

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего  
образования

«Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

На правах рукописи

**Маруф Разан**

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ  
РАСТЕНИЙ НА ПОЛИРЕЗИСТЕНТНЫЕ УРОПАТОГЕННЫЕ E. COLI**

1.5.11 Микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук, доцент  
Ермолаев Андрей Владимирович

Москва – 2024

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	6
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	17
1.1. УПЭК: введение .....	17
1.2. УПЭК: главный возбудитель инфекций мочевыводящих путей (ИМП) .....	20
1.3. Факторы вирулентности УПЭК.....	23
1.4. Устойчивость УПЭК к антибиотикам .....	28
1.5. Механизмы устойчивости к антибиотикам у УПЭК.....	31
1.6. Лечение ИМП .....	34
1.6.1. Антибактериальная терапия .....	34
1.6.2. Лекарственные растения для лечения и профилактики ИМП .....	36
1.6.2.1. Сирийский сумах ( <i>Rhus coriaria</i> L.) .....	39
1.6.2.2. Гвоздика ( <i>Syzygium aromaticum</i> L.).....	40
1.6.3. Зелено-синтезированные наночастицы серебра (AgNPs): эффективные антибактериальные агенты.....	42
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	45
2.1. Штаммы микроорганизмов .....	45
2.2. Питательные среды .....	45
2.3. Условия культивирования бактерий .....	45
2.4. Реактивы .....	46
2.5. Стерилизация .....	46
2.6. Антибиотики .....	47
2.7. Микроскопия.....	47

2.8. Профиль чувствительности к антибиотикам (антибиотикограмма).....	47
2.8.1. MAR-индекс и выявление МЛУ .....	48
2.9. Растения и экстракция .....	48
2.9.1. Растительные материалы.....	48
2.9.2. Приготовление водных экстрактов растений.....	50
2.9.3. Приготовление водно-спиртовых экстрактов растений.....	50
2.9.4. Приготовление исходных растворов экстрактов .....	50
2.10. Антибактериальный скрининг экстрактов <i>in vitro</i> .....	51
2.10.1. Диффузионный метод в агаровых лунках .....	51
2.10.2. Количественный антибактериальный анализ с помощью МИК и МБК .....	52
2.10.2.1. Соотношение МБК/МИК.....	53
2.10.3. Агглютинация дрожжей.....	53
2.10.4. Гемагглютинация.....	54
2.10.5. Адгезия к поверхности из полистирола .....	54
2.10.6. Морфология.....	55
2.10.7. Влияние длительного воздействия экстракта сумаха на чувствительность бактерий к антибиотикам и экстракту .....	56
2.10.8. Тест на синергизм .....	56
2.10.9. Тест на утечку белка.....	58
2.10.10. Тест на утечку ДНК и РНК .....	59
2.11. Исследования <i>in vivo</i> с использованием <i>Galleria mellonella</i> .....	60
2.11.1. Изменения патогенности бактерий после воздействия экстракта сумаха...	60
2.11.1.1. Длительное инкубирование бактерий с экстрактом сумаха.....	60
2.11.1.2. Кратковременное инкубирование бактерий с экстрактом сумаха .....	61

2.11.1.3. Условия бактериальной инфекции.....	61
2.11.2. Оценка токсичности сумаха .....	62
2.11.3. Исследование выживаемости личинок GM после обработки экстрактом сумаха .....	63
2.12. Биосинтез, характеристика и антибактериальный скрининг AgNPs.....	63
2.12.1. Приготовление водных экстрактов растений .....	63
2.12.2. Зеленый синтез AgNPs .....	63
2.12.3. Характеристика синтезированных AgNPs .....	64
2.12.4. Антибактериальный скрининг AgNPs.....	64
2.13. Статистический анализ.....	65
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>66</b>
3.1. Водно-спиртовая экстракция .....	66
3.2. Профиль чувствительности к антибиотикам (антибиотикограмма).....	67
3.2.1. MAR-индекс и выявление МЛУ .....	69
3.3. Антибактериальный скрининг экстрактов растений <i>in vitro</i> .....	70
3.3.1. Диффузионный метод в агаровых лунках .....	71
3.3.2. МИК и МБК.....	76
3.3.2.1. Соотношение МБК/МИК.....	79
3.3.3. Агглютинация дрожжей и гемагглютинация .....	79
3.3.4. Адгезия к поверхности из полистирола.....	83
3.3.5. Влияние экстрактов растений на морфологию УПЭК .....	84
3.3.6. Влияние длительного воздействия экстракта сумаха на чувствительность УПЭК к антибиотикам.....	89
3.3.7. Синергизм.....	89

3.3.8. Утечка белка, ДНК и РНК .....	95
3.4. Исследования <i>in vivo</i> с использованием <i>Galleria mellonella</i> .....	95
3.5. Биосинтез, характеристика и антибактериальный скрининг AgNPs .....	99
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	105
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	108
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	111

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- AgNPs – Наночастицы серебра
- dH<sub>2</sub>O – Дистиллированная вода
- ESBL – β-лактамазы расширенного спектра действия
- GM – *Galleria mellonella*
- MAR-индекс – Индекс множественной устойчивости к антибиотикам
- PAIs – Острова патогенности
- PBS – Физиологический раствор с фосфатным буфером
- UDP-GlcNAc – Уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин
- ВБС – Внутриклеточные бактериальные сообщества
- ВнПЭК – Внекишечные патогенные *E. coli*
- ДМСО – Диметилсульфоксид
- ДПГ – Дрожжеподобные грибы
- ИМП – Инфекции мочевыводящих путей
- КОЕ – Колониеобразующая единица
- ЛПС – Липополисахариды
- МБК – Минимальная бактерицидная концентрация
- МИК – Минимальная ингибирующая концентрация
- МЛУ – Множественная лекарственная устойчивость
- МР – Маннозоустойчивый
- МС – Маннозочувствительный
- НМВ – Наружные мембранные везикулы
- Т1Ф – Фимбрии 1-го типа
- УПЭК – Уропатогенная *Escherichia coli*
- ШЛУ – Широкая лекарственная устойчивость

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) являются распространенной глобальной проблемой, особенно в развивающихся странах, и представляют собой серьезные медицинские, экономические и социальные проблемы. Основной причиной обострения ИМП является быстрое появление устойчивых к антибиотикам уропатогенных штаммов. Эта устойчивость во многом обусловлена чрезмерным и частым использованием антибиотиков без должного контроля, что позволило бактериям выработать устойчивость к этим препаратам. Вследствие этого, варианты лечения пациентов во многих тяжелых случаях становятся крайне ограниченными или вовсе отсутствуют [1,2]. Женщины чаще, чем мужчины, подвержены ИМП, и у женщин также наблюдается значительно более высокий уровень рецидивов [3].

Уропатогенная *Escherichia coli* (УПЭК) является наиболее частой причиной ИМП. По оценкам, УПЭК ответственна за 95% внебольничных ИМП и 50% – внутрибольничных ИМП [3]. Предполагается, что основным источником этих бактерий является кишечник человека. Они могут покидать пищеварительный тракт и попадать в мочевую систему, вызывая инфекцию [4]. Кроме того, домашние животные также могут служить источником этих бактерий [5,6]. УПЭК способны вызывать инфекции в мочевыводящих путях с помощью сложного многоступенчатого механизма, который опирается на различные факторы вирулентности. Эти факторы помогают бактериям выживать в суровых условиях мочевого выделительной системы и уклоняться от иммунного ответа организма. Как только УПЭК попадает в мочевыделительную систему и прикрепляется к уроэпителиальным клеткам, она способна проникать в них и размножаться. Это запускает воспалительную реакцию организма, который пытается бороться с инфекцией. Кроме того, УПЭК может образовывать бактериальные сообщества, известные как биопленки, которые устойчивы к антибиотикам и их трудно удалить

из организма. Эти биопленки также могут приводить к рецидивирующим инфекциям, когда клетки снова становятся подвижными. Тяжесть инфекций, вызванных УПЭК, может варьировать от легкого цистита до более серьезных состояний, таких как нефрит и бактериемия [7,8].

Лечение инфекций мочевыводящих путей чаще всего осуществляется при помощи антибиотиков. Выбор подходящего антибиотика основывается на чувствительности возбудителя и тяжести инфекции. Несмотря на сообщения о массовом появлении устойчивых штаммов УПЭК, все еще существуют эффективные антибиотики, такие как имипенем, эртапенем, амикацин и нитрофурантоин, к которым у бактерий нет резистентности [9]. Чтобы предотвратить рецидивы заболевания, следует прибегать к антибиотикотерапии в крайнем случае, когда другие методы оказались неэффективны [10].

В последние годы в мире возросла распространенность множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) среди штаммов УПЭК, и ситуация продолжает ухудшаться. В России масштабы этой проблемы также представляют серьезную угрозу для общественного здравоохранения. Значительная часть штаммов УПЭК была идентифицирована как МЛУ, и эта ситуация только ухудшается [11,12]. Факторы риска, связанные с развитием этой устойчивости, включают врожденные аномалии, возраст, частое использование антибиотиков, госпитализацию и другие [13]. УПЭК во всем мире выработала устойчивость к широкому спектру антибиотиков, включая пероральные цефалоспорины первого и третьего поколения, фторхинолоны, ампициллин, цефуроксим, ко-тримоксазол (TMP-SMZ), налидиксовую кислоту, амоксициллин-клавуланат, аминопенициллины и цефрадин [9]. Основным механизмом передачи и приобретения устойчивости между бактериями является горизонтальный перенос генетических элементов, таких как интегроны, транспозоны, генные кассеты и вставочные последовательности [14].

Из-за сложностей и высокой стоимости разработки новых антибиотиков в последние десятилетия во всем мире наблюдается значимая тенденция к поиску

альтернативных методов лечения бактериальных инфекций и преодоления их устойчивости. Наиболее перспективными альтернативами антибиотикам являются вакцины, пробиотики, бактериофаги, наночастицы и фитохимические вещества [9,15]. Лекарственные растения стали высокоэффективными и перспективными источниками препаратов для альтернативного лечения. Они привлекли значительное внимание в последние десятилетия благодаря положительным результатам в борьбе с микробными патогенами различной этиологии [16]. Считается, что растительные соединения в меньшей степени провоцируют развитие устойчивости у бактерий благодаря их способности одновременно воздействовать на множественные участки бактериальной клетки, что усложняет выработку механизмов устойчивости у последних [17,18].

Лекарственные растения содержат широкий спектр веществ, обладающих доказанной эффективностью в качестве противобактериальных средств. К наиболее важным из этих соединений относятся алкалоиды, органические серные соединения, фенольные кислоты, флавоноиды, дубильные вещества, кумарины и терпеноиды. Научные эксперименты показали, что эти фитохимические вещества могут напрямую влиять на различные процессы жизнедеятельности бактерий и подавлять их. Кроме того, они способны проявлять синергетический эффект с традиционными антибиотиками, восстанавливая чувствительность бактерий к ранее неэффективным препаратам [16]. Лекарственные растения демонстрируют способность препятствовать различным жизненно важным процессам уропатогенных бактерий, вызывающих ИМП. Эти процессы включают рост, адгезию, образование биопленок, подвижность, межклеточную коммуникацию, усвоение железа и многое другое. Благодаря таким обнадеживающим открытиям использование лекарственных растений представляет собой перспективное направление в лечении ИМП.

Лекарственные растения находят новые применения в борьбе с инфекционными заболеваниями благодаря технологии, известной как “зеленый синтез наночастиц”. Эта технология использует растительные соединения для

восстановления ионов металлов, а также в качестве стабилизаторов и регуляторов формы наночастиц. В качестве противобактериального агента, особое внимание привлекают препараты на основе наночастиц серебра (AgNPs) из-за их эффективности и низкой стоимости. Этот инновационный метод является экономичным, экологически безопасным и эффективным в борьбе как с грамположительными, так и с грамотрицательными бактериями [19,20].

Таким образом, значимость данного исследования заключается в изучении антибактериального эффекта лекарственных растений в отношении полирезистентных штаммов УПЭК. Еще одним важным аспектом данного исследования является использование растительных экстрактов в качестве восстановителей и стабилизаторов при синтезе AgNPs.

### **Степень разработанности темы**

В последние годы растет интерес к изучению эффективности лекарственных растений в отношении широкого спектра патогенов. Однако, несмотря на тщательный поиск по базам данных ScienceDirect и PubMed, а также по поисковой системе Google Scholar в начале исследования в 2019 г., нами не было найдено исследований, посвященных антибактериальному действию сумаха или заатара по отношению к УПЭК. Кроме того, было проведено несколько исследований по антибактериальной активности гвоздики по отношению к УПЭК, но в них использовалось только эфирное масло или коричный альдегид.

В целом, все исследованные нами растения либо мало изучены, либо вообще не изучались на предмет их эффективности по отношению к УПЭК. Необходимо отметить, что антибактериальная активность AgNPs, полученных из гвоздики, заатара, крапивы, лимонной вербены и зеленого чая, по отношению к УПЭК также ранее не исследовалась. Более того, AgNPs из заатара ранее не синтезировались.

Синергетическое действие гвоздики, сумаха и антибиотиков также не было широко изучено. В частности, только одно исследование было посвящено синергическому антибактериальному действию комбинации гвоздики и сумаха.

В последние годы *Galleria mellonella* приобрела все большую популярность в качестве модели *in vivo*. Однако до сих пор существует ограниченное количество исследований, в которых эта модель использовалась для оценки токсичности экстрактов растений и патогенности УПЭК.

**Целью** данного исследования является изучение антибактериального действия растительных экстрактов на штаммы УПЭК *in vitro* и *in vivo*, а также синтез AgNPs с использованием растительных экстрактов и тестирование их антибактериальной активности на УПЭК.

**Основные задачи исследования:**

1. Определить профиль чувствительности к антибиотикам тестируемых штаммов и их индекс множественной устойчивости к антибиотикам (MAR-индекс) и выявить МЛУ.
2. Приготовить водно-спиртовые растительные экстракты и определить их минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) и минимальную бактерицидную концентрацию (МБК).
3. Изучить способность УПЭК вырабатывать устойчивость к растительным экстрактам и способность растительных экстрактов изменять чувствительность бактерий к антибиотикам после длительного воздействия экстрактов.
4. Изучить влияние растительных экстрактов на свойства УПЭК (адгезию, агрегацию, морфологию и целостность клеточных мембран) и исследовать синергию между растительными экстрактами и традиционными антибиотиками, а также между самими экстрактами.
5. Синтезировать AgNPs с использованием водных растительных экстрактов и протестировать их антибактериальную активность на УПЭК.
6. Использовать модель *G. mellonella* для исследования *in vivo* токсичности растительных экстрактов и их способности ослаблять патогенность УПЭК.

**Научная новизна:**

1. Впервые был исследован антибактериальный эффект экстрактов растений сумаха и заатара по отношению к УПЭК.
2. Было оценено антибактериальное действие водно-спиртового экстракта гвоздики по отношению к УПЭК, которое ранее не изучалось в этом контексте.
3. Впервые изучен синергетический эффект гвоздики, сумаха и антибиотиков по отношению к УПЭК и выявлено, что экстракты гвоздики и сумаха могут проявлять синергетический антибактериальный эффект в их сочетании с нитрофурантоином или друг с другом по отношению к УПЭК.
4. Впервые была изучена антибактериальная активность AgNPs, изготовленных из различных растительных экстрактов (гвоздики, заатара, крапивы, лимонной вербены и зеленого чая) по отношению к УПЭК. AgNPs из заатара впервые были синтезированы.
5. Впервые использована модель личинок *Galleria mellonella* для исследования токсичности экстракта сумаха и его способности снижать патогенность УПЭК.

**Теоретическое и практическое значение работы**

Учитывая постоянно растущую устойчивость патогенных бактерий к антибиотикам, лекарственные растения представляются очень перспективной стратегией в борьбе с этой проблемой. Разработка антибактериальных средств из лекарственных растений является крайне выгодным подходом с точки зрения экономической эффективности и экологической безопасности. При этом, включение лекарственных растений в рацион питания может служить профилактической мерой в отношении ИМП, а также их можно использовать в качестве легкодоступных пищевых добавок. Данное исследование продемонстрировало антибактериальные свойства трех лекарственных растений – сумаха, гвоздики и заатара – по отношению к устойчивым к антибиотикам штаммам УПЭК, а также их влияние на различные биологические процессы и свойства бактериальных клеток. Кроме того, нами была обнаружена выраженная противoadгезивная активность сумаха по отношению к УПЭК. Результаты работы

могут служить основой более комплексных исследований, направленных на выявление активных антибактериальных веществ и изучение специфических механизмов их действия, обуславливающих антибактериальную активность этих растений.

Кроме того, было продемонстрировано синергетическое действие сумаха и гвоздики с нитрофурантоином, а также друг с другом. Это открывает перспективы для разработки комбинированной терапии, направленной на воздействие на несколько мишеней в бактериальной клетке и снижение риска возникновения устойчивости бактерий к соответствующим препаратам.

### **Методология диссертационного исследования**

Предмет исследования – штаммы УПЭК.

Объекты исследования – антибактериальная активность экстрактов растений по отношению к УПЭК.

Для достижения цели исследования был выбран комплексный методологический подход, объединяющий микробиологические, микроскопические и биотехнологические методы. Полученные в ходе экспериментов результаты были обработаны с использованием современных статистических методов.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Эффективные антибактериальные свойства в отношении МЛУ-УПЭК были выявлены у водно-спиртовых экстрактов сумаха, гвоздики и заатара. МИК и МБК этих экстрактов составляют 3.125-50 мг/мл, при этом сумах проявляет наибольшую эффективность, а гвоздика и заатар следуют за ним. Все эти растения демонстрируют бактерицидные свойства в отношении УПЭК. Оценка токсичности экстракта сумаха в личинках *G. mellonella* показывает что он безопасен и нетоксичен (LD50=9.10 г/кг).

2. Ингибирование маннозочувствительной агглютинации УПЭК с *S. cerevisiae* экстрактами сумаха, гвоздики и заатара свидетельствует о подавлении активности

фимбрий 1-го типа. Гвоздика оказывает наиболее выраженное ингибирующее действие на лектины УПЭК, подавляя также агглютинацию с ДПГ *C. albicans*.

3. Ингибирование гемагглютинации УПЭК с эритроцитами человека и значительное подавление адгезии УПЭК к полистирольным поверхностям достигаются при воздействии экстракта сумаха.

4. Переход бактериальных клеток УПЭК в нестабильную L-форму был вызван экстрактами гвоздики, сумаха и заатара в различных процентах (до 99% с экстрактом гвоздики). Сумах также вызывает значительное удлинение и филаментацию у одного штамма УПЭК.

5. Синергетический антибактериальный эффект в отношении МЛУ-УПЭК был выявлен при воздействии экстрактов гвоздики и сумаха в сочетании с нитрофурантоином или друг с другом. Комбинация антибиотиков (ципрофлоксацин или нитрофурантоин) с экстрактами растений (гвоздика или сумах) или только растительных экстрактов (гвоздика и сумах) привела к снижению МИК всех агентов по отношению к УПЭК.

#### **Апробация работы и публикации**

Материалы и результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на Российских научно-практических конференциях: ежегодный всероссийский конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И.Покровского (г. Москва, март 2023 года); XIV International scientific conference #SCIENCE4HEALTH (г. Москва, 14 – 15 апрель 2023 года); XV International scientific conference #SCIENCE4HEALTH (г. Москва, 25 – 26 апрель 2024 года).

В рамках диссертации опубликовано 7 публикаций, 2 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК, 4 в изданиях, индексируемых в базе Scopus, и 1 в материалах конференции.

## Публикации:

1. Marouf R.S., Mbarga J.A.M., Ermolaev A.V. et al. Antibacterial activity of medicinal plants against uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2022; 14(1): 1-12. DOI: 10.4103/jpbs.jpbs\_124\_21.

2. Razan Marouf, Andrey Ermolaev, Irina Podoprigora et al. Syrian sumac (*Rhus coriaria* L.)—An effective medicinal plant against multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2022; 12(5): 230-239. DOI: 10.7324/JAPS.2022.120522.

3. Marouf R., Ermolaev A.B., Podoprigora I.V. et al. Antibacterial activity of clove *syzygium aromaticum* L. and synergism with antibiotics against multidrug-resistant uropathogenic *E. coli*. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2023; 27(3): 379-390. DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-3-379-390.

4. Mbarga Manga Joseph Arsène, Podoprigora Irina Viktorovna, Anyutoulou Kitio Linda Davares et al. Antibacterial activity of grapefruit peel extracts and green-synthesized silver nanoparticles. *Veterinary World*. 2021; 14(5): 1330-1341. DOI: 10.14202/vetworld.2021.1330-1341.

5. Mbarga M. J. Arsène, Anyutoulou K. L. Davares, Smolyakova L. Andreevna et al. The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. *Veterinary World*. 2021; 14(2): 319-328. DOI:10.14202/vetworld.2021.319-328.

6. Mbarga M.J.A., Marouf R., Podoprigora I.V. et al. Long exposure impact of antibiotics subinhibitory doses and silver nanoparticles on uropathogenic bacteria. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2023; 27(3): 391-402. DOI: 10.22363/2313-0245-2023-27-3-391-402.

7. Маруф Р. Влияние растительных экстрактов на способность клинических изолятов уропатогенных *E. coli* (УПЕК) к агглютинации с дрожжами. В сб.: XV Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И.Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы»; 2023: С. 143-143

### **Личный вклад автора**

В ходе выполнения диссертационной работы автором был проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. На основе анализа сформулированы цели и задачи исследования, а также разработан дизайн исследования. Автором самостоятельно разработаны протоколы исследования и подготовлены материалы для статистической обработки полученных данных. Автором самостоятельно был осуществлен сбор, обработка и интерпретация полученных данных. На основе проведенного исследования автором подготовлены и опубликованы научные статьи.

### **Объем и структура диссертации**

Работа представлена на 137 страницах машинописного текста, содержит 18 рисунков и 10 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения собственных исследований, заключения, выводов, списка принятых сокращений и списка литературы. Список литературы включает 251 источников.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. УПЭК: введение

*Escherichia coli* (кишечная палочка, *E. coli*) является в настоящее время наиболее изученным микроорганизмом, возбудителем широкой группы инфекционных заболеваний. С точки зрения таксономии, *E. coli* относится к виду семейства Enterobacteriaceae [21] и является ярким представителем подгруппы энтеробактерий гамма-протеобактерии [22]. *E. coli* – грамотрицательная, факультативно-анаэробная, палочковидная бактерия. Этот бактериальный вид известен как преобладающий представитель кишечной флоры человека, который колонизирует желудочно-кишечный тракт младенца в течение нескольких часов после рождения [23].

*E. coli* обладает способностью выживать и колонизировать многочисленные экологические ниши как во внешней среде, так и внутри организмов-хозяев человека и животных [8]. Обычно она обитает в кишечнике позвоночных [22], где живет как представитель комменсальной флоры, часто образующей взаимовыгодные симбиотические отношения со своим хозяином. *E. coli* обеспечивает хозяина питательными веществами, участвует в регуляции иммунитета и играет роль в защите от чужеродных патогенов [24]. При определенных условиях эта безвредная комменсальная бактерия может превратиться в патоген, вызывая серьезные инфекции у хозяина. Такие условия могут возникнуть при ослаблении или подавлении иммунной системы и нарушении барьерных функций желудочно-кишечного тракта. В целом, существует три основных клинических синдрома, вызванные инфекциями патогенной *E. coli*: инфекции мочевыводящих путей, кишечные/диарейные заболевания и сепсис/менингит. Таким образом, патогенные штаммы *E. coli* можно классифицировать как диареогенные *E. coli* или внекишечные патогенные *E. coli* (ВнПЭК) [8,25]. Внутри каждой из этих групп существуют наборы штаммов

(патотипы), обладающие общими факторами вирулентности и вызывающие сходные патогенетические эффекты [26].

ВнПЭК, по всей видимости, происходят из кишечника, где они выживают, не вызывая заболеваний. Однако обладая способностью распространяться на другие экологические ниши организма хозяина, включая мочевыводящие пути, кровь и центральную нервную систему, они могут вызывать серьезные патологии [3]. Распространение ВнПЭК может происходить различными путями, включая загрязненную пищу, половой контакт или фекально-оральный путь [27].

УПЭК представляет собой гетерогенную группу ВнПЭК [7] и является наиболее частым среди ВнПЭК штаммом, вызывающим заболевания у человека [28], действуя как оппортунистический внутриклеточный патоген [8].

На сегодняшний день идентифицировано семь основных филогрупп *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E и F) [29]. Исходя из фенотипических и генотипических свойств штаммов УПЭК, они принадлежат главным образом к четырем филогенетическим группам (A, B1, B2 и D). Эти свойства включают экспрессию факторов вирулентности и наличие геномных островов патогенности (PAIs) [30], помимо наличия генетических маркеров, таких как *chuA*, *ujaA* и фрагмента ДНК TspE4.C2 [31]. Штаммы УПЭК, выделенные от пациентов с ИМП, чаще всего принадлежат к филогенетическим группам B2 и D, за которыми следуют группы A и B1 с меньшей частотой выявления [32].

ВнПЭК имеют больший геном по сравнению с K12 или комменсальной *E. coli*. Предполагается, что такое увеличение размера генома связано с тем, что они содержат больше генов, помогающих им выживать вне кишечника. Действительно, сравнение геномов между ВнПЭК и K12, а также комменсальной *E. coli* показало, что ВнПЭК содержат больше генов PAIs, кодирующих факторы вирулентности, такие как адгезины, секретируемые токсины, вирулентные капсульные антигены и системы захвата железа [8]. Горизонтальный перенос генов PAIs является одним из факторов, приводящих к увеличению размера генома УПЭК [33].

Исследования поверхностного протеома УПЭК показали, что он состоит из высококонсервативных среди различных штаммов белков, включая интегральные белки наружной мембраны и несколько белков захвата железа [34,35].

