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry // *J Immunol Methods*. – 2000. – Vol. 243, No.1–2. – P. 229–242. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00237-4.
- Miyazaki S., Ishikawa F., Fujikawa T., Nagata S., Yamaguchi K. Intraperitoneal Injection of Lipopolysaccharide Induces Dynamic Migration of Gr-1<sup>high</sup> Polymorphonuclear Neutrophils in the Murine Abdominal Cavity // *Clinical Diagn Lab Immunol*. – 2004. – Vol. 11, No.3. – P. 452–457. DOI: 10.1128/CDLI.11.3.452-457.2004.
- Qiao H., Zhang X., Wang T., Liang L., Chang W., Xia H. Pharmacokinetics, biodistribution and bioavailability of isoliquiritigenin after intravenous and oral administration // *Comparative Study Pharm Biol*. – 2014. – Vol. 52, No.2. – P. 228–236. DOI: 10.3109/13880209.2013.832334.
- Han Y.J., Kang B., Yang E.-J., Choi M.-K., I.-S. Song . Simultaneous Determination and Pharmacokinetic Characterization of Glycyrrhizin, Isoliquiritigenin, Liquiritigenin, and Licochalcone in Rat Plasma Following Oral Administration of Glycyrrhizae Radix Extract // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, No.9. – P. 1816. DOI: 10.3390/molecules24091816.
- Yang Y., Bazhin A.V., Werner J., Karakhanova S. Reactive oxygen species in the immune system // *Int Rev Immunol*. – 2013. – Vol. 32, No.3. – P. 249–270. DOI: 10.3109/08830185.2012.755176.
- Preiser J.-C. Oxidative stress // *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. – 2012. – Vol. 36, No.2. – P. 147–154. DOI: 10.1177/0148607111434963.
- Segal A.W. How neutrophils kill microbes // *Annu Rev Immunol*. – 2005. – Vol. 23. – P. 197–223. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653.
- Tauber A.I., Brettler D.B., Kennington E.A., Blumberg P. M. Relation of Human Neutrophil Phorbol Ester Receptor Occupancy and NADPH-Oxidase Activity // *Blood*. – 1982. – Vol. 60, No.2. – P. 333–339.
- Winterbourn C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species // *Nat Chem Biol*. – 2008. – Vol. 4, No.5. – P. 278–286. DOI: 10.1038/nchembio.85.
- Delgado-Rizo V., Martínez-Guzmán M.A., Iñiguez-Gutierrez L., García-Orozco A., Alvarado-Navarro A., Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview // *Front Immunol*. – 2017. – Vol. 8, No.81. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00081.
- Vong L., Lorentz R.J., Assa A., Glogauer M., Sherman P.M. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps // *J Immunol*. – 2014. – Vol. 192. – P. 1870–1877. DOI: 10.4049/jimmunol.1302286.
- Fadini G.P., Menegazzo L., Rigato M., Scattolini V., Poncina N., Bruttocao A., Ciciliot S., Mammano F., Ciubotaru C.D., Brocco E., Marescotti M.C., Cappellari R., Arrigoni G., Million R., Vigili de Kreutzenberg S., Albiro M., Avogaro A. NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans // *Diabetes*. – 2016. – Vol. 65. – P. 1061–1071. DOI: 10.2337/db15-0863.
- Beiter K., Wartha F., Albiger B., Normark S., Zychlinsky A., Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps // *Curr Biol*. – 2006. – Vol. 16. – P. 401–407. DOI: 10.1016/j.cub.2006.01.056.
- Kirchner T., Hermann E., Möller S., Klinger M., Solbach W., Laskay T., Behnen M. Flavonoids and 5-aminosalicylic acid inhibit the formation of neutrophil extracellular traps // *Mediators Inflamm*. – 2013. – Vol. 2013. DOI: 10.1155/2013/710239.
- Yang S.-C., Chen P.-J., Chang S.-H., Weng Y.-T., Chang F.R., Chang K.Y., Chen C.-Y., Kao T.-I., Hwang T.-L. Luteolin attenuates neutrophilic oxidative stress and inflammatory arthritis by inhibiting Raf1 activity // *Biochem Pharmacol*. – 2018. – Vol. 154. – P. 384–396. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.06.003.
- Vargas J.E., Souto A.A., Pitrez P.M.C., Stein R.T., Porto B.N. Modulatory potential of resveratrol during lung inflammatory disease // *Med Hypotheses*. – 2016. – Vol. 96. – P. 61–65. DOI: 10.1016/j.mehy.2016.09.023.
- de la Lastra C.A., Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications // *Biochemical Society Transactions*. 2007. Vol. 35, Pt 5. – P. 1156–1160. DOI: 10.1042/BST0351156.

24. Galati G., Sabzevari O., Wilson J.X., O'Brien P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics // *Toxicology*. – 2002. – Vol. 177, No.1. – P. 91–104. DOI: 10.1016/s0300-483x(02)00198-1.
25. Madrigal-Perez L.A., Ramos-Gomez M. Resveratrol Inhibition of Cellular Respiration: New Paradigm for an Old Mechanism // *Int J Mol Sci*. – 2016. – Vol. 17, No.3. – P. 368. DOI: 10.3390/ijms17030368.
26. Eghbaliferiz S., Iranshahi M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals // *Phytother Res*. – 2016. – Vol. 30, No.9. – P. 1379–1391. DOI: 10.1002/ptr.5643.
27. Yuan X., Zhang B., Chen N., Chen X.-Y., Liu L.-L., Zheng Q.-S., Wang Z.P. Isoliquiritigenin treatment induces apoptosis by increasing intracellular ROS levels in HeLa cells // *Asian Nat Prod Res*. – 2012. Vol. 14, No.8. – P. 789–798. DOI: 10.1080/10286020.2012.694873.
28. Calabrese E.J., Mattson M.P., Calabrese V. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance // *Hum Exp Toxicol*. – 2010. – Vol. 29, No.12. – P. 980–1015. DOI: 10.1177/0960327110383625.

#### АВТОРЫ

**Солёнова Елена Александровна** – младший научный сотрудник, старший преподаватель кафедры фармакологии, клинической фармакологии и биохимии, ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова». ORCID ID: 0000-0001-6104-0864. E-mail: elensoul@mail.ru

**Павлова Светлана Ивановна** – доктор медицинских наук, заведующая кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и биохимии, ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова». ORCID ID: 0000-0001-9976-7866. E-mail: flavonoid@yandex.ru