Как отмечается в обзоре Вайлса и др. [8], штаммы *E. coli* традиционно классифицируются на основе трех антигенов: соматического антигена О, капсульного полисахаридного антигена К и жгутикового антигена Н. Хотя взаимосвязь между экспрессией специфических антигенов и патотипами *E. coli* хорошо изучена, полного понимания того, как эти антигены влияют на патогенез, пока нет. О-антиген представляет собой полимер из ~10–25 повторяющихся субъединиц олигосахаридов. Этот полисахарид является структурным компонентом липополисахарида (ЛПС) бактериальной клеточной стенки [36]. Согласно исследованиям, наиболее частыми серотипами О среди УПЭК, обнаруживаемыми с высокой частотой, являются О1, О2, О4, О6, О7, О8, О16, О18, О25 и О75. Однако специфические К- и Н-антигены у УПЭК присутствуют с менее определенной закономерностью. Отмечается, что наличие К1 или О18-антигенов у изолятов УПЭК часто коррелирует с кодированием большего количества факторов вирулентности по сравнению с другими изолятами ВнПЭК. К1 и К5-антигены демонстрируют молекулярную мимикрию с компонентами тканей, таким образом, они могут нейтрализовать функцию гуморального ответа против уропатогенов [37]. Однако роль, которую специфические К-антигены играют в патогенезе УПЭК, окончательно не доказана [38]. Исследования показали, что некоторые О- и К-антигены помогают некоторым штаммам ВнПЭК выживать, однако влияние этих антигенов на вирулентность УПЭК требует дальнейшего изучения. Известно, что жгутиковый антиген Н участвует в перемещении УПЭК из мочевого пузыря в почки, таким образом, играя важную роль в патогенезе УПЭК [8].

## 1.2. УПЭК: главный возбудитель инфекций мочевыводящих путей (ИМП)

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) – широко распространенное заболевание, считающееся одной из самых частых бактериальных инфекций. По оценкам, ИМП поражает около 150 миллионов человек во всем мире ежегодно [39,40]. ИМП представляют собой серьезную экономическую проблему из-за огромных затрат, необходимых для ежегодного лечения или госпитализации таких пациентов. Например, в США стоимость лечения 11 миллионов человек с ИМП в год составляет почти 6 миллиардов долларов США [41].

ИМП, связанные с оказанием медицинской помощи, являются одними из самых частых внутрибольничных инфекций [42], составляют около 40% всех внутрибольничных инфекций и 50% случаев бактериемии [7]. Обычно ИМП чаще встречаются у женщин, чем у мужчин. По оценкам, почти половина женщин и 12% мужчин переносят ИМП хотя бы один раз в жизни, при этом рецидивирующие ИМП наблюдаются у 27-48% женщин, подверженных этому заболеванию [3]. Одновременно, повторные курсы антибиотикотерапии, назначаемые для лечения рецидивирующих ИМП, способствуют появлению устойчивых уропатогенов [15].

ИМП возникают, когда патоген проникает в мочевыводящую систему и обнаруживается в моче в количестве более  $10^5$  колониеобразующих единиц на миллилитр (КОЕ/мл) [43], и именно бактерии являются основным возбудителем этой инфекции. Среди них преобладают представители семейства Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* и *Enterobacter*. Другие распространенные причины ИМП включают *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, а также дрожжеподобные грибы (ДПГ) *Candida albicans* [7,9].

Классификация ИМП, предложенная Котом [3] и Терлици и др. [9], выглядит следующим образом. По клиническому течению ИМП подразделяются на неосложненные и осложненные. Неосложненные ИМП возникают у лиц с

нормальным строением мочевыводящих путей и отсутствием сопутствующих заболеваний. Такие инфекции, как правило, эффективно устраняются действием иммунных механизмов организма и не требуют антибактериальной терапии. Осложненные ИМП развиваются на фоне анатомических аномалий мочевыводящих путей (задержка мочи, обструкции), почечной недостаточности, иммуносупрессии, предшествующей антибактериальной терапии или использования катетеризации мочевого пузыря и других инструментальных методов исследования. У пациентов с осложненными ИМП повышается риск хронических и/или рецидивирующих инфекций. Лечение таких ИМП обычно требует более длительной терапии антибиотиками. По локализации инфекционного процесса выделяют нижние ИМП (цистит), верхние ИМП (пиелонефрит) и уросепсис. Бессимптомная бактериурия определяется как наличием бактерий в моче в количестве  $\geq 10^5$  КОЕ/мл при отсутствии каких-либо симптомов заболевания. У 20-80% здоровых небеременных женщин бессимптомная бактериурия не требует лечения.

Среди бактериальных возбудителей ИМП, УПЭК является наиболее распространенным как при неосложненных, так и при осложненных инфекциях. На долю УПЭК приходится около 80% случаев неосложненных ИМП, 95% ИМП, приобретенных вне больниц, и половины ИМП, полученных как внутрибольничную инфекцию [3].

Как упоминалось ранее, УПЭК – это группа ВнПЭК, которая, как считается, изначально входит в состав нормальной микрофлоры кишечника [3,7]. Действительно, частая идентичность штаммов УПЭК, выделенных из мочи, и штаммов, выделенных из прямой кишки того же человека, позволяет предположить, что основным резервуаром УПЭК является кишечник человека [44]. Дополнительно, изоляты *E. coli*, полученные от пациентов с ИМП, демонстрируют высокую степень сходства с изолятами, выделенными у сельскохозяйственных животных или из мяса (особенно курицы) по профилям устойчивости к противомикробным препаратам и генетическим детерминантам вирулентности.

Это говорит о том, что сельскохозяйственные животные могут быть резервуаром штаммов *E. coli*, вызывающих ИМП у людей [6,45]. Распространение УПЭК может происходить различными путями, такими как употребление загрязненной пищи, половой контакт или фекально-оральный путь [27].

Патогенез ИМП, вызванных штаммами УПЭК, представляет собой сложный многоэтапный процесс и подробно описан в работах Вайлса и др. [8], Терлицци и др. [9] и Асади и др. [7]. Штаммы *E. coli* из кишечника проникают в мочевыводящую систему, колонизируя периуретральную область, влагалище и уретру. Часть этих бактерий затем переходит в подвижную форму и поднимается в просвет мочевого пузыря, где растет как планктонные клетки в моче. С помощью факторов адгезии УПЭК прикрепляются к клеткам уротелия, выстилающим мочевой пузырь. Далее они проникают в цитоплазму этих клеток и быстро размножаются, образуя внутриклеточные бактериальные сообщества (ВБС). Внутри ВБС численность УПЭК может достигать  $10^5$  бактерий на клетку. Иммунная система реагирует на присутствие УПЭК воспалительным ответом, который включает инфильтрацию нейтрофилами, выработку цитокинов, десквамацию клеток уротелия, содержащих ВБС, в мочу, а также образование реактивных форм азота и кислорода и других противомикробных соединений. За счет образования ВБС обнажаются и становятся более восприимчивыми к инфекции нижележащие незрелые клетки уротелия. УПЭК их инфицирует и формирует неактивные внутриклеточные резервуары, менее чувствительные ко многим антибиотикам. Предполагается, что эти резервуары могут реактивироваться, вызывая рецидивирующие ИМП. Рецидив также возможен при повторном попадании *E. coli* из кишечника в мочевыводящую систему. Бактерии из ВБС могут трансформироваться в нитевидные и подвижные формы, выходить из инфицированных клеток и вторгаться в непораженные клетки мочевого пузыря, образуя новые ВБС. Кроме того, бактерии, вырвавшиеся из биопленок, поднимаются вверх по мочеточникам и колонизируют почки, вызывая

пиелонефрит. УПЭК также может распространяться из мочевыводящих путей в кровотока, приводя к бактериемии/сепсису.

### **1.3. Факторы вирулентности УПЭК**

Мочевыводящая система – неблагоприятная среда для бактерий. Выжить в ней сложно из-за постоянного тока мочи и иммунного ответа организма на инфекцию. Тем не менее, УПЭК выработала ряд “хитрых” стратегий, позволяющих ей выживать и колонизировать мочевыводящие пути. Эти стратегии реализуются с помощью различных факторов вирулентности, таких как фимбриальные и нефимбриальные адгезины, курли, ЛПС, поверхностные везикулы, полисахаридная капсула, жгутики, секретируемые токсины, двухкомпонентные системы регуляции, а также системы захвата железа [9]. Эти факторы вирулентности могут передаваться между бактериями с помощью генетических элементов, таких как транспозоны, плазмиды, бактериофаги и острова патогенности [7]. Исследования транскриптомики позволили определить общий профиль транскрипции для УПЭК во время ИМП, подтвердив экспрессию ряда генов вирулентности, которые играют критически важную роль в патогенезе УПЭК [9]. Однако, исследования показали высокое разнообразие геномов УПЭК и значительные различия в наборе и уровне экспрессии факторов вирулентности среди различных штаммов [8,9].

Фимбрии (также называемые пилиями) – это длинные нитевидные структуры, которые присутствуют на поверхности бактериальной клетки в количестве до 500 штук. Они представляют собой полимерные нетоксичные белки, состоящие из повторяющихся субъединиц пилина. Фимбрии являются адгезивными органеллами, которые опосредуют специфическое прикрепление бактерий к клеткам хозяина, играя критическую роль в колонизации тканей хозяина [46,47]. В случае УПЭК фимбрии являются важнейшим фактором вирулентности, позволяющим им адгезироваться (прикрепляться) к эпителиальным клеткам мочевыводящего тракта, персистировать и колонизировать его. Фимбрии УПЭК

можно разделить на маннозочувствительные (МС) и маннозоустойчивые (МР). Фимбрии 1-го типа (Т1Ф) – широко распространенные МС-фимбрии у штаммов *E. coli*. Т1Ф представляют собой гетерополимеры, состоящие из основной субъединицы (FimA), нескольких второстепенных субъединиц (FimC, FimD, FimF и FimG) и адгезина (FimH) на дистальном конце фимбрии. Fim оперон – это конститутивный кластер генов, расположенный в бактериальной хромосоме. Экспрессия этого оперона переменна по фазе, что позволяет бактериальной клетке переключаться между фазой включения (пилированные клетки) и фазой выключения (непилированные клетки) в ответ на сигналы окружающей среды внутри мочевыводящего тракта. Адгезин FimH опосредует связывание УПЭК с маннозилированными белками на эпителии мочевого пузыря (уроплакины). Это связывание стимулирует проникновение бактерий в эпителиальные клетки мочевого пузыря с последующим образованием ВБС и устойчивых биопленкоподобных структур. Было показано, что клетки УПЭК, экспрессирующие Т1Ф, локализованы в области биопленки, контактирующей с воздухом. С другой стороны одними из наиболее распространенных МР-фимбрий у УПЭК являются Р-фимбрии. Аналогично Т1Ф, Р-фимбрии состоят из основной субъединицы (PapA), трех второстепенных субъединиц (PapE, PapF и PapK), а на дистальном конце фимбрии располагается адгезин PapG, который опосредует связывание с эпитопом дигалактозида ( $\text{Gal } \alpha (1-4) \text{ Gal}$ ) гликолипидов в эритроцитах человека группы крови Р. Р-фимбрии, по сравнению с Т1Ф, играют более важную роль в колонизации почек УПЭК и тесно связаны с пиелонефритом. В отличие от Т1Ф, оперон pap, кодирующий Р-фимбрии, является частью острова патогенности, который кодирует и другие предполагаемые факторы вирулентности. Кроме того, S-фимбрии также относятся к МР-фимбриям, имеющим аналогичную основную структуру, что и Р-фимбрии и Т1Ф. Они состоят из основной субъединицы (SfaA), второстепенных субъединиц (SfaG и SfaH) и адгезина SfaS, который опосредует связывание с сиалосодержащими структурами на эпителиальных клетках почек. Еще одна группа МР-фимбрий – F1С-фимбрии, которые связывают  $\beta$ -

галактозидные остатки гликолипидных рецепторов, присутствующих как в мочевом пузыре, так и в почках. [7,9,47].

Помимо фимбрий, у УПЭК присутствуют различные нефимбриальные адгезины. Они представлены отдельными белками или крупными многокомпонентными агрегатами на поверхности бактериальной клетки [9]. В УПЭК *TosA* является одним из известных нефимбриальных адгезинов, экспрессируемых во время ИМП. Исследования на моделях животных показали его участие в колонизации мочевыводящих путей [48]. В дополнение к этому, *Iha* – это железорегулирующий нефимбриальный адгезин, который, как известно, опосредует связывание бактерий с эпителиальными клетками мочевого пузыря (Johnson et al., 2005). Другими важными нефимбриальными адгезинами у УПЭК являются представители семейства аутотранспортёров, такие как *FdeC*, *Ag43*, *UraH* и *UraG*. Все эти адгезины играют роль в патогенности штаммов УПЭК при ИМП [7].

У грамотрицательных бактерий на внешней стороне клеточной оболочки располагаются липополисахариды (ЛПС) или О-антиген – амфипатические структуры. ЛПС состоят из основного компонента – липида А, внедрённого во внешнюю мембрану, связанного с олигосахаридным ядром, к которому присоединена длинная полисахаридная цепь [49]. В процессе инфицирования мочевыводящих путей УПЭК липополисахарид играет многогранную роль, которая включает колонизацию мочевого пузыря, формирование неактивных внутриклеточных резервуаров, уклонение от врожденного и адаптивного иммунного ответа [50], а также устойчивость к гидрофобным антибиотикам [49].

Курли – это нитевидные структуры на поверхности бактерий, относящиеся к амилоидным фибриллам [51]. У *E. coli* курли участвуют в адгезии к поверхности и агрегации клеток [51], а также, по-видимому, способствуют формированию биопленок [52]. Курли широко распространены среди УПЭК и играют роль в прикреплении к клеткам эпителия мочевого пузыря человека [53].

Кроме вышеперечисленного, штаммы УПЭК выделяют несколько токсинов, включая  $\alpha$ -гемолизин, цитотоксический фактор некротизации 1 и токсины-автотранспортеры, такие как вакуолизирующий цитотоксин-автотранспортер и секретлируемый токсин-автотранспортер что является решающим фактором их вирулентности [8]. Используя системы секреции первого и пятого типов УПЭК секретлируют эти токсины [54]. Как правило, данные токсины вызывают множественные повреждающие процессы в клетках хозяина, включая остановку клеточного цикла, лизис клеток или нарушение их формы и функций [8]. Около 50% штаммов УПЭК обладают  $\alpha$ -гемолизином, который широко распространен среди этих бактерий [7]. Такой секретлируемый белок, зависимый от кальция, ассоциирован с целым рядом негативных воздействий на клетки хозяина: лизисом клеток мочевого пузыря и почек, повреждением почек, отшелушиванием эпителиальных клеток мочевого пузыря и индукцией воспалительных реакций [7,9].

Мочевыводящие пути представляют собой среду с ограниченным содержанием железа. Поэтому система захвата железа является жизненно важным свойством для выживания УПЭК в этих условиях [55]. Одной из стратегий захвата железа, используемых УПЭК, являются сидерофоры. Сидерофоры – это хелаторы железа, которые связывают трёхвалентное железо ( $Fe^{+3}$ ) и транспортируют его внутрь бактериальной цитоплазмы [9,56]. У УПЭК для захвата железа присутствуют различные сидерофоры, такие как: йерсиниабактин, сальмохелин, аэробактин и энтеробактин. Еще одна стратегия захвата железа у УПЭК – это рецепторы железа внешней мембраны, такие как Hma и ChuA. Эти рецепторы способны поглощать гем в периплазматическое пространство бактерии. Кроме того, они играют роль в колонизации УПЭК и образовании биопленок и резервуаров [7]. В ответ на захват железа бактериями уроэпителиальные клетки повышают экспрессию генов рецептора трансферрина и липокалина 2 [9].

У грамотрицательных бактерий наружные мембранные везикулы (НМВ) являются еще одним важным фактором вирулентности. НМВ представляют собой

сферические выпячивания наружной мембраны бактерии, которые образуются на протяжении всего роста и во многих средах, включая планктонные формы, биопленки или внутри эукариотических клеток. НМВ выполняют различные функции во время патогенеза, такие как получение питательных веществ, выживание в стрессовых условиях и доставка факторов вирулентности, включая токсины, адгезины, ферменты и ЛПС. НМВ защищают эти вещества от протеаз хозяина и доставляют их в клетки хозяина. Кроме того, НМВ участвуют в распространении устойчивости к антибиотикам среди разнородных бактериальных сообществ [9,57].

Двухкомпонентные системы регуляции – это основной механизм сопряжения стимула и ответа, который позволяет бактериям распознавать и реагировать на широкий спектр внешних раздражителей. Эти системы обычно состоят из мембранозависимого сенсорного гистидин-протеинкиназного белка (НК) и цитоплазматического регулятора ответа (RR), который опосредует клеточный ответ, главным образом, через регуляцию экспрессии целевых генов [58]. Недавние исследования показали, что регуляция некоторых метаболических путей с помощью двухкомпонентных систем регуляции помогает УПЭК адаптироваться и колонизировать мочевыводящие пути. В патогенезе ИМП у УПЭК участвуют следующие системы: система BarA/UvrY, регулирующая переключение между гликолитическим и глюконеогенным путями, системы EvgS/EvgA и PhoQ/PhoP, связанные с устойчивостью к кислоте, а также система KguS/KguR, контролирующая утилизацию  $\alpha$ -кетоглутарата [9].

Еще одним фактором вирулентности бактерий являются жгутики. У *E. coli* жгутики представляют собой тонкие, длинные, спиралевидные нитевидные органеллы, расположенные на внешней стороне клетки. Они состоят из тысяч белковых субъединиц, называемых флагеллином (FliC), и в основном отвечают за подвижность бактерии [59]. У УПЭК жгутики играют важную роль в патогенезе ИМП благодаря обеспечению подвижности. Эта подвижность позволяет бактериям достигать питательных веществ и уклоняться от иммунной системы хозяина [60].

Кроме того, жгутики способствуют перемещению бактерий из мочевого пузыря в почки, тем самым вызывая верхние ИМП [7]. Более того, было показано, что жгутики играют различную роль в процессе формирования биопленки [61].

#### **1.4. Устойчивость УПЭК к антибиотикам**

Для эффективного лечения ИМП антибиотиками в первую очередь необходимо идентифицировать возбудителя и его профиль устойчивости к противомикробным препаратам. В противном случае неадекватная эмпирическая антибактериальная терапия может привести к неэффективному лечению, а также способствовать росту устойчивости среди уропатогенов и появлению множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) у этих патогенов [9,62]. Действительно, многочисленные клинические исследования уже выявили ухудшение ситуации, связанной с распространением устойчивости к антибиотикам и сокращением числа эффективных препаратов [63]. При ИМП, МЛУ ассоциирована с рядом факторов риска, таких как нарушения нормальной функции мочеполовой системы, предшествующее применение антибиотиков, рецидивирующие ИМП, возраст и госпитализация [13].

В последние десятилетия распространение штаммов УПЭК с МЛУ стало серьезной клинической проблемой, особенно в развивающихся странах. Это приводит к чрезмерному использованию антибиотиков широкого спектра действия, высокой стоимости лечения и продлению сроков госпитализации [3]. Устойчивость к антибиотикам среди штаммов УПЭК уже обнаружена в отношении широкого спектра препаратов, включая пероральные цефалоспорины первого поколения, ампициллин, цефуроксим, ко-тримоксазол, триметоприм-сульфаметоксазол (ТМП-СМЗ), налидиксиновую кислоту, амоксициллин-клавуланат, аминопенициллины и цефрадин [9]. Рисунок 1 обобщает наиболее представительные антибиотики, к которым УПЭК проявляет устойчивость или

чувствительность, а также антибиотики, к которым некоторые штаммы УПЭК уже демонстрируют устойчивость.

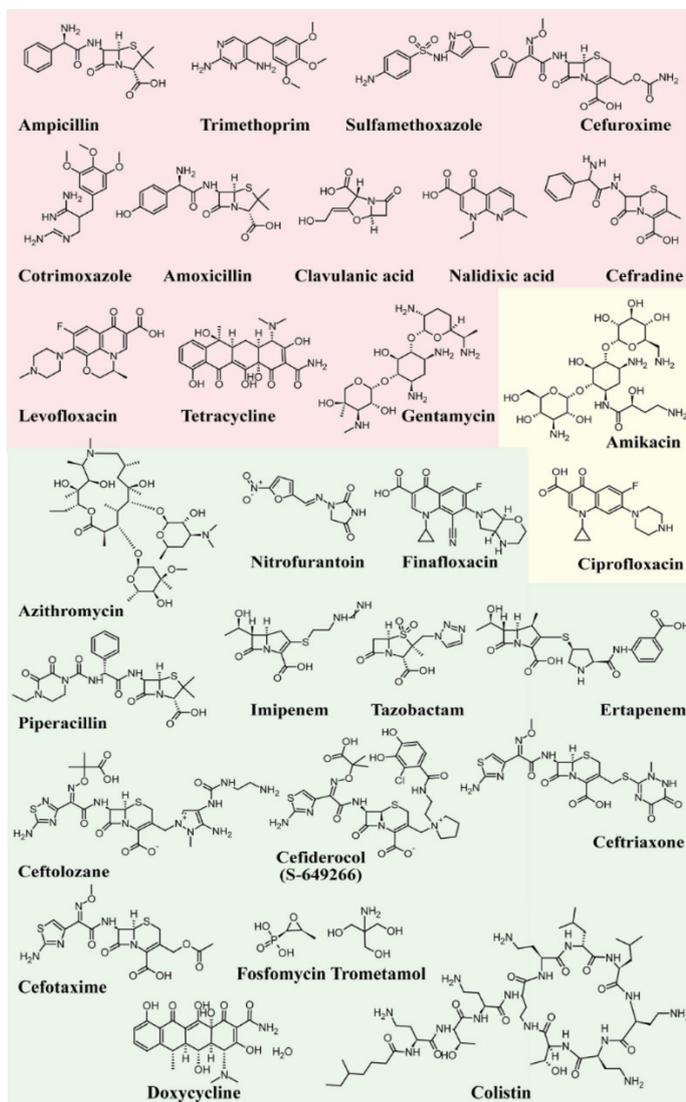


Рисунок 1. Структурные формулы наиболее представительных антибиотиков, к которым УПЭК проявляет устойчивость и чувствительность.

Красный фон указывает на устойчивость, зеленый – на чувствительность, а желтый – на антибиотики, к которым наблюдается устойчивость у некоторых штаммов УПЭК [9].

В Европе уровень устойчивости среди изолятов УПЭК к цефалоспорином третьего поколения составляет 11.8%, а к фторхинолонам – 22.3%. В США в больницах за период 2007–2010 гг. устойчивость изолятов УПЭК к фторхинолонам

достигла 31.3% [64]. Более того, у изолятов УПЭК, полученных от беременных женщин с рецидивирующими ИМП в анамнезе, выявлена существенно возросшая устойчивость к тетрациклину, ампициллину, ципрофлоксацину, гентамицину и амикацину [65].

Рост устойчивости к антибиотикам стал серьезной проблемой здравоохранения в России. За последние годы в стране наблюдается увеличение числа микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам среди пациентов с амбулаторно-приобретенными ИМП. Особенно это касается штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра действия (ESBL) [66]. Рост устойчивости к антибиотикам привел к увеличению продукции фермента ESBL среди штаммов *E. coli*, выделенных у пациентов с амбулаторно-приобретенными ИМП. В период с 2011 по 2018 г. этот показатель вырос с 8.5% до 27% [67]. В исследовании 2022 г., проведенном среди пациентов урологического отделения многопрофильного стационара, было показано, что среди представителей порядка Enterobacterales 26,5% продуцировали ESBL. При этом *E. coli* составили 62,0% [68]. В России ИМП являются вторым по частоте инфекционным заболеванием после ОРВИ. Чаще всего встречаются инфекции нижних отделов мочевыводящих путей, такие как острый и рецидивирующий цистит. По оценкам, острым циститом болеют 11% взрослого женского населения, что составляет примерно 8 миллионов случаев в год по стране. В России устойчивость *E. coli* к фторхинолонам и котримоксазолу превышает 20%. По этой причине эти антибактериальные препараты не рекомендуются для лечения цистита. С 1998 по 2017 г. устойчивость *E. coli* к фторхинолонам выросла с 2% до 36% и продолжила расти, достигнув  $\geq 50\%$  в 2021 г. Также существенно увеличилась устойчивость к цефалоспорином и амоксициллину/клавуланату. Единственными антибиотиками, к которым *E. coli* сохраняет стабильно низкий уровень устойчивости, являются нитрофураны и фосфомицин [67,69].

Рост устойчивости к антибиотикам среди клинических изолятов УПЭК в России вызывает серьезную озабоченность. Это подчеркивает необходимость

сокращения необоснованного и нерационального применения антибиотиков в стране, а также поиска альтернативных и более эффективных подходов для борьбы с данной устойчивостью.

### **1.5. Механизмы устойчивости к антибиотикам у УПЭК**

Распространение штаммов УПЭК с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) в последние годы возросло, что приводит к сложностям в лечении ИМП [70,71]. В целом, одним из механизмов приобретения устойчивости у бактерий является горизонтальный перенос генетических элементов. К ним относятся интеграторы, транспозоны, кассеты генов и вставочные последовательности [Peleg, Hooper, 2010]. Интегроны могут нести несколько генов устойчивости к антибиотикам и передавать их другим бактериям горизонтальным путем. Это происходит за счет интеграции в мобильные элементы ДНК, такие как транспозоны и конъюгативные плазмиды. У клинических штаммов МЛУ-УПЭК были обнаружены интеграторы 1 и 2 классов [73,74]. Исследование Очоа и др. [32] показало связь между интегронами класса 1, филогенетическими группами B2 и D, фимбриальным адгезином, генами поглощения железа и штаммами МЛУ- и ШЛУ-УПЭК.

В течение многих лет бактерии развили широкий спектр сложных механизмов выживания и устойчивости к антибиотикам, особенно под давлением применения и чрезмерного использования этих препаратов.

$\beta$ -лактамы – это самая распространенная в мире группа антибиотиков [75]. Однако, устойчивость к  $\beta$ -лактамам появилась еще до того, как первый  $\beta$ -лактамы (пенициллин) начали применять в медицине. При этом первый фермент  $\beta$ -лактамаза был обнаружен у кишечной палочки [76]. Эта устойчивость опосредуется главным образом  $\beta$ -лактамазными ферментами, которые гидролизуют амидную связь в  $\beta$ -лактамном кольце  $\beta$ -лактамных антибиотиков (пенициллина, цефалоспорина, карбапенемов и монобактамов) [3]. Гены,

кодирующие  $\beta$ -лактамазы, могут располагаться как в хромосоме, так и в плазмидах. У многих родов грамотрицательных бактерий гены  $\beta$ -лактамаз присутствуют на хромосоме изначально. Наиболее распространенными плазмидо-опосредованными  $\beta$ -лактамазами у кишечной палочки являются TEM-1 и SHV-1 [76].

С появлением новых классов  $\beta$ -лактамов бактерии продолжают развивать новые механизмы устойчивости к каждому новому классу [76]. Одним из таких механизмов являются ферменты ESBL. Эти ферменты позволяют бактериям вырабатывать устойчивость к  $\beta$ -лактамам (всем пенициллинам, цефалоспорином и монобактамам), но не к карбапенемам, цефамицинам или ингибиторам  $\beta$ -лактамаз [77]. Эти ферменты были обнаружены у представителей многих родов семейства Enterobacteriaceae по всему миру [76]. В данном семействе ESBL-ферменты являются распространенным механизмом устойчивости Enterobacteriaceae к цефалоспорином третьего и четвертого поколения [78]. У штаммов УПЭК обнаружены три класса ESBL-ферментов: TEM, SHV и CTX-M (цефотаксимазы). Штаммы УПЭК, продуцирующие ESBL, чаще всего встречаются в развивающихся странах [3]. По сравнению с не продуцирующими ESBL штаммами УПЭК у ESBL-продуцирующих штаммов, согласно исследованию Шахбази и др. [79], было обнаружено большее количество изолятов, устойчивых к аминогликозидам и фторхинолонам. Действительно, *E. coli*, продуцирующие ESBL, демонстрируют устойчивость к антибиотикам других классов, помимо  $\beta$ -лактамов, включая аминогликозиды, ко-тримоксазол и тетрацикли [80]. Для лечения ИМП, вызванных ESBL-продуцирующими штаммами УПЭК, препаратами выбора являются карбапенемы (имипенем и меропенем). Пенициллины, цефалоспорины и монобактамы при этом должны использоваться только в сочетании с ингибиторами  $\beta$ -лактамаз [3].

Другие широко используемые группы антибиотиков – это хинолоны и фторхинолоны. Эти антибиотики ингибируют активность ДНК-гиразы и топоизомеразы IV [81]. Эти два фермента относятся к топоизомеразам II типа,

которые контролируют топологические изменения ДНК. Например, ДНК-гираза катализирует негативное сверхскручивание двухцепочечной замкнутой кольцевой ДНК [82]. К сожалению, широкое использование этих антибиотиков для лечения ИМП привело к росту устойчивости у УПЭК [3]. В целом, *E. coli* обладает несколькими механизмами устойчивости к хинолонам и фторхинолонам, которые могут быть хромосомно- или плазмидо-опосредованными. Один из наиболее частых хромосомно-опосредованных механизмов – мутации в генах *gyrA* и *gyrB*, кодирующих ДНК-гиразу [3]. Важнейшим механизмом плазмидо-опосредованной устойчивости к хинолонам являются гены *qnr* (*qnrA*, *qnrB* и *qnrC*), которые ингибируют связывание хинолонов с топоизомеразами [79]. К другим механизмам устойчивости к данным антибиотикам относятся насосы эффлюкса и изменения внешних мембранных пориновых белков, которые приводят к снижению поступления антибиотиков в бактериальную клетку [7].

Нитрофурантоин рекомендован в качестве терапии первой линии при неосложненном цистите [3]. К счастью, нитрофурантоин по-прежнему эффективен против УПЭК в 99,91% случаев [9]. Эта низкая устойчивость УПЭК к нитрофурантоину объясняется его механизмом действия как антибиотика с несколькими мишенями [83]. Однако, было показано, что мутации в генах нитроредуктаз, нечувствительных к кислороду (*nfsA* и *nfsB*), обуславливают устойчивость к нитрофурантоину. С другой стороны, было показано, что данная устойчивость вызывает снижение приспособленности у *E. coli* [84].

Фосфомицин трометамол является одним из противомикробных препаратов, рекомендуемых в Европе при неосложненном пиелонефрите и в качестве терапии первой линии при неосложненном цистите [3]. Помимо этого, он применяется для профилактики рецидивирующих ИМП у женщин [9]. Этот антибиотик относится к производным фосфоновой кислоты из группы фосфомициновых антибиотиков [85]. Фосфомицин проникает в бактериальную клетку и достигает цитоплазмы с помощью белков активного транспорта. Эти же белки транспортируют глюкозо-6-фосфат и глицерол-3-фосфат. В цитоплазме фосфомицин связывается и

инактивирует уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин (UDP-GlcNAc) энолпирувилтрансферазу, действуя как аналог фосфоэнолпирувата (PEP). Инактивация UDP-GlcNAc энолпирувилтрансферазы приводит к необратимому ингибированию биосинтеза пептидогликана и последующим стадиям биосинтеза клеточной стенки. В результате бактериальная клетка лизируется и погибает. [86,87]. Появление устойчивости к фосфомицину связано с тремя основными механизмами, которые используют бактерии для нейтрализации этого антибиотика. Эти механизмы включают мутацию генов транспортных белков, необходимых для проникновения фосфомицина в бактериальную клетку, мутацию участка связывания UDP-GlcNAc энолпирувилтрансферазы с фосфомицином, а также инактивацию фосфомицина путем фосфорилирования или ферментативного расщепления [3].

## **1.6. Лечение ИМП**

### **1.6.1. Антибактериальная терапия**

Выбор антибиотиков для лечения ИМП обычно определяется локальным профилем устойчивости возбудителя инфекции. В соответствии с общеевропейскими показателями чувствительности микроорганизмов и рекомендациями Европейской ассоциации урологов [3], рекомендуемыми противомикробными препаратами при неосложненном цистите у женщин пременопаузального возраста и неосложненном пиелонефрите в Европе являются нитрофурантоин, фосфомицин трометамол и ко-тримоксазол. Здесь в качестве терапии первой линии при неосложненном цистите рекомендуется назначать нитрофурантоин и фосфомицин трометамол. Из-за высокой частоты выявления бактерий с низкой чувствительностью к ко-тримоксазолу его эмпирическое применение не рекомендуется, за исключением случаев, когда чувствительность *E. coli* к ко-тримоксазолу превышает 80%. При более тяжелых инфекциях и сепсисе

рекомендованы фторхинолоны (ципрофлоксацин и левофлоксацин). В частности, цiproфлоксацин применяется как эмпирическая терапия третьей линии при неосложненном цистите и второй линии при легком и умеренном пиелонефрите или осложненной ИМП [3]. В случаях легкого и умеренного пиелонефрита или осложненной ИМП рекомендуется назначать амоксициллин/клавулановую кислоту в качестве терапии первой линии. Кроме того, данное лечение рекомендуется в качестве альтернативной эмпирической терапии неосложненного цистита. Для пациентов с осложненной ИМП (высокая температура, сепсис, рвота) или тяжелым пиелонефритом рекомендуются следующие эмпирические терапии первой линии: амоксициллин с гентамицином или цефалоспорином второго поколения с аминогликозидом. В качестве альтернативной эмпирической терапии также рекомендованы внутривенные цефалоспорины третьего поколения [3].

Для того, чтобы предотвратить или, по крайней мере, минимизировать негативные побочные эффекты длительного применения антибиотиков, рекомендации Европейской ассоциации урологов 2015 года предусматривают профилактику рецидивирующих ИМП в первую очередь за счет изменения поведения пациентов, затем применения немедикаментозных методов и только при недостаточной эффективности первых двух подходов – назначения антибактериальной профилактики [Vahlensieck и др., 2016]. При рецидивирующих ИМП у женщин для антибактериальной профилактики могут применяться такие препараты, как нитрофурантоин, триметоприм (TMP), ко-тримоксазол, фосфомицин трометамол, а также цефалексин или цефаклор во время беременности [9]. Однако применение нитрофурантоина для длительной профилактики часто не рекомендуется из-за редких, но серьезных побочных эффектов со стороны печени и легких [Vahlensieck и др., 2016]. Аналогично, профилактическая эффективность триметоприма (TMP) как отдельно, так и в сочетании с сульфонамидом ставится под сомнение из-за глобального роста устойчивости к нему среди штаммов УПЭК [89].

Терлицци и др. [9] провели обзор исследования четырех наиболее эффективных антибиотиков в отношении УПЭК, основываясь на проценте чувствительных штаммов: имипенем (100%), эртапенем (99,98%), амикацин (99,94%) и нитрофурантоин (99,91%). Карбапенемы считаются лучшим выбором антибиотиков против штаммов с расширенным спектром  $\beta$ -лактамаз (ESBL) [89]. Некоторые антибиотики, к которым также чувствительны штаммы УПЭК, включают цефотаксим, пиперациллин/тазобактам, ципрофлоксацин, азитромицин, цефтриаксон и доксициклин [9]. Интересным оказалось то, что комбинация триклозана с амоксициллином и гентамицином существенно повышает чувствительность уропатогенов к данным антибиотикам [90]. В ретроспективном исследовании Париш и Холлидей [91] показали, что ципрофлоксацин является наиболее часто используемым антибиотиком для эмпирической терапии приобретенных ИМП при длительном лечении (76% случаев), а чувствительность к ципрофлоксацину у возбудителей была выявлена только в 31% случаев. Кроме того, из-за роста устойчивости к фторхинолонам левофлоксацин в монотерапии становится менее эффективным для лечения ИМП, даже в высоких терапевтических концентрациях. В качестве альтернативного метода лечения комбинация цефтолозана/тазобактама демонстрирует более высокую эффективность [92]. Наконец, колистин, финафлоксацин и цефидерокол (S-649266) представляют собой новые антибиотики, находящиеся на стадии клинических исследований, которые могут быть эффективны при лечении ИМП [9].

### **1.6.2. Лекарственные растения для лечения и профилактики ИМП**

ИМП в настоящее время являются одной из важнейших проблем здравоохранения. В связи с их высокой распространенностью как среди амбулаторных, так и среди стационарных пациентов. Кроме того, ИМП несут значительное экономическое бремя как для пациентов, так и для государства. Ситуация усугубляется постоянным появлением новых уропатогенных штаммов,

устойчивых к традиционным антибиотикам. Бактерии выработали различные сложные механизмы, позволяющие им преодолевать лечебные процедуры и выживать в мочевыделительной системе [15]. Помимо высокой стоимости разработки (более одного миллиарда долларов), процесс создания новых антибактериальных препаратов занимает длительное время (более 10 лет) прежде чем они поступят на рынок [93]. Поэтому во всем мире наблюдается тенденция к использованию лекарственных растений в качестве природных противомикробных средств. По оценкам, около 80% населения мира используют лекарственные растения для лечения, а 30% фармацевтических препаратов разработаны на основе лекарственных растений [94]. Одновременно с этим в научном сообществе растет интерес к изучению, документированию и подтверждению эффективности лекарственных растений. Обзор имеющейся литературы показывает, что с начала XXI века наблюдается значительный рост исследований, посвященных лекарственным растениям в контексте их эффективности в лечении и профилактике ИМП, а также механизмам их действия и активным веществам, обуславливающим их антибактериальные свойства (рисунок 2, 3).

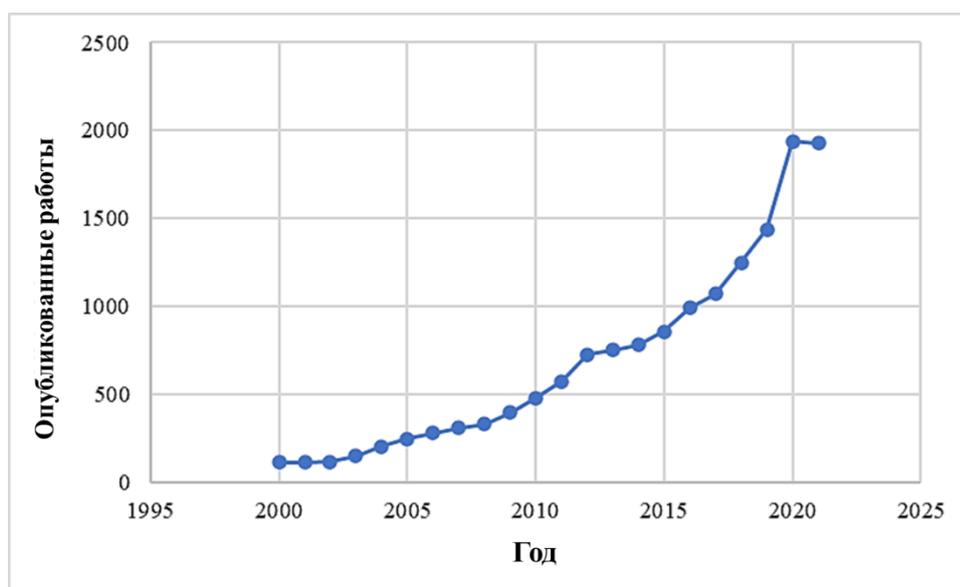


Рисунок 2. Число исследований по применению лекарственных растений по отношению к ИМП, опубликованных с 2000 по 2021 г. (база данных Scopus).

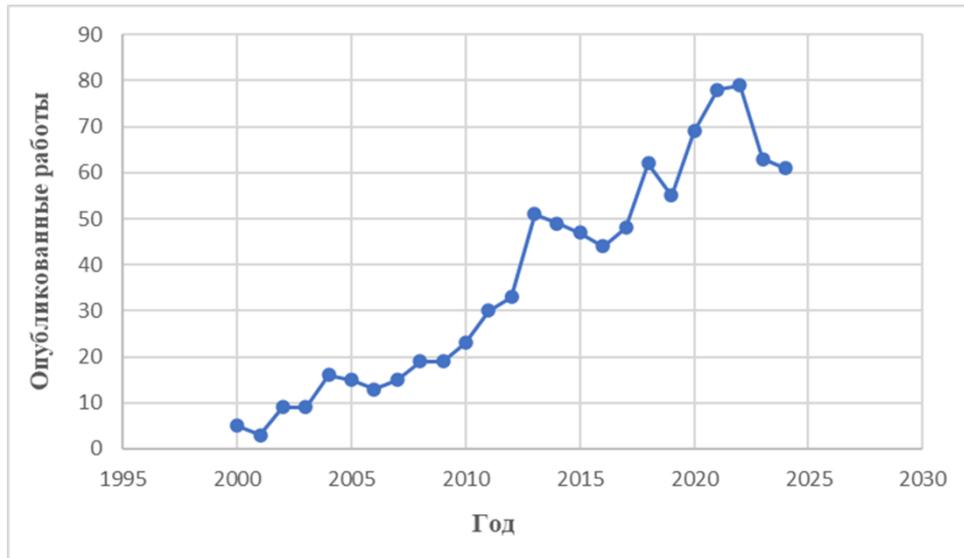


Рисунок 3. Число исследований по применению лекарственных растений по отношению к ИМП, опубликованных с 2000 по 2024 год (база данных PubMed)

Рост интереса к лекарственным растениям обусловлен их многочисленными преимуществами. Помимо низкой стоимости и незначительного количества побочных эффектов [94], бактерии с меньшей вероятностью вырабатывают устойчивость к растительным экстрактам. Это связано с тем, что экстракты растений содержат широкий спектр фитохимических веществ, воздействующих на различные молекулярные мишени в бактериальных клетках [17,18]. Широкий спектр свойств лекарственных растений обусловлен наличием в них разнообразных фитохимических веществ и вторичных метаболитов. Эти соединения классифицируются по химическому составу, основными группами являются флавоноиды, хиноны, кумарины, танины, алкалоиды, терпеноиды, лектины и полипептиды [95]. Исследования подтвердили антибактериальную активность многих лекарственных растений по отношению к широкому спектру бактериальных патогенов. Более того, в некоторых случаях также была выявлена способность растений нивелировать устойчивость бактерий к антибиотикам [96]. Механизмы терапевтического и защитного действия лекарственных растений при ИМП до сих пор полностью не изучены, однако исследования в этой области активно ведутся. На основании исследований *in vivo* и *in vitro* были предложены несколько механизмов действия растений. Эти механизмы включают

противоадгезивную активность [97–99], ингибирование роста бактерий [100–102], бактерицидную активность [102,103], ингибирование образования биопленок [104,105], ингибирование подвижности бактерий [106,107] и повышение эффективности антибиотиков [108,109]. Интересно, что некоторые исследования показали активность растений по отношению к ИМП за счет воздействия на клетки мочевыводящих путей, а не на сами бактерии [110,111]. Лечение ИМП лекарственными растениями подразумевает использование различных частей растения. Выбор части растения или использование растения целиком зависит от его конкретного вида и традиций народной медицины. Лекарственные растения применяются перорально в натуральном виде или в виде экстрактов, как самостоятельно, так и в сочетании с другими продуктами питания, напитками или даже другими растениями. Дозировка при этом определяется возрастом, полом и состоянием здоровья человека [94]. В своем обзоре Шахин и др. [94] рассмотрели 17 растений, которые часто используются для лечения ИМП, а также их основные активные фитохимические вещества и терапевтические эффекты.

#### 1.6.2.1. Сирийский сумах (*Rhus coriaria* L.)

Сирийский сумах – это растение, широко употребляемое во всем мире, особенно в странах Средиземноморья [112–114]. Его научное название – *Rhus coriaria* Linn. (семейство Anacardiaceae) [115]. Обычное название «сирийский сумах» или просто «сумах» обычно относится к плодам растения *Rhus coriaria*. Считается, что название имеет арабское происхождение и означает «темно-красный» [113]. Сумах известен своими прекрасными пищевыми и лечебными свойствами и использовался в народной медицине Персии, Турции и стран Средиземноморья [112,116], где он произрастает в изобилии в виде небольших деревьев высотой от 1 до 3 метров, плодоносящих мелкими, собранными в кисти темно-красными ягодами [112,117]. Эти плоды обычно собирают и тщательно высушивают, чтобы затем использовать их в качестве приправы или подкисляющего средства в различных блюдах [118]. Помимо применения в

кулинарии, сумах приобретает все большую ценность в фармацевтической и косметической промышленности [113]. С точки зрения традиционной медицины, сумах использовался для лечения различных заболеваний, таких как болезни печени, диарея, язва, инсульт, геморрой, кровоизлияния, укусы животных, дизентерия, нарушения мочеиспускания, кровавая рвота, кровохарканье, воспаление глаз, конъюнктивит, бели, боль в горле, раны, высокий уровень холестерина, глюкозы и мочевой кислоты в крови. Помимо этого, сумах применяли как желудочное тонизирующее средство, abortивное средство и противомикробный агент [112,114,118]. В связи с его лекарственной ценностью, сумах привлек большое внимание исследователей. Действительно, была доказана его эффективность в лечении и профилактике многих заболеваний. В ряде исследований было показано, что сумах обладает антибактериальными, противогрибковыми и антиоксидантными свойствами [114]. Кроме того, было показано, что сумах снижает уровень сахара [119] и липидов в крови [120], а также обладает обезболивающим [121], противовоспалительным, гипотензивным и противоопухолевым действием [118]. Полезные свойства сумаха распространяются на защиту печени [122] и сердечно-сосудистой системы [123].

С точки зрения фитохимии, сумах содержит в основном гидролизуемые танины, полифенолы, флавоноиды, антоцианы, изофлавоноиды, терпеноиды, монотерпены, дитерпены, органические кислоты, жирные кислоты, аминокислоты, витамины, минералы, ксилозу, глюкозу и эфирные масла [118,124,125].

В отношении противодействия бактериальным патогенам сумах зарекомендовал себя как высокоэффективное антибактериальное средство против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая МЛУ-штаммы [126–128].

#### 1.6.2.2. Гвоздика (*Syzygium aromaticum* L.)

Со времен Древности специи занимали важное место в традиционной медицине благодаря своим выдающимся лечебным свойствам. Среди специй гвоздика

выделяется как высокоэффективное лекарственное растение, обладающее рядом преимуществ [129], особенно с точки зрения высокого содержания полифенолов и антиоксидантных соединений [130]. Научное название гвоздики – *Syzygium aromaticum* Linn., принадлежащее семейству *Mirtaceae* [131]. Гвоздика произрастает как вечнозелёные деревья среднего размера, родом из восточной части Индонезии [132]. Коммерчески используемой частью дерева гвоздики являются сушеные цветочные бутоны, которые применяются преимущественно в трех формах: молотая специя, цельные бутоны и эфирное масло. Примечательно, что эфирное масло гвоздики является наиболее распространенной формой и обладает широким спектром научно подтвержденных лечебных эффектов [133]. Традиционно гвоздика используется при многих заболеваниях, включая зубную боль, зубные инфекции, ожоги, раны, тошноту, рвоту, вздутие живота, расстройства желудка, кишечника и печени, стимуляцию нервной системы, консервирование пищевых продуктов и в качестве инсектицида в сельском хозяйстве [129,131]. Исходя из исследований, уже подтверждено наличие различных фармакологических действий гвоздики, таких как антибактериальное, противогрибковое, противопаразитарное, противовирусное, обезболивающее, спазмолитическое, антиоксидантное, противовоспалительное, сахароснижающее, антидепрессивное, противоязвенное, антитромботическое, болеутоляющее и другие [131].

В микробиологии гвоздика рассматривается как существенный и перспективный противомикробный агент, поскольку многочисленные исследования подтверждают ее эффективность против различных патогенных микроорганизмов [134–139]. Кроме того, во многих странах гвоздика широко применяется для борьбы с малярией, чесоткой, туберкулезом, холерой, пищевыми патогенами, глистной инвазией, микотическими и вирусными инфекциями [140]. Многие исследования показали высокую эффективность гвоздики в качестве антибактериального средства по отношению к широкому спектру грамположительных и грамотрицательных бактерий [131].

С точки зрения фитохимии, гвоздика содержит широкий спектр активных соединений, которым приписывают ее многочисленные фармакологические свойства. Гвоздика считается одним из самых богатых растительных источников фенольных соединений, таких как флавоноиды (например, кемпферол и кверцетин), фенольные кислоты (галловая, гидроксибензойная, гидроксикоричная, эллаговая, кофейная, феруловая и салициловая кислоты) и танины. Эвгенол является самым распространенным биоактивным соединением, обнаруженным в эфирном масле гвоздики. Другие соединения, присутствующие в меньших концентрациях, включают эвгенолацетат, карвакрол, тимол, коричный альдегид,  $\alpha$ -хумулен,  $\beta$ -кариофилен,  $\beta$ -пинен, лимонен, бензальдегид, фарнезол и этилгексаноат [129,131,133].

### **1.6.3. Зелено-синтезированные наночастицы серебра (AgNPs): эффективные антибактериальные агенты**

Нанотехнологии стремительно развиваются в современную эпоху, демонстрируя огромные перспективы во многих областях, включая электронику, оптику, сельское хозяйство, медицину, клеточную биологию, фармацевтику, косметику, пищевую промышленность, здравоохранение и охрану окружающей среды [141,142]. В последнее время значительно возрос объем исследований по разработке и внедрению наночастиц в различных областях. Существуют различные методы получения наночастиц, включая физические, химические и биологические. Однако, как сообщается, химические и физические методы приводят к образованию короткоживущих молекул и токсичных промежуточных продуктов, а также отличаются высокой стоимостью [143]. В связи с этим особое внимание уделяется биологическим методам, также известным как «зеленый синтез», поскольку они обладают рядом преимуществ, таких как простота производства, низкая стоимость, безопасность и экологичность [144].

Зеленый синтез наночастиц может быть осуществлен с использованием различных биологических объектов, таких как растения, микроорганизмы (водоросли, грибы и бактерии), а также другие шаблоны (ДНК, вирусы и т.д.) [141,142]. Для синтеза наночастиц используют множество металлов, однако наибольшее внимание привлекают наночастицы серебра (AgNPs) благодаря их превосходным физическим, химическим и биологическим свойствам [19,142,145,146]. Серебро – это распространенный металл, обладающий токсическим действием по отношению к многим микроорганизмам, включая бактерии. По этой причине материалы на основе серебра используются для лечения различных микробных инфекций [145–147]. Однако по сравнению с традиционными соединениями на основе серебра, AgNPs обладают рядом преимуществ благодаря своим уникальным свойствам и усиленной антибактериальной активности. Зелено-синтезированные AgNPs могут иметь различный размер и форму. Размер обычно варьируется от 1 до 100 нм, а форма может быть треугольной, квадратной, сферической, пятиугольной, шестиугольной и т.д. [141,142]. Было показано, что метод синтеза, восстановители и стабилизаторы влияют на характеристики AgNPs, включая размер, форму и свойства поверхности. В свою очередь, это приводит к различным физическим, оптическим и каталитическим свойствам полученных наночастиц [19].

Точные механизмы, посредством которых AgNPs проявляют цитотоксическую и противомикробную активность, до сих пор не полностью изучены [20,146], хотя уже предложено множество гипотез. Как уже упоминалось ранее [19,20], AgNPs, скорее всего, воздействуют трехуровневым механизмом: на клеточные мембраны, на внутриклеточном уровне и уровне ядра. Прикрепляясь к клеточной мембране, AgNPs могут вызывать изменения в ее структуре или повышать проницаемость, что приводит к утечке клеточных компонентов и АТФ или нарушению транспорта веществ. Попадая внутрь клетки (внутриклеточное пространство), AgNPs могут вызывать оксидативный стресс, генерируя активные формы кислорода (АФК) и свободные радикалы. Это повреждает клеточные органеллы и биомолекулы. Кроме

того, AgNPs могут влиять на сигнальные пути клетки и запускать процесс апоптоза. На уровне ядра AgNPs способны взаимодействовать с генетическим материалом, вызывая мутации или ингибируя репликацию и транскрипцию ДНК. В водной среде, в присутствии кислорода и протонов, поверхность AgNPs начинает растворяться путем окисления, высвобождая ионы  $\text{Ag}^+$ . Именно эти ионы серебра обеспечивают антибактериальный эффект частиц на основе серебра [148]. Сообщается, что ионы  $\text{Ag}^+$  тесно взаимодействуют с тиоловыми (-SH) группами жизненно важных биомолекул в бактериальной клетке, выводя их из строя и, следовательно, нарушая биопроцессы, основанные на их работе, что в конечном итоге приводит к гибели клетки [149].

Синтез AgNPs с использованием растений вызывает все больший интерес, поскольку он обладает рядом ценных характеристик, таких как простота, низкая стоимость, безопасность и эффективность. Этот метод основан на применении растительных метаболитов в качестве восстановителей и стабилизаторов для ионов  $\text{Ag}^+$  [142]. В микробиологии этот подход представляет большой интерес, поскольку зелено-синтезированные AgNPs демонстрируют себя как мощное противомикробное средство, предлагающее перспективный подход к улучшению ситуации с устойчивостью к антибиотикам [150,151]. Восприимчивость к AgNPs существенно различается между грамположительными и грамотрицательными бактериями. Это объясняется структурными различиями в клеточной стенке. Тонкий слой пептидогликана у грамотрицательных бактерий делает их более восприимчивыми к AgNPs [20,152,153]. Действительно, на AgNPs возлагают большие надежды в разработке эффективных альтернатив традиционным антибиотикам и преодолении глобальной проблемы устойчивости патогенных бактерий к ним [151].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Штаммы микроорганизмов

Данное исследование было проведено на штаммах УПЭК с устойчивостью к антибиотикам. Референсный штамм *E. coli* ATCC 25922 использовался в качестве контрольного штамма качества, а ДПГ *C. albicans* ATCC 10321 использовался в реакции агглютинации. Все микроорганизмы были получены из бактериологической лаборатории кафедры микробиологии им. В. С. Киктенко МИ РУДН в Москве и хранились в криобирках при температуре -80 °С.

### 2.2. Питательные среды

Для культивирования бактерий применялись следующие среды (HiMedia; Индия): бульон с сердечно-мозговым экстрактом, питательный бульон и агар Мюллера-Хинтона. Для приготовления чашек с агаром Мюллера-Хинтона 15 мл стерильного агара Мюллера-Хинтона разливали в стерильные чашки Петри (диаметр 90 мм) таким образом, чтобы получить слой агара толщиной 4 мм. Затем чашки оставляли застывать на 30 минут при комнатной температуре, после чего их переворачивали вверх дном и помещали в герметичные пакеты для хранения при 4 °С. Для культивирования ДПГ *C. albicans* в реакции агглютинации использовалась среда бульона Сабуро с декстрозой (HiMedia; Индия).

### 2.3. Условия культивирования бактерий

В данном исследовании для культивирования бактерий, если не указано иное, проводились следующие процедуры. Для получения ночных культур бактерии из криобирок высевали в 5 мл бульона с сердечно-мозговым экстрактом и инкубировали при 37 °С в течение 16-18 часов в аэробных условиях. Затем

готовили инокулят бактерий. Для этого отбирали 1 мл ночной культуры, центрифугировали при 3000 оборотов в минуту (об/мин) в течение 10 минут (на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5415 R). Осадок промывали дважды физиологическим раствором (0.9% NaCl) и ресуспендировали в том же растворе. Плотность инокулята доводили до стандарта 0.5 МакФарланда, что соответствует примерно  $1.5 \times 10^8$  КОЕ/мл.

## 2.4. Реактивы

В качестве реактивов в данном исследовании использовались следующие вещества: стандарт 0,5 МакФарланда, стандартный раствор AgNPs (10000 ppm, Nanosfera, Россия), нитрат серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) (PanReac AppliChem), бычий сывороточный альбумин (BCA) (DIA.M, Germany), комасси бриллиантовый голубой G-250 (Helicon, Россия), кристаллический фиолетовый, D-манноза, диметилсульфоксид (ДМСО) (VWR International LLC, США), этанол 96%, реагенты для окраски по Граму, соляная кислота (HCl), хлорид натрия 0.9% (физиологический раствор), физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS) (Helicon) и фосфорная кислота.

## 2.5. Стерилизация

Для стерилизации питательных сред, реактивов, стеклянной посуды и других термостабильных материалов и жидкостей использовался автоклав. Режим стерилизации: 120 °C, избыточное давление 1 атм в течение 15 минут. Для стерилизации растительных экстрактов, растворов антибиотиков и других термолабильных жидкостей использовались шприцевые миллипоровые фильтры (0.22 мкм) (Millex® GS).

## 2.6. Антибиотики

В данном исследовании все диски с антибиотиками были приобретены у HiMedia (Индия) и хранились в морозильной камере. Использовались следующие антибиотики: ампициллин (AMP); 25 мкг/диск, цефтриаксон (CTR); 30 мкг/диск, ципрофлоксацин (CIP); 30 мкг/диск, триметоприм (TR); 30 мкг/диск, цефтазидим/клавулановая кислота (CAC); 30/10 мкг/диск, цефтазидим (CAZ); 30 мкг/диск, имипенем (IPM); 10 мкг/диск и тетрациклины (TE); 30 мкг/диск. Для теста на синергизм ципрофлоксацин и нитрофурантоин были приобретены у Sigma-Aldrich в порошкообразной форме и хранились при 4 °С до использования.

## 2.7. Микроскопия

Для исследования бактериальных клеток применялась световая микроскопия. Изображения и измерения были получены с помощью цифровой камеры Levenhuk M300 BASE и программного обеспечения TourView (3.7.6273).

## 2.8. Профиль чувствительности к антибиотикам (антибиотикограмма)

Для определения чувствительности бактериальных штаммов к антибиотикам использовался метод дисковой диффузии Бауэра-Кирби. Процедура проводилась в соответствии с рекомендациями комитета по клиническим и лабораторным стандартам (CLSI) [154]. На поверхность агара Мюллера-Хинтона наносили 100 мкл свежего инокулята бактерий 0.5 МакФарланда и оставляли для высыхания в течение 5 минут. Затем на поверхность агара асептично помещали диски с антибиотиками, после чего чашки инкубировали при 37 °С в течение 18 часов. После инкубирования измеряли и регистрировали в миллиметрах диаметры зон задержки роста. Интерпретация чувствительности бактерий к антибиотикам проводилась в соответствии с критериями CLSI [154].

### **2.8.1. MAR-индекс и выявление МЛУ**

Для каждого штамма бактерий рассчитывали индекс множественной устойчивости к антибиотикам (MAR-индекс), который определяли как отношение числа антибиотиков, к которым бактерия устойчива, к общему числу испытанных антибиотиков [155]. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) определялась как невосприимчивость бактерий как минимум к одному представителю из трех и более классов противомикробных препаратов [156]. В соответствии с этим критерием среди исследованных штаммов были дополнительно идентифицированы МЛУ-бактерии.

## **2.9. Растения и экстракция**

### **2.9.1. Растительные материалы**

Растения, за исключением клюквы и цикория, были приобретены в виде сушеных на солнце растений в герметично закрытых пластиковых пакетах на местном рынке в Тартусе, Сирия. Клюква была куплена в виде сушеных ягод, а цикорий - в виде сушеных, молотых корней на местном рынке в Москве, Россия. Вид растения, семейство, общее название и используемые части представлены в таблице 1. Растения хранились в лаборатории согласно инструкции производителя.

Таблица 1. Вид растения, семейство, общее название и используемые части (Schoch et al., 2020).

	<b>Вид</b>	<b>Семейство</b>	<b>Общее название</b>	<b>Используемые части</b>
1	<i>Aloysia citrodora</i> Paláu	Verbenaceae	Вербена лимонная	Листья
2	<i>Camellia sinensis</i> Linn.	Theaceae	Зеленый чай	Листья
3	<i>Cichorium intybus</i> Linn.	Asteraceae	Цикорий	Корень
4	<i>Corchorus olitorius</i> Linn.	Malvaceae	Нальта джут	Листья
5	<i>Curcuma longa</i> Valetton Linn.	Zingiberaceae	Куркума	Корневище
6	<i>Hyssopus officinalis</i> Linn.	Lamiaceae	Иссоп	Листья
7	<i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	Aquifoliaceae	Йерба-мате	Листья
8	<i>Laurus nobilis</i> Linn.	Lauraceae	Лавровый лист	Листья
9	<i>Mentha spicata</i> Linn.	Lamiaceae	Мята перечная	Листья
10	<i>Nigella sativa</i> Linn.	Ranunculaceae	Черный тмин	Семена
11	<i>Origanum majorana</i> Boiss. Linn.	Lamiaceae	Майоран сладкий	Листья
12	<i>Punica granatum</i> Linn.	Lythraceae	Гранат	Кожура
13	<i>Rhus coriaria</i> Linn.	Anacardiaceae	Сумах	Плоды
14	<i>Rosmarinus officinalis</i> Linn.	Lamiaceae	Розмарин	Листья
15	<i>Salvia officinalis</i> Linn.	Lamiaceae	Садовая шалфейка	Листья
16	<i>Syzygium aromaticum</i> Linn.	Mirtaceae	Гвоздика	Почки
17	<i>Thymus syriacus</i> Boiss.	Lamiaceae	Заатар	Листья
18	<i>Trigonella foenum-graecum</i> Linn.	Fabaceae	Фенугрек	Семена
19	<i>Urtica dioica</i> Linn.	Urticaceae	Крапива	Листья
20	<i>Vaccinium oxycoccos</i> Linn.	Ericaceae	Брусника	Плоды
21	<i>Zea mays</i> Linn.	Poaceae	Кукуруза	Кукурузные рыльца
22	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae	Имбирь	Корневище

### 2.9.2. Приготовление водных экстрактов растений

Водные экстракты растений были приготовлены методом экстракции при комнатной температуре (холодная мацерация) с некоторыми модификациями [158]. В качестве растворителя использовалась стерильная дистиллированная вода (dH<sub>2</sub>O) с соотношением пробы к растворителю 1/10 (вес/объем, г/мл). Растения измельчали в блендере до однородных мелких частиц и помещали в стеклянные бутылки. Затем добавляли растворитель, бутылки плотно закрывали и помещали на шейкер (250 об/мин) при комнатной температуре (22 °C) на 24 часа. После этого проводили вакуумную фильтрацию смесей с использованием фильтровальной бумаги. Фильтрацию повторяли до получения прозрачных фильтратов. Конечные фильтраты стерилизовали пропусканием через миллиметровые фильтры (0.22 мкм) и хранили в темноте при 4 °C до использования.

### 2.9.3. Приготовление водно-спиртовых экстрактов растений

Водно-спиртовые экстракты растений были приготовлены тем же способом, что и описано для водных экстрактов, заменив dH<sub>2</sub>O на 80% этанол и добавив этап сушки следующим образом: конечные фильтраты выливали в предварительно взвешенные стерильные чашки Петри и инкубировали открытыми при 40 °C для выпаривания растворителя. После полного выпаривания чашки взвешивали и рассчитывали выход экстракции как процент от исходной массы растения по следующей формуле:

$$\text{Выход экстракции \%} = \frac{\text{Конечная масса (г)}}{\text{Исходная масса (г)}} \times 100$$

Конечные экстракты хранили в темноте при 4 °C до использования.

### 2.9.4. Приготовление исходных растворов экстрактов

Исходные растворы водно-спиртовых экстрактов растений были приготовлены в различных концентрациях (мг/мл) в ДМСО (10% об./об. в dH<sub>2</sub>O). Для

стерилизации растворы пропускали через миллиметровые фильтры (0.22 мкм) и хранили в темноте при 4 °С. Перед каждым экспериментом растворы дополнительно фильтровали.

## **2.10. Антибактериальный скрининг экстрактов *in vitro***

Первоначально антибактериальная активность растений исследовалась путем тестирования их водных экстрактов по отношению к устойчивому штамму УПЭК. В тест были включены двадцать растений: лавровый лист, черный тмин, цикорий, гвоздика, брусника, фенугрек, садовая шалфейка, имбирь, иссоп, вербена лимонная, кукуруза, нальта джут, гранат, розмарин, мята перечная, сурах, майоран сладкий, куркума, йерба-мате и заатар. Ночную культуру бактерий готовили и обрабатывали стерильными водными экстрактами растений в соотношении 1/9 (культура/экстракт, об./об.), затем инкубировали при 37 °С в течение ночи. В качестве контроля вместо экстрактов использовали стерильную dH<sub>2</sub>O. Полученные смеси затем последовательно разводили в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом, 100 мкл последних разведений (10<sup>-7</sup>) высевали на чашки с агаром Мюллера-Хинтона и инкубировали в течение 24 часов при 37 °С. После инкубирования оценивали рост бактерий по сравнению с контролем. Растения, продемонстрировавшие эффективность в ингибировании роста бактерий, были отобраны для дальнейшего приготовления водно-спиртовых экстрактов и оценки их антибактериальной активности с помощью следующих методов.

### **2.10.1. Диффузионный метод в агаровых лунках**

Для оценки антибактериальной активности водно-спиртовых экстрактов растений использовался диффузионный метод в агаровых лунках, как описано Балуири и др. [159]. После засева на чашки с агаром Мюллера-Хинтона 100 мкл свежего инокулята бактерий 0.5 МакФарланда, в агаре асептично делали лунки с

помощью пробника диаметром 6 мм. Затем лунки заполняли 45 мкл экстрактов растений в различных концентрациях. В качестве контроля использовали 10% ДМСО. Затем чашки инкубировали в течение 24 часов при 37 °С, после чего измеряли и регистрировали в мм диаметры зон задержки роста.

### **2.10.2. Количественный антибактериальный анализ с помощью МИК и МБК**

Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) экстрактов растений использовался метод микроразведения в бульоне, как описано ранее [160]. Анализ проводили в стерильных 96-луночных микропланшетах с U-образным дном. В бульоне с сердечно-мозговым экстрактом готовили последовательные двукратные разведения исходных растворов водно-спиртовых экстрактов растений. Затем в соответствующие лунки добавляли по 50 мкл каждого разведения и 50 мкл свежего инокулята бактерий. Конечная плотность бактерий во всех лунках составляла примерно  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл, а конечные концентрации экстракта варьировались от 100 до 0.0031 мг/мл. В качестве контроля вместо экстрактов использовали 10% ДМСО. Для контроля стерильности использовались лунки, содержащие все используемые растворы, кроме бактерий. Затем микропланшеты инкубировали в течение 16-20 часов при 37 °С. После инкубирования наименьшую концентрацию экстракта, которая ингибировала видимый рост бактерий, определяли как МИК. Результаты подтверждали путем считывания оптической плотности (OD) в спектрофотометре SF-2000 на длине волны 492 нм. Для определения минимальных бактерицидных концентраций (МБК) по одной петле из каждой прозрачной лунки (где нет роста бактерий) наносили на чашки с агаром Мюллера-Хинтона и инкубировали в течение 18 часов при 37 °С [161]. Наименьшую концентрацию экстракта, при которой не наблюдалось роста бактерий на чашках с агаром, считали МБК.

### 2.10.2.1. Соотношение МБК/МИК

Для определения того, обладают ли экстракты бактерицидным или бактериостатическим действием, рассчитывали отношение МБК/МИК. Значения  $\leq 4$  указывают на бактерицидный эффект, а значения  $> 4$  – на бактериостатический эффект [162].

### 2.10.3. Агглютинация дрожжей

Для оценки влияния экстрактов растений на способность бактерий к агглютинации с клетками дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae* и *C. albicans*) исследовали экстракты в субингибирующих концентрациях, используя ранее описанный метод исследования на предметном стекле [163] с некоторыми модификациями. Стандартизованные культуры бактерий ( $OD_{492} = 0.05$ ), выращенные за ночь, добавляли в бульон с сердечно-мозговым экстрактом, содержащий экстракты растений в конечной концентрации, равной МИК/2. Инкубировали смесь аэробно при 37 °С в течение 24 часа. Контрольные культуры готовили таким же образом, заменяя экстракт растений 10% ДМСО. Клетки ДПГ *C. albicans* культивировали аэробно в бульоне Сабуро с декстрозой при 37 °С в течение 2 суток. После инкубирования 1 мл каждой культуры центрифугировали, клетки дважды промывали и ресуспендировали в фосфатном буфере (PBS). Затем готовили свежую суспензию сухих дрожжевых клеток *S. cerevisiae* в PBS (1% вес/объем). Тест на агглютинацию проводили на стерильных предметных стеклах при комнатной температуре путем смешивания 20 мкл бактериальной суспензии с таким же объемом суспензии дрожжевых клеток. Образование видимых агрегатов наблюдали в течение 10 минут и оценивали следующим образом: – (нет агглютинации), + (слабая), ++ (умеренная) или +++ (сильная) агглютинация. Для оценки влияния маннозы на агглютинацию проводили такую же процедуру с добавлением 20 мкл D-маннозы (1% вес/объем в PBS). Устойчивость к маннозе

(MP) означает одинаковую степень агглютинации с маннозой и без нее, в то время как чувствительность к маннозе (MC) указывает на то, что агглютинация была полностью подавлена или значительно снижена в присутствии маннозы. Дополнительно агглютинацию подтверждали световой микроскопией при 100х. В каждом случае проводили трехкратное повторение, а весь эксперимент повторяли отдельно три раза.

#### **2.10.4. Гемагглютинация**

Тест на гемагглютинацию проводили методом исследования на предметном стекле [164] с некоторыми модификациями. Для теста использовали свежие эритроциты человека (группа крови В+) здорового мужчины, полученные из поликлиники университета. После двукратного промывания готовили 5% суспензию в PBS. Инкубирование бактерий с экстрактами растений и ДМСО проводили совершенно так же, как описано для агглютинации дрожжей. На стерильных стеклянных предметных стеклах смешивали равные объемы суспензий бактерий и эритроцитов, в присутствии и отсутствии D-маннозы. Наблюдение за гемагглютинацией проводили в течение 10 минут и оценивали также, как для агглютинации дрожжей. Дополнительно образование агрегатов наблюдали с помощью световой микроскопии при 100х. В каждом случае проводили трехкратное повторение, а весь эксперимент повторяли отдельно три раза.

#### **2.10.5. Адгезия к поверхности из полистирола**

Исследовали способность 8 штаммов УПЭК адгезироваться к поверхности из полистирола в присутствии и отсутствии экстракта сумаха. Сначала бактерии инкубировали с экстрактом сумаха (при МИК/2) или ДМСО (контроль), как описано для теста агглютинации дрожжей. После инкубирования 2 мл каждой культуры выливали в полистирольные чашки Петри (диаметр 4 см) и оставляли на

4 часа при комнатной температуре. Затем чашки промывали стерильной  $dH_2O$  для удаления планктонных бактерий, а адгезированные бактерии окрашивали 1 мл 1% раствора кристаллического фиолетового в течение 10 минут. После окрашивания чашки промывали стерильной  $dH_2O$ , чтобы удалить избыток красителя, а затем высушивали на воздухе. Адгезию бактерий к поверхности чашек Петри наблюдали с помощью светового микроскопа при 1000х. Для оценки разницы в адгезии между обработанными и необработанными бактериями, подсчитывали количество адгезированных клеток в 10 случайных полях зрения. Рассчитывали среднее значение, а ингибирование адгезии выражали в процентах по отношению к контрольным группам.

#### **2.10.6. Морфология**

Для исследования возможных морфологических изменений общей формы и размеров УПЭК после воздействия экстрактов растений (сумах, гвоздика и заатар) использовали световой микроскоп. Тесту были подвергнуты три штамма УПЭК. Стандартизованные культуры бактерий ( $OD_{492}=0.05$ ), выращенные за ночь, инкубировали с экстрактами при МИК/2 в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом в течение 24 часов при 37 °С. Затем культуры центрифугировали, дважды промывали и ресуспендировали в PBS. Контрольные культуры включали бактерии, инкубированные с 10% ДМСО. После этого бактерии окрашивали 1% кристаллическим фиолетовым раствором и наблюдали под световым микроскопом при увеличении 1000х. В каждой пробе анализировали 100 клеток случайным образом. Изображения и размеры получали с помощью цифровой камеры Levenhuk M300 BASE и программного обеспечения Levenhuk ToupView (3.7.6273). Некоторые изображения были сделаны простой мобильной камерой.

### **2.10.7. Влияние длительного воздействия экстракта сумаха на чувствительность бактерий к антибиотикам и экстракту**

Для оценки того, может ли длительное воздействие сумаха повлиять на чувствительность бактерий к антибиотикам или к самому экстракту, был проведен следующий тест. Экстракт сумаха готовили в МИК в 10% ДМСО, затем разбавляли до МИК/2 бульоном с сердечно-мозговым экстрактом и хранили при 4 °С в течение эксперимента. В стерильную 96-луночную микропланшету с U-образным дном добавляли 200 мкл приготовленной среды, содержащей сумах, в лунки ряда А. Затем лунки в ряду А засеивали 10 мкл свежего инокулята бактерий, и микропланшету инкубировали при 37 °С. На следующий день лунки в ряду А гомогенизировали, и по 10 мкл из каждой лунки перенесли в соответствующие лунки ряда В, предварительно заполненные 200 мкл среды, содержащей сумах. Затем микропланшет инкубировали снова. Эту процедуру повторяли ежедневно до четвертого дня. На этом этапе 10 мкл культуры из последнего ряда лунок добавили в бульон с сердечно-мозговым экстрактом без сумаха и инкубировали ночь при 37 °С. Впоследствии готовили инокуляты и повторно определяли антибиограммы и МИК, как описано выше. В качестве контроля аналогичную процедуру проводили одновременно с 10% ДМСО вместо экстракта. Контроль стерильности включал все используемые растворы, кроме бактерий.

### **2.10.8. Тест на синергизм**

Для оценки синергизма между экстрактами растений и антибиотиками по отношению к МЛУ-УПЭК использовали метод «шахматной доски» (checkerboard assay) [165]. Тестируемыми антибиотиками были нитрофурантоин (NIT) и ципрофлоксацин (CIP), а исследовали следующие комбинации: гвоздика + (NIT, CIP), сумах + NIT и гвоздика + сумах. Во-первых, МИК каждого антибиотика отдельно определяли так же, как описано ранее для экстрактов растений. Затем, как

показано на рисунке 4, готовили 77 различных комбинаций тестируемых агентов в 96-луночных микропланшетах и засеивали их соответствующим бактериальным инокулятом. Окончательный объем в лунках составлял 200 мкл. Контрольные планшеты (фоновые планшеты) содержали те же растворы, за исключением бактерий. Затем планшеты инкубировали при 37 °С в течение 20 часов. На следующий день лунки перемешали, и оптическую плотность считывали на спектрофотометре SF-2000 при длине волны 492 нм. Брали среднее значение из трех замеров, а процент роста бактерий рассчитывали следующим образом:

$$\frac{OD_{\text{лунки комбинирования антибактериальных средств}} - OD_{\text{лунки контроля}}}{OD_{\text{лунки без антибактериальных средств}} - OD_{\text{лунки контроля}}} \times 100$$

Наименьшая концентрация, которая ингибировала рост бактерий более чем на 80%, считалась МИК. Полученные данные далее анализировались с помощью аддитивной модели Лоэве (Loewe additivity-based model) [166]. Эта модель является непараметрическим подходом, обычно используемым для определения теоретических аддитивных эффектов на основе фракционного индекса ингибирующей концентрации (FICI). Сначала  $\Sigma FIC$  для каждой МИК рассчитывали следующим образом:  $\Sigma FIC = FIC$  (антибактериальный агент А) +  $FIC$  (антибактериальный агент В);  $FIC$  (антибактериальный агент А) = МИК антибактериального агента А в комбинации / МИК антибактериального агента А отдельно, и так для  $FIC$  (антибактериальный агент В). В каждой планшете наименьшее  $\Sigma FIC$  ( $\Sigma FIC_{\min}$ ) при том, что наибольшее  $\Sigma FIC$  ( $\Sigma FIC_{\max}$ ) меньше 4, считалось FICI. Поскольку все полученные  $\Sigma FIC$  были ниже 4,  $\Sigma FIC_{\min}$  всегда выражало FICI. Результаты затем интерпретировались в соответствии со следующими критериями: синергизм ( $FICI \leq 0.5$ ), отсутствие взаимодействия ( $0.5 < FICI \leq 4$ ) или антагонизм ( $FICI > 4$ ).

Для подтверждения положительного синергизма, предсказанного аддитивной моделью Лоэве, баллы синергизма рассчитывались с использованием трех широко используемых референсных моделей: наивысший одиночный агент (Highest single

agent, HSA), модели независимости Блесса (Bliss independence model) и модели нулевой эффективности взаимодействия (Zero interaction potency, ZIP), реализованных в веб-приложении SynergyFinder+ [167]. Эти баллы представляют собой дополнительный эффект (помимо ожидаемой суммы отдельных препаратов), вызванный взаимодействием при комбинировании лекарств. Программное обеспечение рассчитывало среднее значение баллов синергизма для каждой комбинации препаратов, дополнительно рассчитывались р-значения для оценки статистической значимости наблюдаемого синергизма. Распределение баллов синергизма визуализировалось с помощью гистограммы. Интерпретация результатов проводилась в соответствии с критериями, установленными приложением, следующим образом: балл синергизма менее -10: антагонистическое взаимодействие; от -10 до 10: аддитивное взаимодействие; более 10: синергическое взаимодействие.



Рисунок 4. Окончательная настройка микропланшетов методом «шахматной доски» [165].

### 2.10.9. Тест на утечку белка

Целостность бактериальной клеточной мембраны после инкубирования с экстрактом сумаха исследовали с помощью теста на утечку белка, как описано ранее [168]. УПЭК из ночной культуры инкубировали в бульоне с сердечно-

мозговым экстрактом, содержащем сумах, при конечной концентрации экстракта МБК в течение 24 часов при 37 °С. После этого образцы центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 минут при 22 °С. В качестве контроля использовали бактерии, инкубированные с 10% ДМСО вместо экстракта. Для определения выхода белков в супернатант использовали тест Брэдфорда [169]. Реагент Брэдфорда готовили следующим образом: 100 мг комассы бриллиантового голубого G-250 растворяли в 50 мл 95% этанола, затем добавляли 100 мл 85% фосфорной кислоты и доводили объем до 1 литра. Перед использованием реагент фильтровали через фильтровальную бумагу. После центрифугирования образцов 100 мкл супернатанта добавляли к 5 мл реагента Брэдфорда и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре в темноте. Наконец, измеряли оптическую плотность при 595 нм на спектрофотометре SF-2000 и рассчитывали среднее значение трех замеров. Аналогичную процедуру проводили одновременно со смесями без бактерий, чтобы использовать их в качестве проб-бланков для спектрофотометрических измерений, исключая постороннее поглощение, которое может исходить от среды или экстракта. В качестве контроля использовали БСА.

#### **2.10.10. Тест на утечку ДНК и РНК**

Целостность бактериальной клеточной мембраны после инкубирования с экстрактом сумаха далее исследовали по утечке ДНК и РНК, как описано ранее [168]. УПЭК из ночной культуры инкубировали в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом, содержащем сумах, при конечной концентрации экстракта МБК в течение 24 часов при 37 °С. В качестве контроля использовали бактерии, инкубированные с 10% ДМСО вместо экстракта. После инкубации образцы фильтровали через миллиметровые фильтры (0.22 мкм) для удаления бактерий. Затем измеряли оптическую плотность супернатанта при 260 нм на спектрофотометре SF-2000 и рассчитывали среднее значение трех замеров. Аналогичную процедуру проводили со смесями без бактерий, чтобы использовать

их в качестве проб-бланков для спектрофотометрических измерений, исключая постороннее поглощение, которое может исходить от среды или экстракта.

## **2.11. Исследования *in vivo* с использованием *Galleria mellonella*<sup>1</sup>**

### **2.11.1. Изменения патогенности бактерий после воздействия экстракта сумаха**

Для исследования влияния воздействия экстракта сумаха на патогенность УПЭК использовали модель *Galleria mellonella* (GM) в соответствии с ранее описанным протоколом [170].

#### **2.11.1.1. Длительное инкубирование бактерий с экстрактом сумаха**

Сначала готовили различные концентрации экстракта сумаха в питательном бульоне, охватывающие диапазон от МИК до МИК/2. Инкубирование бактерий с экстрактом проводили в стерильной 96-луночной микропланшете. В первый день 200 мкл среды с концентрацией МИК/2 добавляли в ряд А, затем засеивали 10 мкл свежего инокулята УПЭК, после чего планшет инкубировали в течение 24 часов при 37 °С. На следующий день в ряд В добавляли 200 мкл среды с более высокой концентрацией экстракта, затем переносили 10 мкл из ряда А в ряд В и снова инкубировали планшет. Эту процедуру повторяли до восьмого дня, когда все ряды были инокулированы. Далее петлей из каждой прозрачной лунки делали посев на агар Мюллера-Хинтона, чтобы определить, в каких лунках есть жизнеспособные бактерии. Поскольку ряд Е содержал самую высокую концентрацию экстракта, при которой наблюдался рост на агаре, бактерии из этого ряда собирали в криопробирки и хранили при -80 °С. В качестве контроля аналогичную процедуру

---

<sup>1</sup> Один и тот же штамм УПЭК подвергали всем экспериментам *in vivo*, чтобы сравнить результаты.

проводили одновременно с 10% ДМСО вместо экстракта. Для каждой обработки включали 3 повтора.

### **2.11.1.2. Кратковременное инкубирование бактерий с экстрактом сумаха**

УПЭК инкубировали с экстрактом сумаха при конечной концентрации МИК/2 в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом в течение 24 часов при 37 °С. Контрольная группа состояла из бактерий, инкубированных с 10% ДМСО вместо экстракта. После инкубирования готовили инокуляты, как описано ранее.

### **2.11.1.3. Условия бактериальной инфекции**

Далее оценивали патогенность обработанных бактерий. Личинки *Galleria mellonella* (находящиеся на конечной стадии личинки) были получены коммерческим путем у ЕСО ВАITS (Москва, Россия) и хранились при 4 °С до использования. При случайном выборе личинок для эксперимента применялись следующие параметры: масса тела 0.2-0.5 г, хорошая подвижность и отсутствие признаков меланизации. В стерильных чашках Петри каждой исследуемой группе выделяли по три группы из 20 личинок. Для эксперимента с длительным воздействием экстракта сумаха обработанные бактерии из криопробирок культивировали ночь в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом, после чего готовили инокуляты. Бактерии с кратковременным воздействием экстракта готовили как описано выше. Затем личинкам вводили по 10 мкл бактериального инокулята инъекционным шприцем для инсулина 0.3 мл (Terumo® Myjector® U-100 VWR, Россия) в левую заднюю ножку (рисунок 5). В качестве контроля личинкам вводили по 10 мкл физиологического раствора, чтобы проверить, может ли сам процесс инъекции вызывать гибель личинок. Личинок инкубировали при 37 °С в темноте, а смертность отслеживали в течение 7 дней. Признаками смерти считались отсутствие реакции на прикосновение и меланизация тела (рисунок 5). Для

сравнения выживаемости личинок был проведен анализ выживаемости по методу Каплана-Мейера (Kaplan-Meier survival analysis).

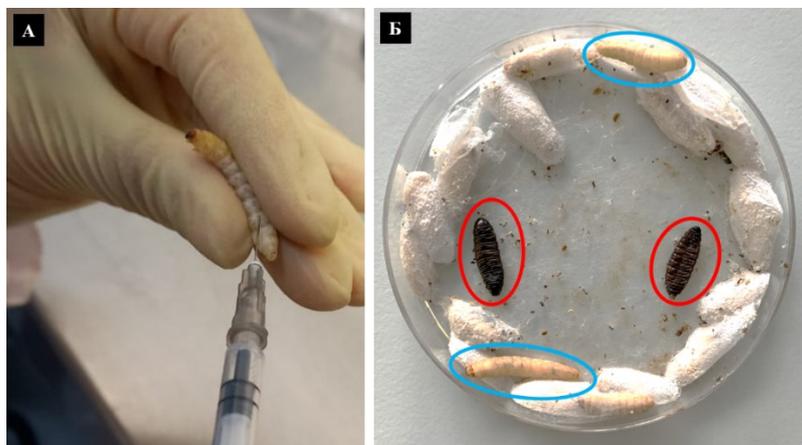


Рисунок 5. Исследование *in vivo* с использованием личинок *Galleria mellonella*. А: метод инъекции. Б: мертвые (красные круги) и здоровые личинки (синие круги).

### 2.11.2. Оценка токсичности сумаха

Токсичность экстракта сумаха оценивали по его способности вызывать смерть личинок GM. Тестируемые концентрации экстракта составляли 12.5, 25, 50, 100, 200 и 400 мг/мл. Для каждой концентрации использовали три группы по 20 личинок. Личинкам вводили инъекцию 10 мкл экстракта, как описано выше, а смертность оценивали через 24 часа и 7 дней. Контрольным группам вводили инъекцию 10% ДМСО. Для обработки полученных данных и расчета LD1, LD50, LD90 и LD99 значений использовали пробит-анализ (Probit analysis). Для перевода концентраций дозы экстракта и значений LD из мг/мл в г/кг использовали средний вес каждой группы личинок по следующей формуле:

$$\text{Доза экстракта (г/кг массы тела)} = \frac{\text{Введенный объем (мл)} \times \text{Доза экстракта (мг/мл)} \times 10^{-3}}{\text{Масса тела (кг)}}$$

### **2.11.3. Исследование выживаемости личинок GM после обработки экстрактом сумаха**

Влияние сумаха на выживаемость личинок после заражения УПЭУ оценивали согласно методу, описанному Тармалингам и др. [171]. В каждой исследуемой группе было по три группы из 20 личинок. Сначала личинок инфицировали 10 мкл инокулята УПЭК в заднюю левую ногу и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов, после чего вводили инъекцию 10 мкл экстракта сумаха в различных нетоксичных концентрациях (12.5, 50 и 200 мг/мл) в заднюю правую ногу. Затем личинок инкубировали при 37 °С в темноте, а выживаемость отслеживали в течение 7 дней. Контрольные группы обрабатывали 10% ДМСО вместо экстракта. Выживаемости личинок сравнивали методом Каплана-Мейера.

## **2.12. Биосинтез, характеристика и антибактериальный скрининг AgNPs**

### **2.12.1. Приготовление водных экстрактов растений**

Для синтеза наночастиц использовали пять растений (гвоздика, заатар, лимонная вербена, крапива и зеленый чай). Водный экстракт каждого растения был приготовлен, как описано ранее.

### **2.12.2. Зеленый синтез AgNPs**

Для синтеза AgNPs свежеприготовленный экстракт растения смешивали со свежеприготовленным  $\text{AgNO}_3$  (1 мМ) в соотношении 1/9 соответственно. Смесь накрывали и инкубировали при 35 °С с перемешиванием (250 об/мин) в течение 3 часов. После инкубирования смесь сначала центрифугировали (в центрифуге Eppendorf Centrifuge 5415 R) при 2500 об/мин в течение 10 минут, чтобы удалить крупные частицы, если таковые имеются, затем супернатант центрифугировали

при 12000 об/мин в течение 15 минут для сбора наночастиц. Осадки промывали стерильной dH<sub>2</sub>O, ресуспендировали и заливали в стерильные чашки Петри перед сушкой при 37 °C в темноте. После полного визуального высыхания чашки взвешивали до постоянного веса, затем готовили рабочий раствор AgNPs в стерильной dH<sub>2</sub>O, стерилизовали пропусканием через миллиметровые фильтры (0.22 мкм) и хранили при 4 °C в темноте для последующих исследований.

### **2.12.3. Характеристика синтезированных AgNPs**

Подтверждение биосинтеза AgNPs проводилось путем измерения спектрофотометрической абсорбции в УФ-видимом диапазоне на различных временных интервалах синтеза. Раствор AgNPs разбавляли (1:2 с dH<sub>2</sub>O), а затем сканировали на спектрофотометре SF-2000 в диапазоне длин волн от 350 до 800 нм с разрешением 0.1 нм. Данные регистрировались с помощью программы сканирования для спектрофотометра (версия 4.06). В качестве бланка использовали водный экстракт, разбавленный dH<sub>2</sub>O в тех же соотношениях. Размер частиц измеряли с помощью инструмента Nanophox с кюветами UVette (стандартный набор, Sympatec GmbH). Каждый образец измеряли три раза при температуре 25 °C. Полученные данные затем объединяли для создания единого распределения с помощью программного обеспечения PCCS Windox 5 (Sympatec GmbH).

### **2.12.4. Антибактериальный скрининг AgNPs**

Для оценки антибактериальной активности синтезированных AgNPs использовали референсный штамм *E. coli* ATCC 25922 и штаммы УПЭК. Первичную оценку антибактериальной активности AgNPs проводили диффузионным методом в агаровых лунках, как описано ранее. Рабочие растворы синтезированных AgNPs тестировали без разбавления. В качестве положительного контроля использовали раствор коммерческих стандартных AgNPs (10000 ppm), а

в качестве отрицательного контроля – dH<sub>2</sub>O. Далее для тестирования антибактериальной активности синтезированных AgNPs применяли метод микроразведения в бульоне, как описано ранее. В качестве контроля использовали dH<sub>2</sub>O вместо наночастиц.

Перед каждым экспериментом растворы AgNPs стерилизовали пропусканием через миллиметровые фильтры (0.22 мкм). Эксперименты проводили отдельно в трех повторениях.

### 2.13. Статистический анализ

Все эксперименты проводились отдельно троекратно. В каждом эксперименте для каждого исследуемого случая включали три повтора. Для анализа данных, расчета средних значений, стандартных отклонений (SD) и построения гистограмм использовали программу Excel 2019. Для сравнения полученных данных применяли t-критерий Стьюдента с уровнем значимости  $p < 0.05$ , указывающим на статистически значимую разницу. Для оценки синергизма использовали аддитивную модель Лоэве и дополнительно подтверждали его путем расчета баллов синергизма с использованием HSA, Bliss и ZIP моделей с помощью веб-приложения SynergyFinder+. Для анализа результатов исследования токсичности использовали пробит-анализ, выполненный с помощью программы XLSTAT 2023. Для сравнения выживаемости личинок применяли анализ кривых выживаемости по методу Каплана-Майера, выполненный с помощью статистического программного обеспечения MedCalc<sup>®</sup> версии 22.021. Программа построила кривые выживаемости и использовала логранговый тест (logrank test) для сравнения кривых и определения наличия статистически значимой разницы в выживаемости.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Водно-спиртовая экстракция

Для получения водно-спиртовых экстрактов из гвоздики, сумаха и заатара использовали метод экстракции при комнатной температуре (холодная мацерация). Конечные экстракты были получены в виде сухого твердого вещества, за исключением сумаха, который имел вид полутвердой массы. Выход экстракции составил: сумах – 42%, гвоздика – 30%, заатар – 10.69%. В целом, выход экстракции зависит от используемого метода экстракции, типа растворителя, продолжительности экстракции и сушки, а также ряда других факторов. Для извлечения антибактериальных фитохимических веществ в данном исследовании использовался метод холодной мацерации с 80% этанолом в качестве растворителя. Выбор этого метода обусловлен несколькими причинами. Во-первых, холодная мацерация относится к числу наиболее часто применяемых методов для выделения подобных веществ. Во-вторых, она обеспечивает хороший выход целевого продукта. В-третьих, холодная мацерация позволяет избежать потерь термочувствительных фитохимических веществ. Водно-спиртовая экстракция растений в целом является распространенным способом получения биоактивных соединений. Водно-спиртовые экстракты готовят с использованием смеси воды и спирта в качестве растворителей. Такой подход способствует извлечению как полярных, так и неполярных соединений. Кроме того, данный тип экстрактов, как правило, обладает более высокой концентрацией биоактивных веществ по сравнению с другими видами экстрактов, такими как водные или чисто спиртовые. Более того, водно-спиртовые экстракты, как было показано, обладают сильной антибактериальной активностью по отношению к широкому спектру бактериальных штаммов [158]. Таким образом, выбор данного типа экстракта является эффективным и действенным методом для оценки антибактериальной активности растительных экстрактов.

### 3.2. Профиль чувствительности к антибиотикам (антибиотикограмма)

Рост устойчивости УПЭК к антибиотикам во всем мире становится серьезной проблемой, которая осложняет лечение и профилактику ИМП [172]. В данном исследовании определяли чувствительность штаммов УПЭК к 8 антибиотикам в соответствии с рекомендациями CLSI [154]. Результаты представлены в таблицах 2 и 3. Среди общего числа из 8 штаммов наибольшая устойчивость наблюдалась к ампициллину (5 штаммов), тогда как наибольшая чувствительность – к имипенему (7 штаммов) и ципрофлоксацину (6 штаммов). О высокой устойчивости УПЭК к ампициллину сообщается во многих исследованиях [173–175]. Эта устойчивость, главным образом, обусловлена продукцией  $\beta$ -лактамаз, поэтому альтернативным вариантом для преодоления устойчивости стало использование комбинации ампициллина с ингибиторами  $\beta$ -лактамаз [176]. Имипенем по-прежнему остается одним из лучших вариантов лечения ИМП, особенно вызванных штаммами, продуцирующими  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра действия (ESBL) [3,9]. Тетрациклины, цефтазидим/клавулановая кислота, цефтазидим и триметоприм проявляли эффективность против 5 штаммов. Однако ни один из испытанных антибиотиков не действовал на все штаммы. Референсный штамм был чувствителен ко всем тестируемым антибиотикам, а диаметры зон задержки роста находились в пределах стандартных значений.

Таблица 2. Антибиотикограмма штаммов *E. coli*. А: необработанные. Б: после 4 дней инкубирования с экстрактом сумаха.

Штамм	ТЕ*		САС		СIP		САЗ	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
УПЭК 1	22 ± 0.0 <sup>(S)**</sup>	22 ± 0.7 <sup>(S)</sup>	22 ± 0.9 <sup>(S)</sup>	23 ± 0.5 <sup>(S)</sup>	30 ± 0.3 <sup>(S)</sup>	29 ± 1.3 <sup>(S)</sup>	24 ± 0.0 <sup>(S)</sup>	24 ± 0.2 <sup>(S)</sup>
УПЭК 2	25 ± 0.7 <sup>(S)</sup>	26 ± 0.9 <sup>(S)</sup>	22 ± 0.5 <sup>(S)</sup>	22 ± 1.2 <sup>(S)</sup>	32 ± 0.2 <sup>(S)</sup>	31 ± 1.4 <sup>(S)</sup>	24 ± 0.2 <sup>(S)</sup>	23 ± 1.0 <sup>(S)</sup>
УПЭК 3	24 ± 0.3 <sup>(S)</sup>	25 ± 1.0 <sup>(S)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	15 ± 0.7 <sup>(R)</sup>	15 ± 0.6 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>
УПЭК 4	10 ± 1.5 <sup>(R)</sup>	11 ± 0.8 <sup>(R)</sup>	21 ± 1.3 <sup>(S)</sup>	22 ± 1.1 <sup>(S)</sup>	26 ± 0.3 <sup>(S)</sup>	27 ± 1.1 <sup>(S)</sup>	25 ± 0.3 <sup>(S)</sup>	25 ± 0.4 <sup>(S)</sup>
УПЭК 5	10 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	10 ± 0.4 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	32 ± 0.8 <sup>(S)</sup>	33 ± 0.4 <sup>(S)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>
УПЭК 6	21 ± 0.6 <sup>(S)</sup>	21 ± 0.0 <sup>(S)</sup>	18 ± 0.3 <sup>(S)</sup>	18 ± 1.3 <sup>(S)</sup>	31 ± 0.5 <sup>(S)</sup>	31 ± 0.0 <sup>(S)</sup>	19 ± 0.7 <sup>(S)</sup>	19 ± 0.1 <sup>(S)</sup>
УПЭК 7	23 ± 1.9 <sup>(S)</sup>	22 ± 0.6 <sup>(S)</sup>	22 ± 0.1 <sup>(S)</sup>	23 ± 1.0 <sup>(S)</sup>	27 ± 1.5 <sup>(S)</sup>	25 ± 0.9 <sup>(S)</sup>	24 ± 0.1 <sup>(S)</sup>	24 ± 0.6 <sup>(S)</sup>
УПЭК 8	11 ± 0.9 <sup>(R)</sup>	11 ± 1.0 <sup>(R)</sup>	12 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	12 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	11 ± 0.4 <sup>(R)</sup>	10 ± 0.8 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>
АТСС 25922	24 ± 0.5 <sup>(S)</sup>	25 ± 0.7 <sup>(S)</sup>	30 ± 0.2 <sup>(S)</sup>	30 ± 0.6 <sup>(S)</sup>	41 ± 0.2 <sup>(S)</sup>	40 ± 1.2 <sup>(S)</sup>	29 ± 0.5 <sup>(S)</sup>	28 ± 0.7 <sup>(S)</sup>

\* Тетрациклины (ТЕ), цефтазидим/клаванулановая кислота (САС), ципрофлоксацин (СIP), цефтазидим (САЗ), имипенем (IPM), цефтриаксон (СТР), триметоприм (TR) и ампициллин (AMP).

\*\* Диаметр зоны задержки роста в мм, представлено как среднее значение 3 повторных испытаний ± SD (чувствительность: R=устойчивый, I=промежуточный, S=чувствительный).

Таблица 3. Продолжение.

Штамм	IPM		СТР		TR		AMP	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
УПЭК 1	25 ± 1.5 <sup>(S)</sup>	26 ± 0.7 <sup>(S)</sup>	26 ± 0.9 <sup>(S)</sup>	27 ± 1.2 <sup>(S)</sup>	26 ± 0.7 <sup>(S)</sup>	27 ± 1.3 <sup>(S)</sup>	22 ± 0.0 <sup>(S)</sup>	22 ± 1.2 <sup>(S)</sup>
УПЭК 2	28 ± 0.5 <sup>(S)</sup>	28 ± 0.5 <sup>(S)</sup>	26 ± 1.8 <sup>(S)</sup>	28 ± 0.9 <sup>(S)</sup>	30 ± 0.4 <sup>(S)</sup>	29 ± 0.9 <sup>(S)</sup>	22 ± 1.9 <sup>(S)</sup>	21 ± 0.3 <sup>(S)</sup>
УПЭК 3	24 ± 0.9 <sup>(S)</sup>	24 ± 0.9 <sup>(S)</sup>	7 ± 0.9 <sup>(R)</sup>	7 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	33 ± 0.2 <sup>(S)</sup>	33 ± 0.0 <sup>(S)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>
УПЭК 4	28 ± 0.0 <sup>(S)</sup>	28 ± 0.8 <sup>(S)</sup>	30 ± 1.0 <sup>(S)</sup>	32 ± 1.4 <sup>(S)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>			
УПЭК 5	32 ± 0.9 <sup>(S)</sup>	31 ± 0.5 <sup>(S)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>					
УПЭК 6	28 ± 1.1 <sup>(S)</sup>	28 ± 0.2 <sup>(S)</sup>	25 ± 0.7 <sup>(S)</sup>	25 ± 0.0 <sup>(S)</sup>	28 ± 0.3 <sup>(S)</sup>	28 ± 0.4 <sup>(S)</sup>	19 ± 0.4 <sup>(S)</sup>	20 ± 0.9 <sup>(S)</sup>
УПЭК 7	26 ± 0.8 <sup>(S)</sup>	26 ± 0.0 <sup>(S)</sup>	27 ± 0.9 <sup>(S)</sup>	27 ± 0.7 <sup>(S)</sup>	31 ± 1.2 <sup>(S)</sup>	31 ± 0.3 <sup>(S)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>
УПЭК 8	13 ± 0.4 <sup>(R)</sup>	14 ± 0.9 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>	0 ± 0.0 <sup>(R)</sup>
АТСС 25922	32 ± 0.4 <sup>(S)</sup>	32 ± 0.1 <sup>(S)</sup>	32 ± 0.2 <sup>(S)</sup>	32 ± 1.1 <sup>(S)</sup>	36 ± 0.3 <sup>(S)</sup>	36 ± 0.9 <sup>(S)</sup>	38 ± 0.5 <sup>(S)</sup>	37 ± 1.1 <sup>(S)</sup>

### 3.2.1. MAR-индекс и выявление МЛУ

MAR-индекс является простым и экономически эффективным показателем уровня множественной устойчивости к антибиотикам. Он также дает представление об источнике выделения бактерий с точки зрения частоты использования антибиотиков [155]. Значения MAR-индекс выше 0.2 указывают на наличие у бактерий множественной устойчивости к антибиотикам. Такие бактерии, вероятнее всего, происходят из источников, где часто применяются антибиотики [177,178]. В данном исследовании определили MAR-индекс у 8 штаммов УПЭК (таблица 4). Четыре штамма были идентифицированы с множественной устойчивостью к антибиотикам; один из них проявлял устойчивость ко всем тестируемым антибиотикам (MAR-индекс = 1), а 3 MAR-индекса выше 0.2 (0.75; 0.625; 0.375). Однако 3 штамма вместе с референсным штаммом оказались чувствительными ко всем тестируемым антибиотикам (MAR-индекс = 0). Случаи множественной устойчивости к антибиотикам у *E. coli* [155,178,179] и УПЭК [180,181] уже были зарегистрированы ранее. В целом, высокая распространенность бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам требует дальнейших клинических исследований и строгого контроля за применением антибиотиков. Нерациональное использование антибиотиков приводит к тому, что бактерии накапливают гены устойчивости и усиливают активность насосов эффлюкса нескольких лекарств, в конечном итоге становясь устойчивыми к нескольким лекарственным средствам (МЛУ) [182]. Все штаммы, которые были идентифицированы с множественной устойчивостью к антибиотикам в данном исследовании, как было показано, также являются МЛУ, что составляет 50% от общего числа исследованных штаммов. Это соответствует результатам недавних исследований, где МЛУ-УПЭК были выявлены с высокой частотой [183–185].

Таблица 4. MAR-индекс и выявление МЛЮ.

Штамм	Количество антибиотиков		MAR-индекс	МЛЮ
	Устойчивые	Протестированные		
УПЭК 1	0	8	0	-
УПЭК 2	0	8	0	-
УПЭК 3	5	8	0.625	+
УПЭК 4	3	8	0.375	+
УПЭК 5	6	8	0.75	+
УПЭК 6	0	8	0	-
УПЭК 7	1	8	0.125	-
УПЭК 8	8	8	1	+
ATCC 25922	0	8	0	-

### 3.3. Антибактериальный скрининг экстрактов растений *in vitro*

Для получения общей картины антибактериальных свойств растений был проведен первичный скрининг, направленный на оценку способности водных экстрактов растений препятствовать росту УПЭК. Этот тип экстрактов был выбран потому, что он похож на то, как эти растения обычно используются в народной медицине. Результаты показали, что из 20 исследованных растений заметное ингибирование роста бактерий наблюдалось только у гвоздики, сумаха и заатара. Стоит отметить, что гвоздика и сумах продемонстрировали полное ингибирование роста бактерий по сравнению с контролем, в то время как заатар ингибировал его на  $52 \pm 4.2$  %. В связи с этим данные три растения были выбраны для дальнейшего изучения в данном исследовании с использованием их водно-спиртовых экстрактов. Важно отметить, что результаты данного эксперимента не позволяют окончательно исключить наличие антибактериальной активности у остальных исследованных растений. Эффективность таких растений зависит от различных факторов, включая, помимо прочего, метод экстракции, тип растворителя,

исходного количества растительного материала, температуру и продолжительность экстракции, а также исследуемого бактериального штамма и метод антибактериального теста. Более того, возможно, что более концентрированные водные экстракты этих растений могут проявлять антибактериальные свойства. Однако, основной целью данного теста являлся предварительный скрининг и выбор растений для дальнейшего изучения.

### 3.3.1. Диффузионный метод в агаровых лунках

В качестве первичного скрининга антибактериальная активность экстракта сумаха была исследована диффузионным методом в агаровых лунках (таблица 5, рисунок 6). Все исследованные штаммы продемонстрировали значительную чувствительность к экстракту в зависимости от концентрации, с диаметром зоны ингибирования 7-15 мм. Зависимость между противомикробным эффектом и концентрацией растительного экстракта описана в литературе и, главным образом, объясняется тем, что более высокие концентрации содержат большее количество активных соединений [186]. Существенной разницы в чувствительности между штаммами УПЭК не наблюдалось, в то время как штамм *E. coli* ATCC 25922 проявлял значительно более высокую чувствительность (диаметр зоны ингибирования 17-23 мм). Эти результаты согласуются с другими исследованиями, в которых была показана значительная антибактериальная активность водно-спиртовых [187] и водных [188,189] экстрактов сумаха по отношению к ряду грамотрицательных и грамположительных бактерий. Аналогичным образом, было установлено, что эфирное масло сумаха ингибирует рост *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* и *B. subtilis* [190]. Более того, исследования *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали, что водный экстракт сумаха сильно подавляет рост МЛУ штамма *S. aureus* [126]. Примечательно, что спиртовой экстракт сумаха проявляет синергический эффект с противомикробными препаратами (окситетрациклин HCl, пенициллин G, цефалексин, сульфадиметоксин натрия и энрофлоксацин) по

отношению к МЛУ *P. aeruginosa* [191]. Аналогичным образом, сообщалось, что сумах обладает антибактериальной активностью по отношению к грамотрицательным и положительным штаммам, включая *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* (MRSA) и *S. enteric* [127,128]. Таким образом, полученные результаты подтверждают заявленную антибактериальную активность сумаха. Подобная активность, по всей вероятности, обусловлена высоким содержанием в сумахе фитохимических веществ, особенно фенольных соединений [118,124,125] которые, как известно, взаимодействуют с бактериальными биопроцессами [192,193].

Таблица 5. Диффузионный метод в агаровых лунках: диаметры зон задержки роста штаммов *E. coli* действием экстракта сумаха.

Штамм	Экстракт сумаха (мг/мл)		
	50	100	200
УПЭК 1	8 ± 0.7*	12 ± 0.1	14 ± 0.5
УПЭК 2	9 ± 0.9	12 ± 0.0	14 ± 0.3
УПЭК 3	9 ± 1.1	12 ± 0.4	15 ± 0.0
УПЭК 4	8 ± 0.5	13 ± 0.8	14 ± 0.0
УПЭК 5	8 ± 0.3	11 ± 0.1	15 ± 0.2
УПЭК 6	8 ± 0.0	10 ± 0.0	14 ± 0.3
УПЭК 7	7 ± 1.5	10 ± 0.2	13 ± 0.0
УПЭК 8	8 ± 0.2	12 ± 0.1	14 ± 0.0
АТСС 25922	17 ± 0.0	19 ± 0.4	23 ± 0.2

\* Диаметр зоны задержки роста в мм, представлено как среднее значение 3 повторных испытаний ± SD.

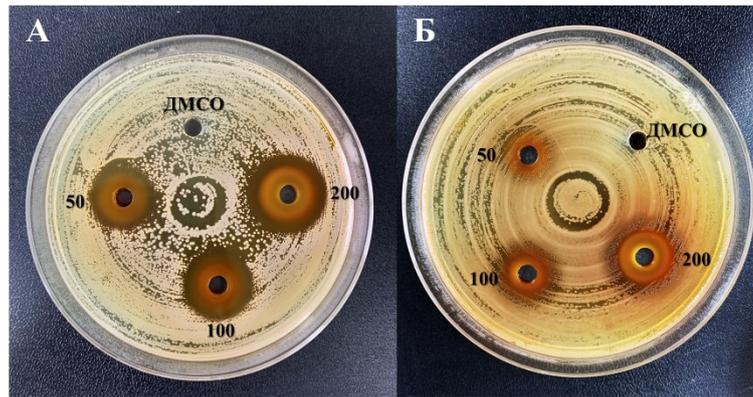


Рисунок 6. Диффузионный метод в агаровых лунках: зоны задержки роста бактерий действием экстракта сумаха при концентрации 50, 100 и 200 мг/мл.

А: *E. coli* ATCC 25922. Б: УПЭК. ДМСО: контроль.

Для исследования антибактериальной активности экстракта гвоздики по отношению к штаммам *E. coli* также использовался диффузионный метод в агаровых лунках. Экстракт гвоздики проявлял антибактериальную активность по отношению к всем исследованным штаммам в зависимости от концентрации (таблица 6, рисунок 7). Штаммы УПЭК были чувствительны только к концентрациям 100 и 200 мг/мл с диаметрами зон задержки роста 7-10 мм, в то время как две более низкие концентрации (25 и 50 мг/мл) не привели к появлению зоны задержки роста. Напротив, референсный штамм *E. coli* ATCC 25922 проявлял чувствительность ко всем концентрациям с диаметрами зон задержки роста 10-15 мм, что вполне ожидаемо. В целом, эти результаты согласуются с данными о том, что экстракт и эфирное масло гвоздики эффективны по отношению к многим патогенам. Например, сообщалось о диаметре зоны задержки роста 16–20 мм для эфирного масла гвоздики (10 мкл/диск) по отношению к грамотрицательным и грамположительным бактериям, включая *E. coli*, *Salmonella* spp, *P. aeruginosa*, *Streptococcus* группы D и *S. aureus* [194]. В другом исследовании спиртовой экстракт гвоздики проявлял значительную антибактериальную активность по отношению к энтерококкам с высоким уровнем устойчивости к гентамицину, с диаметром зоны задержки роста 25-26 мм [195]. Аналогично, водный и спиртовой экстракты гвоздики вызывали зоны задержки роста размером 12.2-25.2 мм по

отношению к многим патогенам, таким как *E. coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus* и ДПГ *C. albicans* [186]. Таким образом, в данном исследовании подтверждается эффективность гвоздики в качестве антибактериального средства по отношению к МЛУ-УПЭК.

В данном исследовании не анализировали фитохимический состав экстракта гвоздики для идентификации потенциально активных соединений, однако предлагаем теоретическую концепцию, основанную на схожей работе. В своем фитохимическом анализе Розариор и др. [196] выявили, что основными компонентами спиртового экстракта гвоздики являются фенольные соединения, главным образом эвгенол, кемпферол, галловая кислота и катехин. Известно, что фенольные соединения обладают широким спектром антибактериальной активности по отношению к различным патогенным бактериям [197–199]. Более того, предполагается, что фенольные соединения, особенно кемпферол, обладают синергическим эффектом с эвгенолом, что приводит к усилению антибактериальной активности экстрактов, содержащих данную комбинацию [196]. Следовательно, наблюдаемая здесь антибактериальная активность экстракта гвоздики может быть обусловлена, главным образом, высоким содержанием фенольных соединений в этом растении.

Таблица 6. Диффузионный метод в агаровых лунках: диаметры зон задержки роста штаммов *E. coli* действием экстракта гвоздики.

Штамм	Экстракт гвоздики (мг/мл)			
	25	50	100	200
<b>УПЭК 3</b>	0 ± 0.0*	0 ± 0.0	6 ± 0.0	8.5 ± 0.3
<b>УПЭК 4</b>	0 ± 0.0	0 ± 0.0	6 ± 0.2	9 ± 0.12
<b>УПЭК 8</b>	0 ± 0.0	0 ± 0.0	7 ± 0.76	10 ± 0.0
<b>ATCC 25922</b>	10 ± 0.41	11 ± 0.15	12 ± 0.43	15 ± 0.25

\* Диаметр зоны задержки роста в мм, представлено как среднее значение 3 повторных испытаний ± SD.

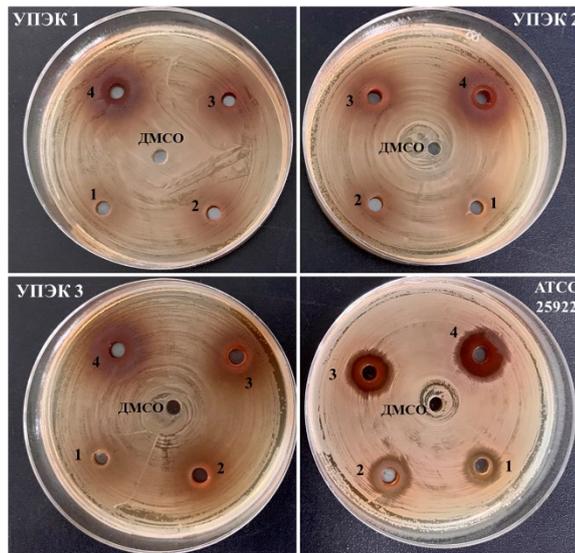


Рисунок 7. Диффузионный метод в агаровых лунках: зоны задержки роста штаммов *E. coli* действием экстракта гвоздики. Концентрации экстракта: 25 (1), 50 (2), 100 (3) и 200 (4) мг/мл. ДМСО: контроль.

Экстракт заатара вызвал зону задержки роста только по отношению к штамму ATCC 25922 (12 мм) и не показал зоны задержки роста ни у одного из исследованных штаммов УПЭК. Однако, этот результат не исключает эффективности заатара по отношению к УПЭК по нескольким причинам. Во-первых, тестировали только одну концентрацию (100 мг/мл), поэтому возможно, что более высокие концентрации могут проявлять антибактериальную активность по отношению к УПЭК. Во-вторых, диффузионный метод в агаровых лунках является качественным методом, который позволяет только определить наличие или отсутствие зоны задержки роста вокруг лунки. Он не дает информации о фактической концентрации экстракта, необходимой для подавления роста бактерий. В заключение, при использовании диффузионного метода в агаровых лунках диффузия экстракта из лунки в агаровую среду может быть ограничена такими факторами, как растворимость и вязкость экстракта. Это может привести к тому, что на бактерии будут действовать более низкие концентрации экстракта, что приведет к отсутствию зоны задержки роста даже при более высоких концентрациях. Таким образом, подтвердить наличие антибактериальной активности по отношению к УПЭК может быть более эффективно с помощью

метода микроразведения в бульоне, поскольку это количественный метод, который измеряет МИК противомикробного средства, необходимую для подавления роста бактерий.

### 3.3.2. МИК и МБК

Количественное определение антибактериальной активности экстракта сумаха было проведено путем определения МИК и МБК с использованием метода микроразведения в бульоне (таблица 7). Экстракт продемонстрировал значение МИК 3.125 мг/мл по отношению к всем исследованным штаммам УПЭК, тогда как для референсного штамма для ингибирования видимого роста бактерий потребовалась гораздо более низкая концентрация (0.0244 мг/мл). Было показано, что значения МИК для 7 штаммов также являются значениями МБК, тогда как для одного штамма и АТСС 25922 МБК составили 6.25 и 1.563 мг/мл соответственно. В литературе сообщается о подобных низких значениях МИК сумаха по отношению к штаммам *E. coli*: 2 мг/мл для водно-спиртового экстракта [187], 3 мг/мл для водно-дистиллированного эфирного масла [125] и 6-6.3 мг/мл для водного экстракта [188].

Бактерии – организмы, которые успешно вырабатывают различные механизмы выживания в неблагоприятных условиях и адаптируются к антибактериальным препаратам. Ярким подтверждением этого служит быстрое распространение устойчивости к антибиотикам. Однако, исследования показывают, что бактерии демонстрируют меньшую способность вырабатывать устойчивость к фитохимическим веществам. Для проверки этого свойства было исследовано, адаптируются ли бактерии к экстракту сумаха при длительном воздействии (4 дня). Результаты показали, что чувствительность к экстракту не изменилась, поскольку МИК были такими же, как и для необработанных бактерий (таблица 7). Это свидетельствует об отсутствии адаптации бактерий к экстракту и низкой вероятности развития устойчивости к нему. В то время как наши результаты

показали отсутствие адаптации бактерий к экстракту сумаха, одно исследование продемонстрировало повышение МИК водного экстракта сумаха после 3 и 7 дней воздействия [188]. Более того, сообщалось о потере антибактериальной активности других растений при длительной инкубации с бактериями [200]. Это поднимает важный вопрос об адаптационной способности бактерий по отношению к фитохимическим веществам.

Таблица 7. МИК и МБК экстракта сумаха. А: необработанные бактерии. Б: бактерии после длительного воздействия сумаха.  $SD \pm 0.0$  для 3 повторных испытаний.

Штамм	МИК (мг/мл)		МБК (мг/мл)
	А	Б	А
УПЭК 1	3.125	3.125	6.25
УПЭК 2	3.125	3.125	3.125
УПЭК 3	3.125	3.125	3.125
УПЭК 4	3.125	3.125	3.125
УПЭК 5	3.125	3.125	3.125
УПЭК 6	3.125	3.125	3.125
УПЭК 7	3.125	3.125	3.125
УПЭК 8	3.125	3.125	3.125
АТСС 25922	0.0244	0.0244	1.563

Антибактериальная активность экстракта гвоздики была оценена количественно путем определения МИК и МБК (таблица 8). МИК экстракта гвоздики по отношению к УПЭК составила 25 мг/мл. При этой же концентрации на агаровых чашках не наблюдалось роста бактерий, что указывает на то, что МБК также равна 25 мг/мл. Экстракт продемонстрировал более низкую МИК по отношению к *E. coli* АТСС 25922 (6.25 мг/мл), однако МБК для данного штамма

составила 25 мг/мл. В литературе сообщается о схожей МИК (25 мг/мл) спиртового экстракта гвоздики по отношению к *E. coli*, в то время как для водного экстракта МИК составила 50 мг/мл [186]. Однако хорошо известно, что на содержание антибактериальных соединений в растительных экстрактах влияет множество факторов. К ним относятся методы экстракции и тип растворителя, которые, в свою очередь, обуславливают различия между вариантами экстрактов одного и того же растения [158,201].

Таблица 8. МИК и МБК экстракта гвоздики по отношению к *E. coli*. SD  $\pm$  0.0 для 3 повторных испытаний.

Штамм	МИК (мг/мл)	МБК (мг/мл)
<b>УПЭК 3</b>	25	25
<b>УПЭК 4</b>	25	25
<b>УПЭК 8</b>	25	25
<b>АТСС 25922</b>	6.25	25

Экстракт заатара продемонстрировал МИК 50 мг/мл по отношению к УПЭК, в то время как по отношению к референсному штамму МИК составила 12.5 мг/мл. МБК экстракта заатара составила 50 мг/мл для всех исследованных штаммов.

Сравнивая МИК экстрактов, обладающих антибактериальной активностью по отношению к УПЭК, можно сделать вывод, что сумах является наиболее эффективным растением как по отношению к УПЭК, так и к референсному штамму, за ним следуют гвоздика и заатар. Кроме того, референсный штамм всегда демонстрировал более высокую чувствительность ко всем экстрактам по сравнению с УПЭК. Этого можно было ожидать, поскольку все штаммы УПЭК являются патогенными бактериями и обладают более высокой вирулентностью по сравнению с референсным непатогенным штаммом. Следовательно, они будут демонстрировать более низкую чувствительность из-за своей вирулентности, которая позволяет им противодействовать экстрактам.

Кроме того, при сравнении результатов диффузионного метода в агаровых лунках и метода микроразведения в бульоне была обнаружена корреляция между МИК экстрактов растений и диаметром зон задержки роста. Эта корреляция указывает на то, что по мере снижения МИК увеличивается диаметр зоны задержки роста, что позволяет предположить, что метод микроразведения в бульоне является более точным и надежным способом оценки антибактериальной активности по сравнению с диффузионным методом в агаровых лунках. Кроме того, при использовании метода микроразведения в бульоне бактерии подвергаются воздействию экстракта в жидкой среде, что обеспечивает лучшую проницаемость и воздействие экстракта. Таким образом, применение метода микроразведения в бульоне позволяет исследователям более точно определить эффективность тестируемого экстракта.

### **3.3.2.1. Соотношение МБК/МИК**

Соотношение МБК/МИК является общепринятым показателем антибактериальной активности, поскольку оно позволяет определить, обладает ли агент бактерицидным или бактериостатическим действием [162]. В данном исследовании было показано, что экстракты гвоздики и заатара обладают бактерицидным действием по отношению к всем исследованным штаммам, при этом соотношение для УПЭК составляет 1, а для референсного штамма – 4. В то же время, экстракт сумаха проявил бактерицидное действие по отношению к УПЭК с соотношением 1 и 2, однако, по-видимому, обладает бактериостатическим действием по отношению к референсному штамму (соотношение = 64.1).

### **3.3.3. Агглютинация дрожжей и гемагглютинация**

Адгезия к клеткам-хозяевам является критическим этапом колонизации бактериями тканей и формирования биопленок [202]. Этот процесс опосредуется в основном лектинами – особыми белками, связывающими углеводы. Агглютинация

– это простой и недорогой метод исследования адгезивных свойств бактерий. Агглютинаты образуются, когда бактериальные лектины связываются с определенными углеводными группами на поверхности других клеток, таких как эритроциты или клетки дрожжей [203]. В данном исследовании изучалась адгезия 4х штаммов УПЭК к клеткам дрожжей (*S. cerevisiae* и *C. albicans*) после воздействия экстрактами сумаха, гвоздики и заатара в субингибирующей концентрации (таблица 9, рисунок 8). Все исследованные штаммы УПЭК в разной степени агглютинировались с обоими типами дрожжей. Было отмечено, что более устойчивые штаммы демонстрировали более сильную агглютинацию, что, вероятно, связано с тем, что более высокая устойчивость коррелирует с более высокой вирулентностью, включая адгезивные свойства, позволяющие бактериям колонизировать ткани хозяина. Экстракт гвоздики во всех исследованных случаях ингибировал агглютинацию с обоими типами дрожжей. Тем временем экстракт сумаха ингибировал агглютинацию с *S. cerevisiae* только у двух штаммов, тогда как на агглютинацию с *C. albicans* он не оказал влияния. Такой же эффект наблюдался и с экстрактом заатара – он также ингибировал только агглютинацию с *S. cerevisiae*. Примечательно, что растительные экстракты не оказали влияния на характер агглютинации с маннозой любого штамма, поскольку он сохранялся во всех случаях.

T1Ф широко распространенные МС-фимбрии у *E. coli*. Они, как известно, опосредуют связывание УПЭК с маннозилированными белками (уроплакинами) на эпителии мочевого пузыря [163,204]. T1Ф кодируются опероном *Fim*, который представляет собой конститутивный генный кластер, расположенный на хромосоме. Экспрессия этого оперона является фазовой переменной. Это позволяет бактериальной клетке переключаться между фазой включения (*Fim-ON*, клетки с фимбриями) и фазой выключения (*Fim-OFF*, клетки без фимбрий) в ответ на сигналы окружающей среды внутри мочевыводящих путей [9]. Маннозочувствительная агглютинация с *S. cerevisiae* обычно связывается с наличием T1Ф [205]. Таким образом, можно сделать вывод, что экстракты

гвоздики, сумаха и заатара способны ингибировать активность Т1Ф у УПЭК, что указывает на подавление посреднических генов. Экстракт гвоздики, по-видимому, обладает наиболее выраженным ингибирующим действием на агглютинацию УПЭК, поскольку он подавляет агглютинацию с обоими типами дрожжей. Поскольку Т1Ф является важным фактором вирулентности для УПЭК, можно предположить, что данные экстракты могут ослаблять вирулентность УПЭК *in vivo*, препятствуя их адгезии к уротелиальным клеткам.

Далее исследовалась адгезия УПЭК к эритроцитам человека (группы крови В+) после воздействия экстракта сумаха в субингибирующей концентрации (таблица 9, рисунок 8). Результаты показали, что только два наиболее устойчивых штамма продемонстрировали гемагглютинацию по МС и МР типам. Однако экстракт сумаха смог ингибировать эту гемагглютинацию. Тест на гемагглютинацию обычно проводят с эритроцитами человека или животных для исследования гемагглютинирующих свойств бактериальных клеток [164], которые ассоциируются со способностью к адгезии к эпителиальным клеткам [206,207]. Сообщается, что *E. coli* демонстрируют различные типы агглютинации с эритроцитами человека в зависимости от многих факторов, таких как питательные среды и используемая группа крови [208,209]. Показано, что МР-гемагглютинация с эритроцитами человека опосредуется фимбриями не первого типа, главным образом Р-пилями. Р-пили являются одним из наиболее распространенных типов МР-фимбрий у УПЭК и опосредуют связывание с эпитопом дигалактозида ( $\text{Gal}\alpha\text{-1,4-Gal}\beta$ ) гликолипидов на эпителиальных клетках почек и эритроцитах крови группы Р. Р-пили развиваются при колонизации почек УПЭК и тесно связаны с пиелонефритом [210,211]. Однако для оценки гемагглютинирующей активности бактерий важна оптимизация условий роста [212] и выбор подходящей группы крови [208]. В данном исследовании основной целью было изучение влияния экстракта сумаха на гемагглютинацию бактерий. Следовательно, заключаем, что экстракт был способен снижать уровень гемагглютинации у всех агглютинирующих штаммов УПЭК, что свидетельствует о снижении регуляции

опосредующих фимбрий. Таким образом, можно предположить, что сумах может оказывать ингибирующее действие на адгезивную способность УПЭК *in vivo*.

Таблица 9. Агглютинация УПЭК с *S. cerevisiae*, *C. albicans* и эритроцитами человека (В+) после обработки экстрактами сумаха, гвоздики и заатара.

Обработка ДМСО была включена в качестве контроля.

Штамм		Сумах	Гвоздика	Заатар	ДМСО
УПЭК 4	<i>S. cerevisiae</i>	-*	-	-	++ МС
	<i>C. albicans</i>	+ МС	-	+ МС	+ МС
	Эритроциты	-	-	-	-
УПЭК 3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	nd	++ МС
	<i>C. albicans</i>	+ МС	-	nd	+ МС
	Эритроциты	-	-	-	-
УПЭК 8	<i>S. cerevisiae</i>	+++ МС	-	nd	+++ МС
	<i>C. albicans</i>	++ МС	-	nd	++ МС
	Эритроциты	+ МР	nd	nd	+++ МР
УПЭК 5	<i>S. cerevisiae</i>	nd	nd	-	+++ МС
	<i>C. albicans</i>	nd	nd	++ МС	++ МС
	Эритроциты	-	nd	nd	++ МС

\* - (отсутствие агглютинации), + (слабая агглютинация), ++ (умеренная агглютинация), +++ (сильная агглютинация), МР (устойчивость к маннозе), МС (чувствительность к маннозе), nd (не определяется).

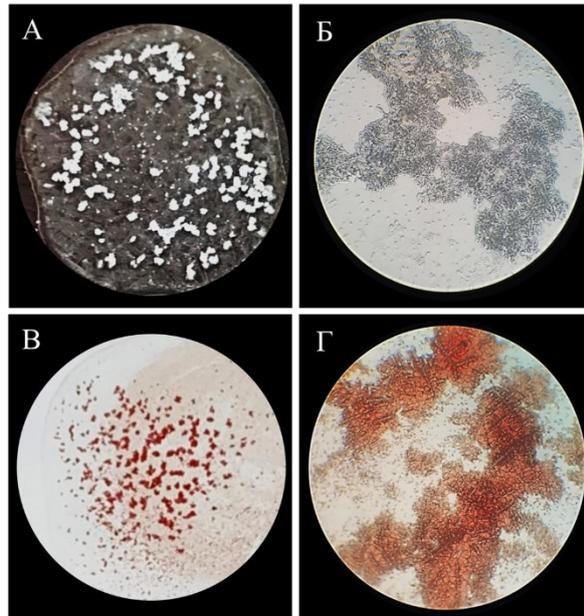


Рисунок 8. Сильная агглютинация УПЭК с клетками *S. cerevisiae* (А, Б) и эритроцитами человека (В, Г). Агрегаты на предметных стеклах (А, В) и под световым микроскопом (100х) (Б, Г).

#### 3.3.4. Адгезия к поверхности из полистирола

Бактериальная адгезия не ограничивается только живыми тканями, но также широко распространена на абиотических поверхностях, с последующим образованием биопленок [213]. Биопленки представляют собой тревожную глобальную проблему, поскольку они более устойчивы к антибактериальным средствам и их труднее удалить. Эта проблема тесно связана с медицинскими имплантатами, такими как искусственная вентиляция легких, катетеры, контактные линзы и сердечные клапаны, что затрудняет лечение и вызывает хроническое воспаление [214]. В данном исследовании изучалось влияние экстракта сумаха на адгезивную способность УПЭК к полистиролу. Результаты показали, что при субингибирующей концентрации экстракт сумаха статистически значимо ( $p < 0.05$ ) ингибировал адгезию 7 из 8 исследованных штаммов на следующие показатели: 95.1%, 94.3%, 92.1%, 91.8%, 85.4%, 82.7% и  $79.1 \pm 3-4.6\%$ . Поверхности из полистирола обычно используются в качестве платформы *in vitro* для исследования

адгезии бактерий и образования биопленок [215]. Существует подтвержденная корреляция между адгезией бактерий к полистиролу и эпителиальным клеткам [216]. Более того, способность бактерий адгезироваться к полистиролу считается серьезной проблемой для хирургических материалов и медицинских имплантатов на основе пластика [217]. Широко сообщалось, что фитохимические вещества оказывают антиадгезивное и антибиопленочное действие по отношению к УПЭК [105,218–220]. В частности, было показано, что сумач ингибирует образование биопленок *Streptococcus mutans* и подавляет кислотообразование в сформировавшемся биопленке [221]. Эта антибиопленочная активность была главным образом связана с наличием метилгаллата в метанольном экстракте сумача. Аналогичным образом, сумач, по-видимому, защищает от кариеса и зубного налета, поскольку его водный экстракт ингибирует рост пяти распространенных видов бактерий полости рта (*Streptococcus* spp. и *E. faecalis*) и их способность образовывать биопленки [189]. В данном исследовании мы показали, что сумач может быть эффективным антиадгезивным средством по отношению к УПЭК, поскольку он эффективно снижает их способность адгезироваться к полистиролу. Это ингибирование, скорее всего, связано с изменением гидрофобности поверхности бактериальной клетки, которая является ключевым фактором адгезии бактерий к биотическим и абиотическим поверхностям [222]. Полученные данные являются перспективными в борьбе с образованием биопленок на медицинских устройствах. Сумач можно использовать для обработки поверхности катетеров или в составе блокировочного раствора, что, в свою очередь, будет способствовать профилактике ИМП.

### **3.3.5. Влияние экстрактов растений на морфологию УПЭК**

Исследовалась способность экстрактов растений вызывать морфологические изменения в УПЭК. Результаты показали, что экстракты вызывают у всех штаммов морфологические изменения в сферическую L-форму в различных процентах:

гвоздика 96-99%, заатар 64-82%, сумах 10-30% (рисунок 11). Однако клетки первого поколения, выращенные без экстрактов, восстанавливали исходную форму палочек с клеточной стенкой, что означает нестабильность L-формы. В контрольных образцах с ДМСО не наблюдалось отклонений от нормы, все они содержали палочки обычных размеров: длиной 1-4 мкм и диаметром 0.3-0.7 мкм. Интересно, что экстракт сумаха вызвал значительное удлинение у одного штамма, при этом длина 56% обработанных клеток превышала 4 мкм и достигала 8.4 мкм (короткие филаменты) (рисунок 9, 10). SD для всех вышеупомянутых значений составляло 0.2-1.3.

Было показано, что вторичные метаболиты растений по-разному влияют на морфологию бактериальных клеток, вероятно, в зависимости от исследуемых бактерий и химической природы этих соединений. Например, в некоторых исследованиях бактерии становились заметно короче после воздействия фитохимических веществ [223,224], тогда как в других случаях фитохимические вещества вызывали образование филаментов [225]. Филаментация бактерий – это аномальный рост, при котором клетки образуют длинные нитевидные структуры, состоящие из неделящихся удлинённых клеток. Предполагается, что это явление возникает по нескольким причинам, таким как повреждение ДНК, нарушения процесса деления клеток, приводящие к потере способности разделяться после завершения деления, неблагоприятные условия среды или воздействие антибиотиков [225–227]. В данном исследовании обнаружили, что экстракт сумаха вызывает значительное удлинение бактериальных клеток одного штамма УПЭК, приводящее к образованию коротких филаментов. Это наблюдение может указывать на стрессовое состояние бактерий, вызванное экстрактом сумаха, или на проникновение активных фитохимических веществ в бактериальные клетки, повреждающее ДНК или нарушающее процесс репликации.

Клеточная стенка является важной защитной структурой бактериальной клетки, которая придает ей форму и обеспечивает целостность. Основным компонентом клеточной стенки является пептидогликан (ПГ), синтезируемый с помощью

хорошо законсервированного биохимического пути, который начинается в цитоплазме с синтеза предшественника липида-II, который затем транспортируется наружу через цитоплазматическую мембрану, где специализированные белки осуществляют окончательную сборку клеточной стенки [228]. Клеточная стенка является одной из наиболее важных мишеней для антибиотиков, таких как  $\beta$ -лактамы антибиотики. Несмотря на огромную важность клеточной стенки, некоторые бактерии могут трансформироваться в L-формы – клетки без стенки, имеющие сферическую или плеоморфную форму [229]. Эта трансформация обычно вызывается антимикробными препаратами, действующими на клеточную стенку, или эффекторами врожденного иммунитета, такими как лизоцим, и поэтому считается механизмом устойчивости [230]. L-формы бактерий могут быть стабильными или нестабильными, то есть оставаться L-формой или возвращаться к исходной форме после прекращения воздействия индуцирующего агента. Переход в L-форму позволяет бактериям выработать устойчивость к ряду факторов, таких как  $\beta$ -лактамы антибиотики, литические бактериофаги и, вероятно, врожденный иммунный ответ [229,230]. Точные молекулярные механизмы, лежащие в основе образования L-форм и их роли в инфекциях человека, остаются неясными и являются предметом дискуссий [229,231]. Однако, используя полногеномный анализ транскриптома нестабильных L-форм *E. coli*, Гловер и др. [232] выявили регуляцию вверх многих генов с неизвестной функцией. Помимо этого, были обнаружены признаки сверхэкспрессии путей реагирования на стресс, которые также встречаются в персистирующих клетках и биоплёнках. Кроме того, высказано предположение, что для выживания L-форм *E. coli* необходима жесткая наружная мембрана [233].

В данном исследовании мы показали, что экстракты гвоздики, сумаха и заатара в субингибирующих концентрациях способны вызывать переход УПЭК в нестабильную L-форму. Эта трансформация, вероятно, связана с воздействием определенных веществ экстрактов на клеточную стенку бактерий. Таким образом, переход в L-форму служит защитным механизмом бактерий от фитохимических

веществ. Эти наблюдения подчеркивают важность применения экстрактов в МИК или выше. Это необходимо, чтобы избежать формирования устойчивых форм бактерий, которые в дальнейшем сложно поддаются лечению, особенно антибиотиками, действующими на клеточную стенку, такими как  $\beta$ -лактамы антибиотиками. Кроме того, в данном случае может быть полезно применение ингибиторов наружной мембраны совместно с экстрактами. Это позволит предотвратить деление и выживание L-форм бактерий. Таким образом, данные растительные экстракты представляют собой простой и доступный способ получения L-форм бактерий в лабораторных условиях для дальнейшей характеристики и исследований.

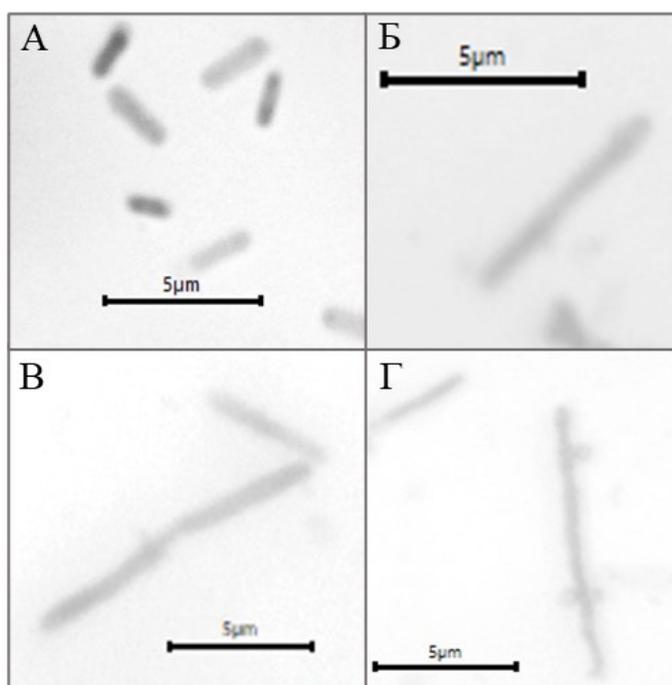


Рисунок 9. Морфологические изменения УПЭК после инкубации с экстрактом сумаха. А: нормальные клетки. Б, В, Г: короткие филаменты (5–10 мкм). Увеличение 1000х. Изображения получены с помощью цифровой камеры Levenhuk M300 BASE.

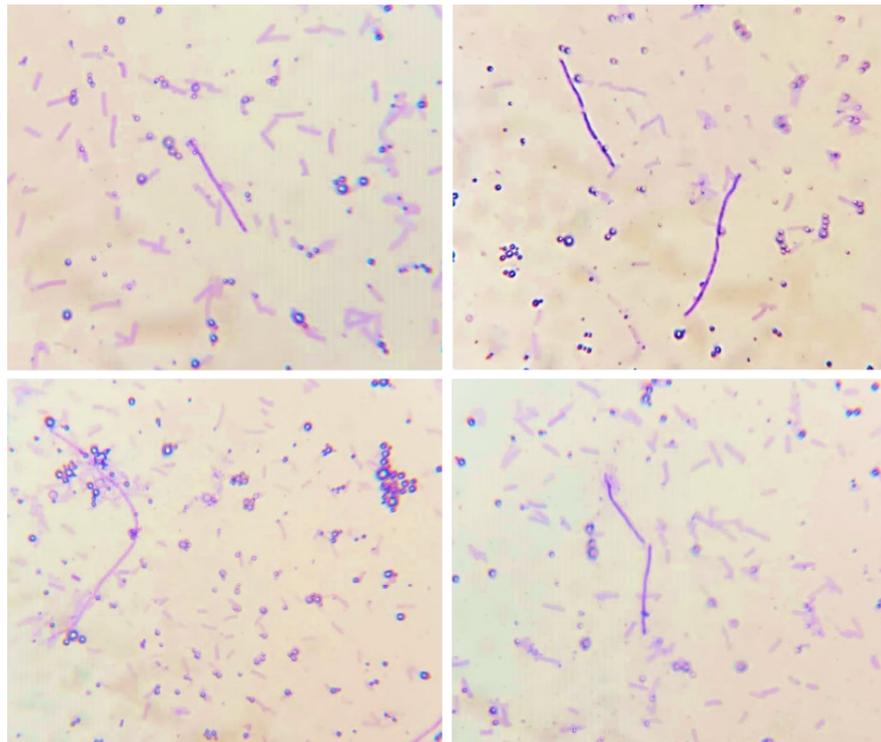


Рисунок 10. Филаментация и образование L-форм в УПЭК после инкубации с экстрактом сумаха. Увеличение 1000х. Изображения сделаны на мобильную камеру.

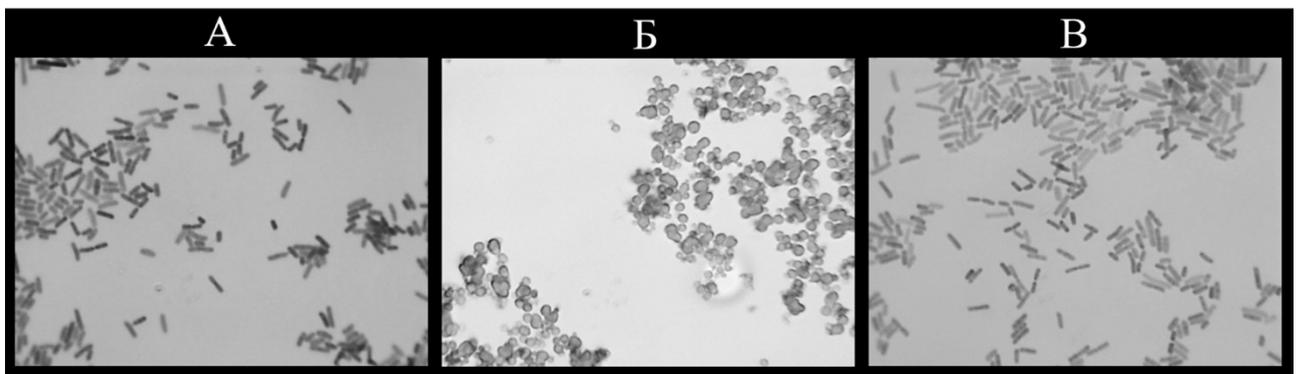


Рисунок 11. Морфологические изменения УПЭК после воздействия экстракта гвоздики. А: контроль (нормальные палочки). Б: с экстрактом (сферические клетки L-формы). В: первое поколение без экстракта (нормальные палочки).

Увеличение 1000х. Изображения получены с помощью цифровой камеры

Levenhuk M300 BASE.

### 3.3.6. Влияние длительного воздействия экстракта сумаха на чувствительность УПЭК к антибиотикам

Исследовалась способность экстракта сумаха изменять чувствительность бактерий к антибиотикам. Для этого бактерии инкубировались с экстрактом сумаха при концентрации МИК/2 в течение четырех дней. Результаты показали, что длительное воздействие экстракта сумаха не вызвало статистически значимых изменений ( $p > 0.05$ ) у всех исследованных штаммов УПЭК, а также у референсного штамма (таблица 2 и 3). Контрольные образцы, инкубированные с ДМСО, демонстрировали такую же чувствительность, как и необработанные исходные бактерии ( $p > 0.05$ ). Интересно отметить, что сообщалось о способности растительных экстрактов модулировать реакцию *E. coli* на антибиотики [234]. Наблюдаемый эффект модуляции чувствительности, то есть повышение или снижение таковой, зависел от того, каким антибиотиком обрабатывались бактерии. В исследовании было показано, что экстракты растений обладают защитным действием для бактерий по отношению к ципрофлоксацину и ампициллину, тогда как бактерицидное действие канамицина усиливалось. Авторы предполагают, что эти модулирующие эффекты, скорее всего, связаны с некоторыми свойствами полифенолов, такими как антиоксидантная активность, захват железа или прооксидантная активность. В данном исследовании не наблюдали изменений чувствительности к тестируемым антибиотикам после 4х-дневного воздействия экстракта сумаха. Предполагаем, что на модулирующий эффект, вызванный растительным экстрактом, может влиять множество факторов, таких как продолжительность воздействия экстракта, его фитохимический состав и концентрация, тип исследуемых бактерий и антибиотиков, и другие.

### 3.3.7. Синергизм

Помимо большого интереса к разработке антибактериальных препаратов на растительной основе, еще одним многообещающим подходом, который становится

все более заметным, является использование лекарственных растений в качестве модификаторов устойчивости. Синергизм между растительными экстрактами и традиционными антибиотиками может повысить эффективность антибиотикотерапии и, в некоторой степени, восстановить чувствительность бактерий к антибиотикам или предотвратить развитие устойчивости. Более того, этот подход позволил бы вернуть в использование старые и дешевые антибиотики, которые в настоящее время относительно неэффективны [235,236].

В данном исследовании оценивался синергический эффект между экстрактами гвоздики, сумаха и двумя антибиотиками из разных классов противомикробных средств: нитрофурантоином (NIT) и ципрофлоксацином (CIP), которые обычно используются для лечения ИМП [237,238]. Результаты представлены в таблице 10. МИК отдельных антибиотиков по отношению к УПЭК составили 8 и 64 мкг/мл для NIT и 0.5 и 1024 мкг/мл для CIP. Аддитивная модель Лоэве показала, что комбинация антибиотиков и растительных экстрактов не привела к взаимодействию по отношению к УПЭК ( $0.51 < FICI \leq 1$ ), за исключением одного штамма, по отношению к которому комбинации NIT + гвоздика и NIT + сумах проявляли синергический эффект ( $FICI = 0.25$  и  $0.19$  соответственно). Интересно, что данный штамм обладает высокой МЛУ. Также оценивался синергизм между экстрактами гвоздики и сумаха. Результаты показали синергический эффект по отношению к всем исследованным штаммам ( $FICI = 0.25, 0.37$ ). Независимо от интерпретации FICI, было отмечено, что МИК всех противомикробных агентов в комбинациях снижались в различной степени. Таким образом, можно сделать вывод, что гвоздика и сумах до некоторой степени могут усиливать эффективность данных антибиотиков при совместном применении.

Комбинации, показавшие синергический эффект в модели Лоэве, были дополнительно проанализированы с использованием моделей HSA, Bliss и ZIP. Рисунки 12 и 13 демонстрируют результаты. Баллы синергизма, полученные по всем моделям, превышали 10 и достигали 17.74, при р-значениях  $< 0.05$ , что

указывает на статистически значимый синергизм. Эта согласованность подтверждает наличие синергизма во всех четырех различных моделях.

Анализируя имеющуюся литературу о синергическом эффекте между противомикробными препаратами, обнаружили несоответствия в критериях интерпретации значений FICI и разногласия в интерпретации FICI и других моделей оценки. Например, в некоторых исследованиях значение FICI 0.5-1 рассматривалось как аддитивный эффект [239–241], а в других – как отсутствие взаимодействия [242,243]. Более того, было обнаружено большое расхождение между интерпретацией FICI и моделью Bliss [166].

Действительно, синергический эффект между растительными экстрактами и антибиотиками уже неоднократно описан в научных исследованиях [244]. Например, водные и спиртовые экстракты гвоздики проявляли синергический эффект с различными антибиотиками по отношению к *S. aureus* и *K. pneumoniae* [245]. Кроме того, было показано, что эвгенол, основной компонент эфирного масла гвоздики, обладает синергическим действием с такими антибиотиками, как ванкомицин, ампициллин и гентамицин [132].

В целом, заключаем, что гвоздика и сурах могут проявлять синергический антибактериальный эффект при сочетании с нитрофурантоином или друг с другом по отношению к МЛУ-УПЭК.

Таблица 10. Тест на синергизм: МИК экстрактов растений (мг/мл) и антибиотиков (мкг/мл), в отдельности (А) и в комбинации (Б), и значения FICI. NIT: нитрофурантоин, СР: ципрофлоксацин. SD  $\pm$  0.0 для 3 повторных испытаний.

Штамм	NIT + Гвоздика					СР + Гвоздика				
	NIT		Гвоздика		FICI	СР		Гвоздика		FICI
	А	Б	А	Б		А	Б	А	Б	
<b>УПЭК 1</b>	8	4	25	6.25	0.75	0.5	0.125	25	12.5	0.75
<b>УПЭК 3</b>	8	4	25	6.25	0.75	1024	128	25	12.5	0.63
<b>УПЭК 8</b>	64	8	25	3.125	0.25	1024	512	25	12.5	1

Штамм	NIT + Сумах					Гвоздика + Сумах				
	NIT		Сумах		FICI	Гвоздика		Сумах		FICI
	А	Б	А	Б		А	Б	А	Б	
<b>УПЭК 1</b>	8	4	3.125	0.195	0.56	25	3.125	3.125	0.781	0.37
<b>УПЭК 3</b>	8	4	3.125	0.024	0.51	25	3.125	3.125	0.781	0.37
<b>УПЭК 8</b>	64	8	3.125	0.195	0.19	25	3.125	3.125	0.391	0.25

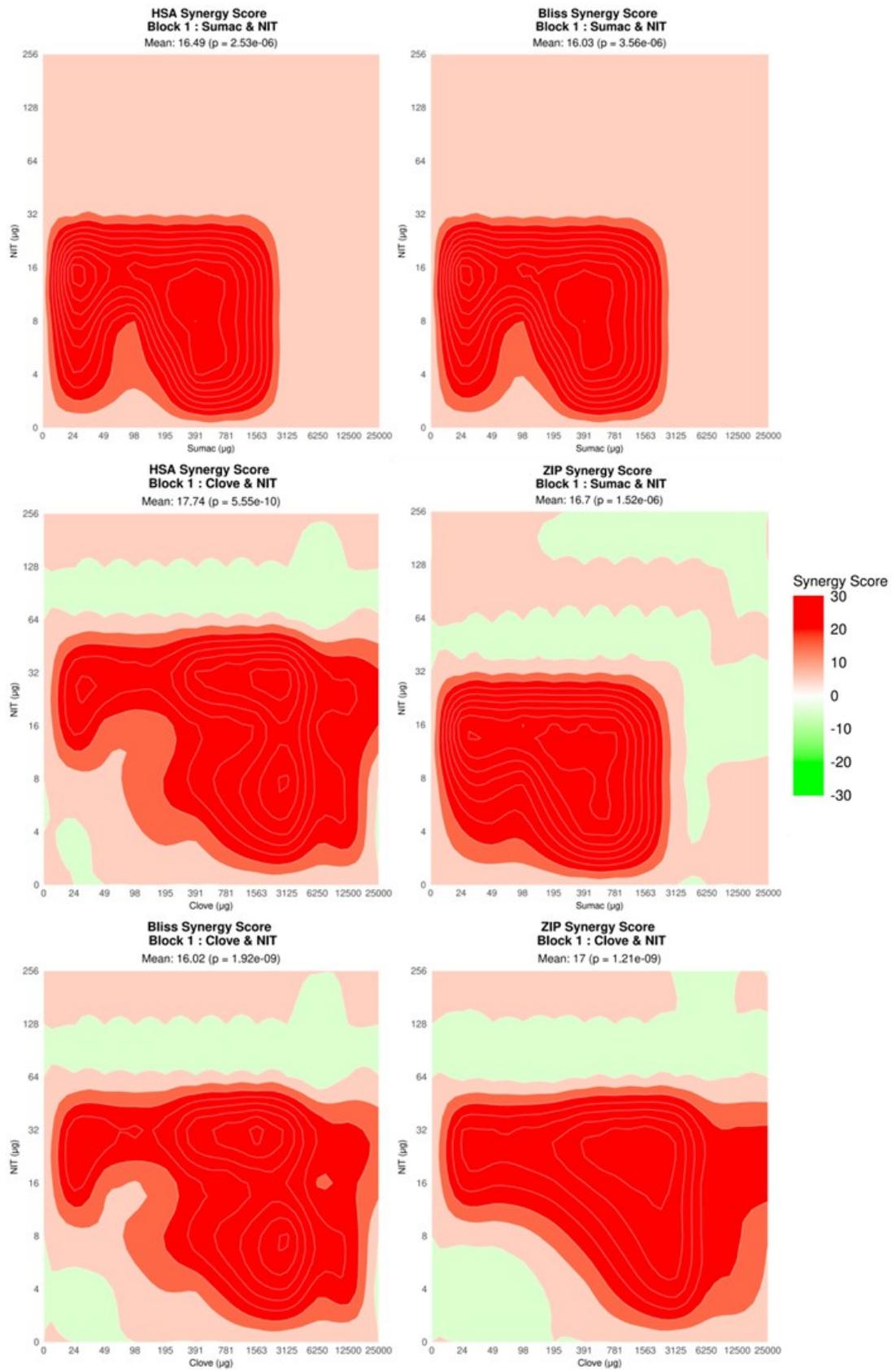


Рисунок 12. Анализ синергизма комбинаций сумаха (sumac) и гвоздики (clove) с нитрофурантоином (NIT) по отношению к УПЭК 8 с помощью программы SynergyFinder+.

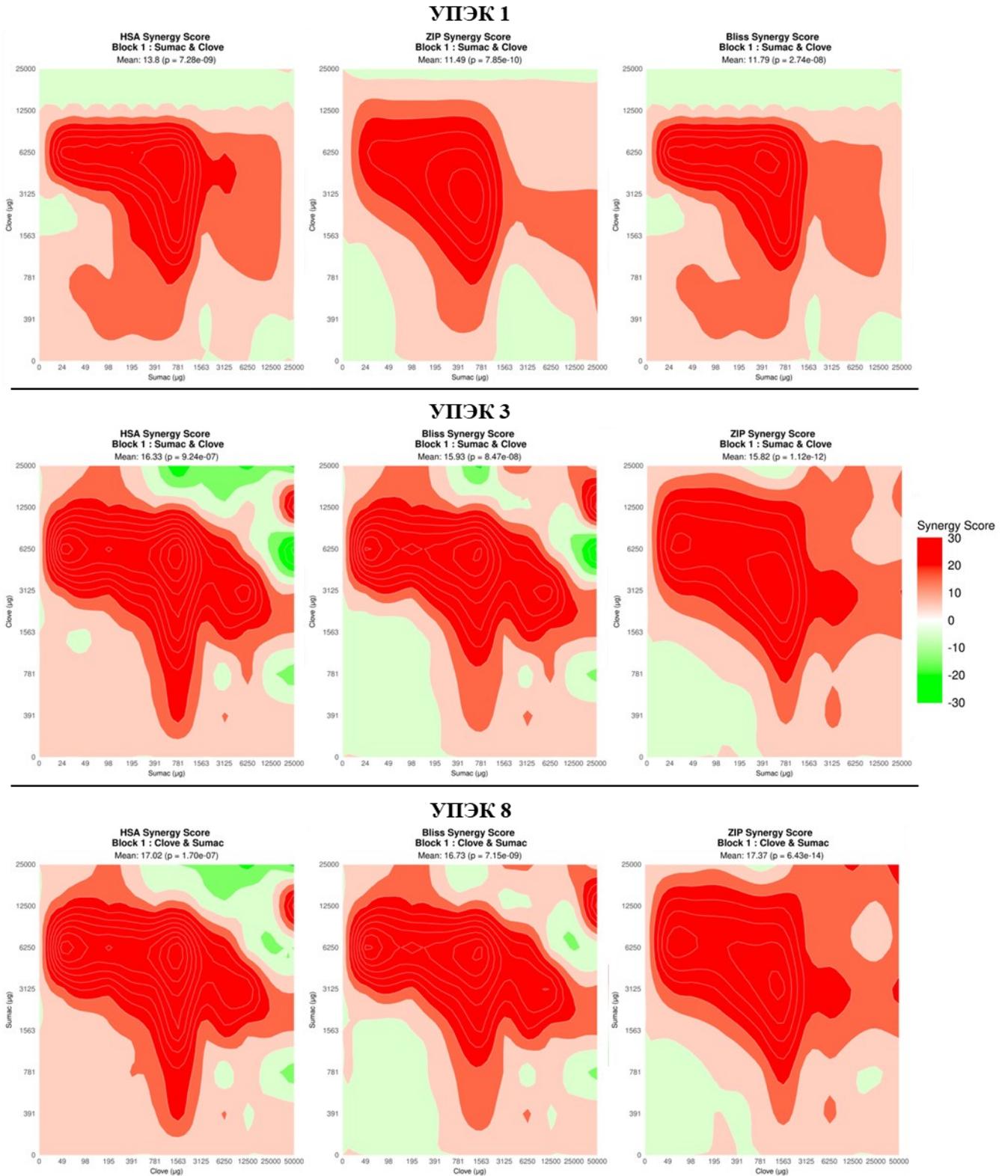


Рисунок 13. Анализ синергизма комбинации гвоздики с сумахом по отношению к 3 штаммам УПЭК с помощью программы SynergyFinder+.

### 3.3.8. Утечка белка, ДНК и РНК

Исследование способности экстракта сумаха вызывать нарушение целостности клеточной мембраны и утечку цитоплазматических компонентов из клеток УПЭК проводилось с помощью анализа утечки белка, ДНК и РНК. Результаты показали, что при МБК экстракт не вызывает утечки ни какого-либо из этих компонентов, поскольку не было значительной разницы между обработанными и контрольными бактериями ( $p > 0.05$ ). Утечка белка и нуклеиновых кислот обычно вызывается повреждением клеточной мембраны, которое приводит к вытеканию внутриклеточных компонентов за пределы клетки. Таким образом, можно сделать вывод, что экстракт сумаха не повреждает клеточную мембрану УПЭК, поэтому белки и нуклеиновые кислоты не высвобождаются из клеток. Следовательно, фитохимические вещества экстракта, вероятно, воздействуют на другие мишени в бактериальных клетках, вызывая их гибель.

### 3.4. Исследования *in vivo* с использованием *Galleria mellonella*

Личинки большой восковой моли (*Galleria mellonella*, GM) в последнее время стали использоваться в качестве недорогого и экологически безопасного метода *in vivo* вместо мышинных моделей, сопряженных с этическими соображениями [246]. Этот модельный организм обладает высокой чувствительностью ко многим фитогормонам, терпеноидам и другим соединениям, содержащимся в лекарственных растениях, что делает его идеальной системой для оценки токсических эффектов растительных соединений. Кроме того, *G. mellonella* способна эффективно метаболизировать и биотрансформировать многие соединения, позволяя исследователям получить представление о метаболизме лекарственных растений. Более того, исследования показали, что *G. mellonella* является подходящим кандидатом для оценки патогенности микроорганизмов благодаря своей восприимчивости к широкому спектру патогенов, включая

бактерии, такие как *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* и *E. coli*, а также вирусы и грибы.

В данном исследовании использовали модель *G. mellonella* для изучения патогенности бактерий и токсичности экстракта сумаха. Используемый штамм (УПЭК 3) является МЛУ с MAR-индексом, равным 0.75. УПЭК подвергались длительному воздействию (9 дней) и кратковременному воздействию (24 часа) экстракта сумаха в субингибирующих концентрациях, после чего их патогенность исследовали на личинках GM. Анализ выживаемости по Каплану-Мейера показал, что не было статистически значимой разницы в выживаемости личинок GM между группами, инфицированными бактериями, обработанными экстрактом, и группами, инфицированными бактериями, обработанными ДМСО ( $p > 0.05$ ). Кривые выживаемости представлены на рисунке 14. Существует два возможных объяснения полученного *in vivo* результата. Во-первых, возможно, субингибирующие концентрации экстракта или продолжительность воздействия были недостаточны для того, чтобы ослабить патогенность УПЭК по отношению к личинкам GM. Во-вторых, это может быть связано с результатами, полученными ранее в данном исследовании. Было показано, что инкубация УПЭК с МИК/2 экстракта сумаха приводила к их трансформации в L-формы. Однако, когда эти бактерии выводились из среды, содержащей экстракт, они восстанавливали свою исходную форму. Эти данные согласуются с результатами *in vivo* эксперимента. Когда бактерии вводились личинкам, последующие поколения восстанавливали свои природные свойства и вызывали такую же смертность, как и в контрольных группах. Несмотря на то, что субингибирующие концентрации экстракта не смогли ослабить патогенность бактерий, стрессовые условия, вызванные экстрактом, не привели к повышению вирулентности бактерий. Многие бактерии, как известно, становятся более вирулентными в стрессовых условиях, пытаясь выжить в неблагоприятной среде. В целом, полученные результаты показывают, что для эффективного лечения необходимо обеспечить доступ активных веществ сумаха к мочевыводящим путям в ингибирующих или бактерицидных концентрациях.

Необходимы дальнейшие исследования для определения оптимальных дозировок сумаха и продолжительности воздействия для достижения терапевтического эффекта при ИМП.

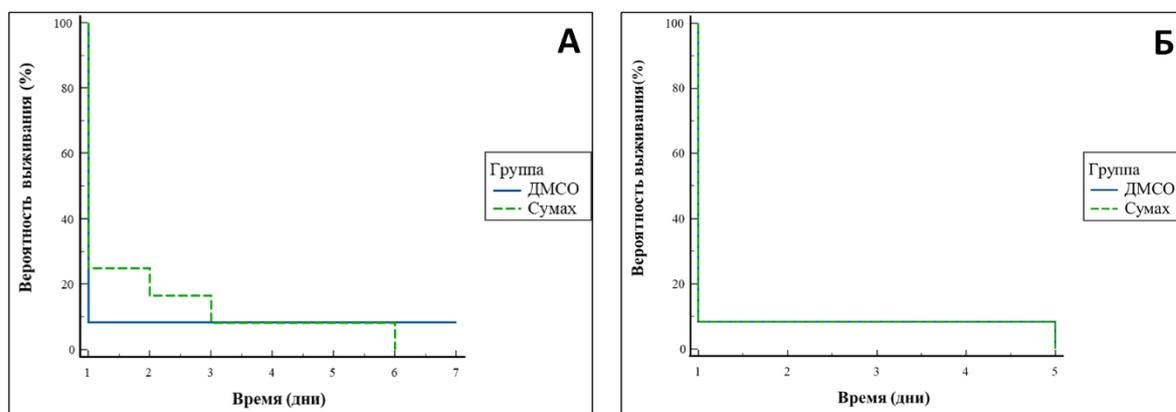


Рисунок 14. Кривая выживаемости личинок *G. mellonella*. УПЭК подвергались длительному (9 дней) (А) и кратковременному (24 часа) (Б) воздействию экстракта сумаха.

Помимо изучения влияния экстракта сумаха на патогенность бактерий, в исследовании также оценивалась его токсичность по отношению к личинкам *G. mellonella*. Экстракт вводили в различных дозах, варьирующихся от 0.36 до 11.43 г/кг массы тела. Результаты показали, что личинки переносят все тестируемые дозы со 100% выживаемостью через 24 часа, за исключением самой высокой дозы (11.43 г/кг массы тела), которая вызывала 90% смертности через 24 часа. Эти показатели не изменились после 7 дней наблюдения. Значения LD для экстракта составили: LD1 – 6.36, LD50 – 9.10, LD90 – 11.08 и LD99 – 13.02 г/кг массы тела. Принято считать безопасными химические вещества с LD50 выше 5000 мг/кг и 2000 мг/кг по классификациям опасности 4 категории агентства по охране окружающей среды (Environmental Protection Agency, EPA) и 5 категории глобальной гармонизированной системы (Globally Harmonized System, GHS) соответственно [247]. Таким образом, полученное значение LD50 (9.10 г/кг) позволяет сделать вывод о безопасности и нетоксичности водно-спиртового экстракта сумаха, использованного в данном исследовании. Логистическая

регрессионная кривая смертности личинок в зависимости от логарифма дозы (мг/мл) представлена на рисунке 15.

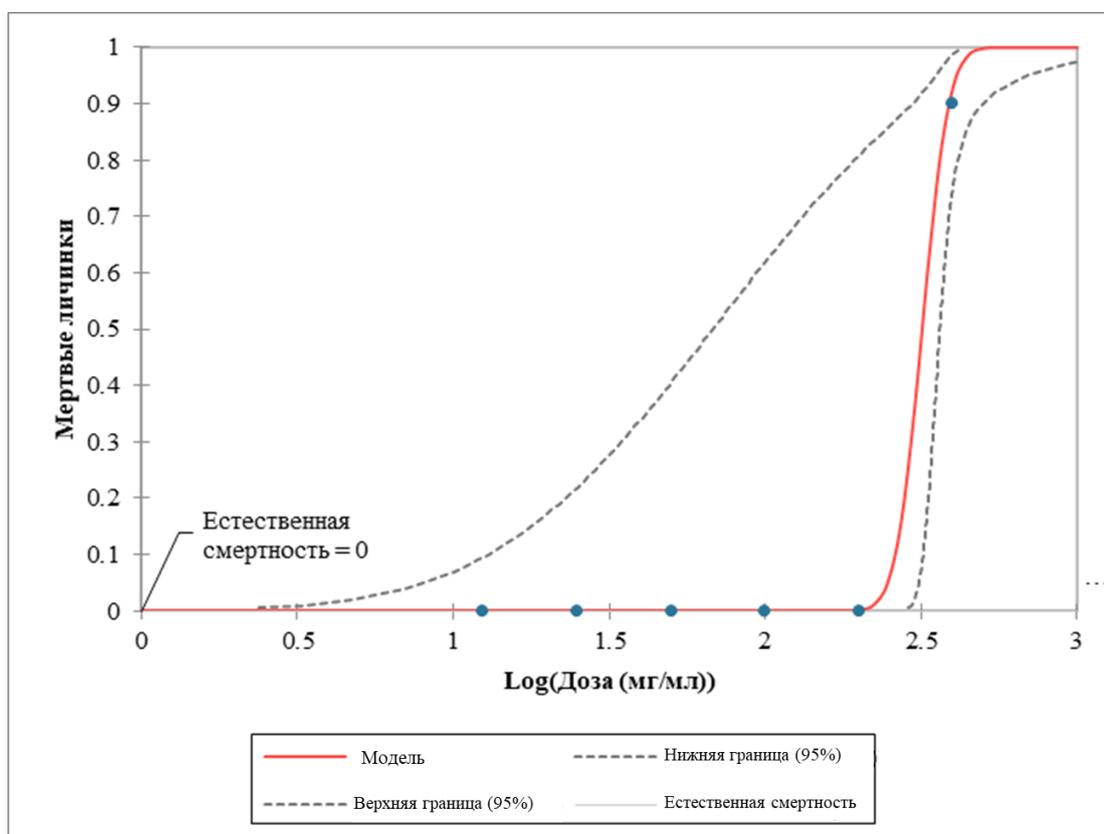


Рисунок 15. Токсичность экстракта сумаха: логистическая регрессия смертности личинок *G. mellonella* по логарифму дозы (мг/мл).

Далее изучалось влияние экстракта сумаха на выживаемость личинок *G. mellonella* после инфицирования их УПЭК. Личинок инфицировали УПЭК, а затем обрабатывали нетоксичными концентрациями экстракта сумаха (0.36, 1.43 и 5.71 г/кг массы тела). Результаты, проанализированные с помощью анализа выживаемости по Каплану-Мейеру, показали, что ни одна из доз экстракта не повлияла на выживаемость личинок. Смертность в группах, обработанных экстрактом, была такой же, как и в контрольных группах. Учитывая уже установленную *in vitro* антибактериальную активность экстракта сумаха по отношению к УПЭК, существуют несколько возможных объяснений данного результата, такие как различия в механизме действия экстракта *in vitro* и *in vivo*,

различия в биодоступности и распределении экстракта в личинках, или ограничения дизайна эксперимента. Необходимы дальнейшие исследования для изучения этих возможностей и определения того, может ли модификация дизайна эксперимента улучшить эффективность сумаха по отношению к бактериальным инфекциям *in vivo*.

### **3.5. Биосинтез, характеристика и антибактериальный скрининг AgNPs**

AgNPs были успешно синтезированы с использованием пяти растительных экстрактов (гвоздика, заатар, лимонная вербена, крапива и зеленый чай). Первоначальным подтверждением образования AgNPs стало изменение цвета растворов на более темный оттенок, который со временем становился еще темнее. Окончательный цвет всех растворов варьировался в пределах темно-коричневых оттенков (рисунок 16). Известно, что изменение цвета является индикатором образования AgNPs, что обусловлено восстановлением ионов  $\text{Ag}^+$  до  $\text{Ag}^0$  и возбуждением эффекта поверхностного плазмонного резонанса [248]. При этом водные растворы AgNPs, как было показано, могут иметь различные цвета, такие как коричневато-желтый, красновато-коричневый, бледно-желтый, золотисто-желтый и темно-коричневый [239,249], в зависимости от многих факторов, включая концентрацию  $\text{AgNO}_3$  и, в нашем случае, тип растения.

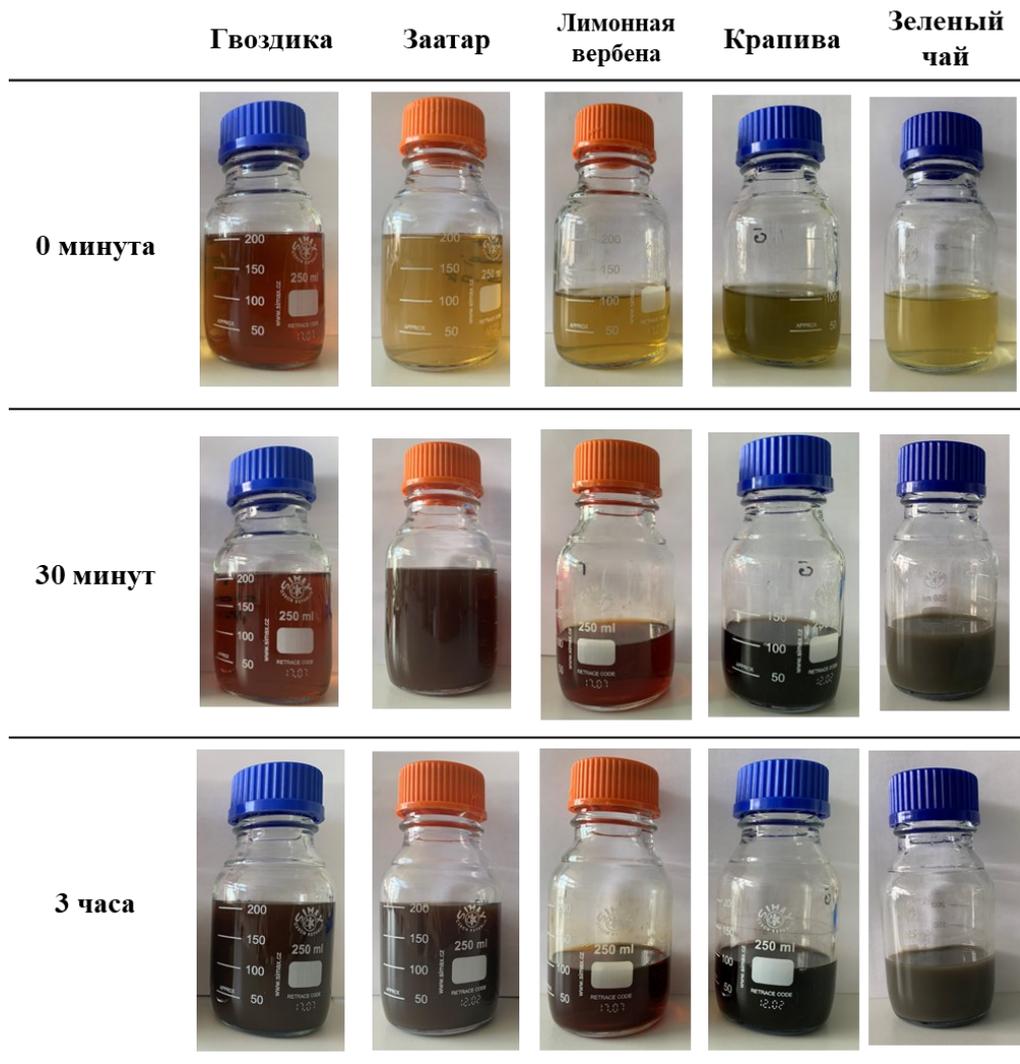


Рисунок 16. Изменение цвета растворов AgNPs в различные временные промежутки.

Спектры поглощения в УФ-видимом диапазоне показали одиночный и широкий пик поверхностного плазмонного резонанса при длине волны около 450 нм для всех растворов (рисунок 17). Интенсивность пика увеличивалась со временем, что указывает на рост концентрации AgNPs. Такая картина поглощения характерна для AgNPs и описана во многих исследованиях [250].

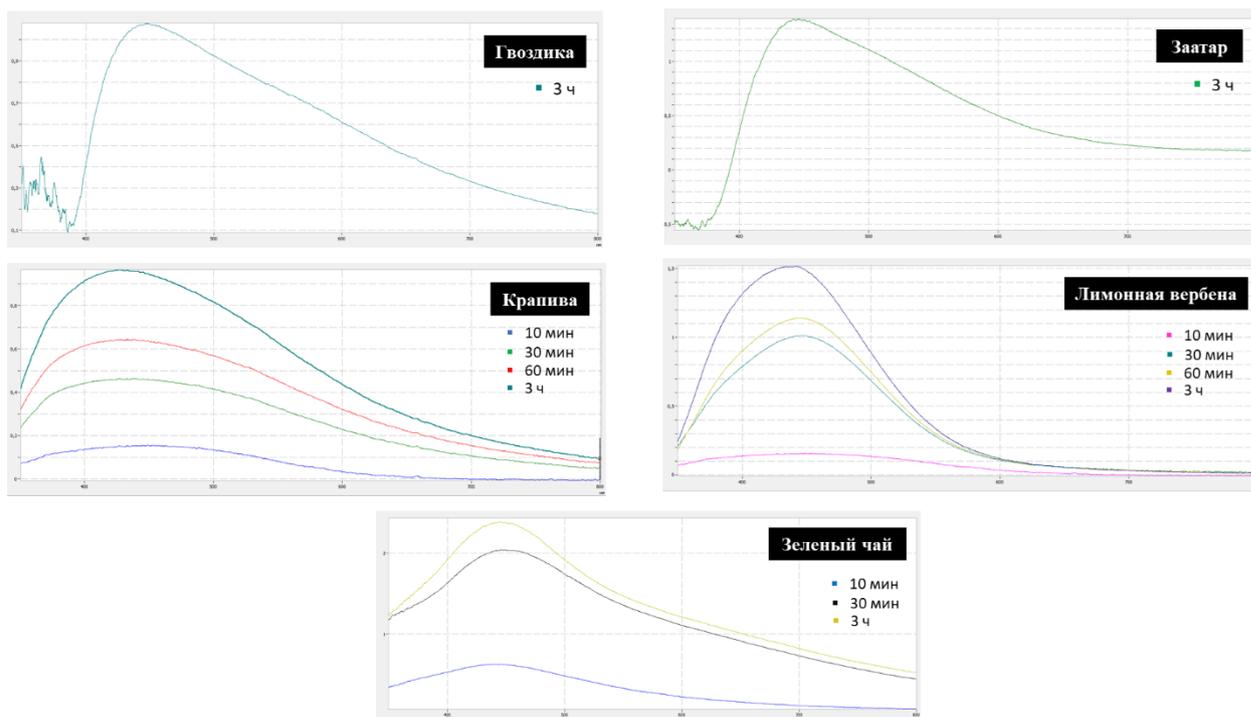


Рисунок 17. УФ-видимые спектры AgNPs в различные временные промежутки.

Согласно измерениям на установке Nanophox, размер наночастиц распределен в диапазоне 56-96 нм (рисунок 18). Традиционно, размер в пределах 0-100 нм считается характерным для наночастиц. Однако, во многих исследованиях частицы более крупным размером (до 180 нм) также рассматривались как AgNPs [239]. В данном исследовании полученные размеры наночастиц, вероятно, коррелируют с многими факторами, включая концентрацию экстракта или  $\text{AgNO}_3$  и время перемешивания, как уже сообщалось в литературе [249].

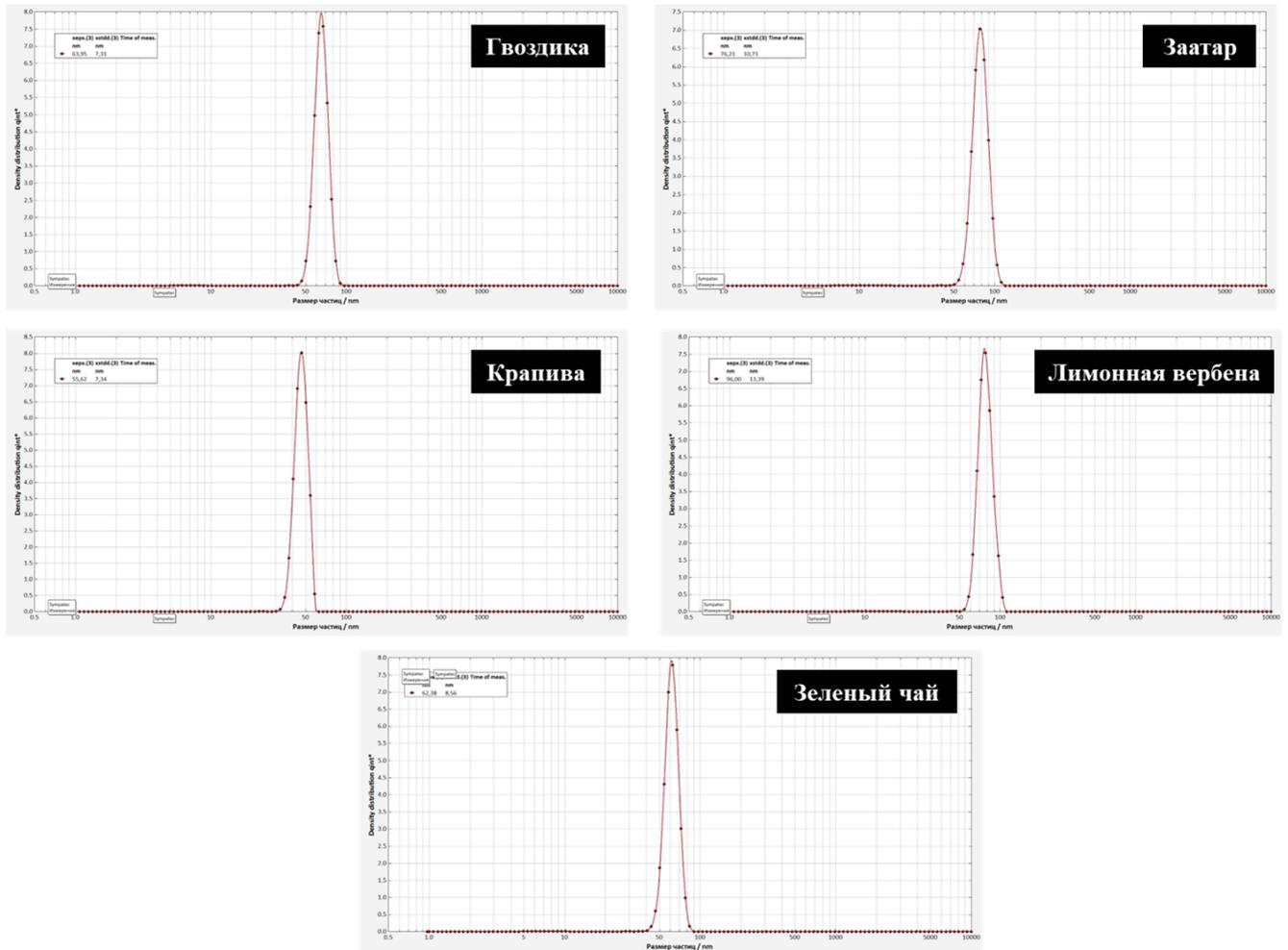


Рисунок 18. Диаметры AgNPs в нм.

Антибактериальную активность синтезированных AgNPs исследовали на *E. coli* ATCC 25922 и УПЭК. Результаты не показали никакого антибактериального эффекта ни диффузионным методом в агаровых лунках, ни методом микроразведения в бульоне. Как и ожидалось, в диффузионном методе в агаровых лунках, dH<sub>2</sub>O не проявляла зоны задержки роста, в то время как стандартные AgNPs образовали зону задержки роста диаметром  $14 \pm 1.2$  мм. Хотя некоторые исследования доказали антибактериальное действие AgNPs по отношению к многим патогенам, другие исследования не выявили таковой активности. В целом, биологическая активность наночастиц зависит от многих факторов, таких как размер частиц, их форма и структура ядра. Все эти параметры могут влиять на внутриклеточное поглощение наночастиц и их внутриклеточное распределение,

что приводит к различным биологическим эффектам [251]. Например, было показано, что более мелкие наночастицы обладают более высокой антибактериальной активностью по сравнению с более крупными, что, как предполагается, обусловлено двумя причинами: большей легкостью проникновения более мелких наночастиц в бактериальную клетку и более быстрым высвобождением ионов серебра [144,251]. Согласно одному исследованию, AgNPs, синтезированные с использованием экстракта грейпфрутовой кожуры, демонстрировали хорошую антибактериальную активность по отношению к штаммам *E. coli*, несмотря на их относительно большой размер (180 нм) [239]. Помимо вышеупомянутых факторов, влияющих на биологическое действие наночастиц, было показано, что токсичность AgNPs для бактерий зависит от кинетики растворения наночастиц, то есть от высвобождения ионов  $Ag^+$  [251]. Эта кинетика, в свою очередь, коррелирует с морфологией наночастиц. В данном исследовании, поскольку полученные размеры наночастиц находятся в обычном диапазоне, который, как сообщается, проявляет антибактериальную активность, предполагаем, что отсутствие у полученных наночастиц антибактериальной активности, скорее всего, связано с функциональными характеристиками поверхности AgNPs. Хотя биомолекулы растений и выступают в качестве стабилизаторов во время синтеза, их наличие на поверхности AgNPs может создавать стерический барьер или изменять поверхностный заряд. Это, в свою очередь, может препятствовать прямому контакту AgNPs со стенкой бактериальной клетки, не позволяя наночастицам эффективно разрушать мембрану и оказывать антибактериальное действие. Кроме того, на эффективность воздействия могут влиять форма наночастиц, которая в данном исследовании не изучалась. Возможно, примененная концентрация AgNPs была недостаточной для достижения бактерицидного эффекта. В дальнейшем следует рассмотреть модификацию процесса синтеза путем изменения таких факторов, как концентрация экстракта, время реакции или температура, чтобы потенциально изменить поверхностные свойства и морфологию таких частиц. Также необходимо

исследовать эффективность этих синтезированных AgNPs по отношению к другим бактериям, чтобы определить, специфична ли отсутствующая активность именно для *E. coli*. Проведение дополнительных исследований позволит получить более полное представление о факторах, влияющих на антибактериальную активность синтезированных AgNPs, и откроет путь к их потенциальной оптимизации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Устойчивость к антибиотикам – это способность бактерий выживать и расти в присутствии антибиотиков, что может привести к неэффективности лечения и повышению риска инфекций. Распространение устойчивости к антибиотикам среди бактерий является серьезной проблемой общественного здравоохранения. Одной из наиболее частых инфекций, вызываемых устойчивыми к антибиотикам бактериями, являются ИМП. ИМП вызываются различными уропатогенами, включая *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. mirabilis*. Эти бактерии выработали устойчивость к многим лекарственным средствам, что затрудняет лечение вызываемых ими заболеваний традиционными антибиотиками. *E. coli* является наиболее частой причиной ИМП, вызывая до 80% случаев.

В последние годы растет интерес к альтернативным методам лечения ИМП, не связанным с традиционными антибиотиками. Одним из перспективных подходов является использование лекарственных растений в качестве противомикробных средств. Некоторые исследования показали, что определенные лекарственные растения могут быть эффективны по отношению к уропатогенам, таким как *E. coli*, при минимальных побочных эффектах по сравнению с традиционными антибиотиками.

Результаты данного исследования показывают, что сумач, гвоздика и заатар являются эффективными природными антибактериальными агентами по отношению к МЛУ-УПЭК. Наиболее эффективным оказался сумач, за ним следуют гвоздика и заатар. Все эти экстракты способны подавлять активность Т1Ф в УПЭК, при этом гвоздика оказывает наиболее выраженное ингибирующее действие на лектины УПЭК. Сумач также был способен ингибировать гемагглютинацию УПЭК с эритроцитами человека и значительно снижал адгезию УПЭК к полистирольным поверхностям. Дополнительно, эти растения вызвали морфологические изменения в УПЭК, превращая бактериальные клетки в нестабильные L-формы. Кроме того, экстракты гвоздики и сумача проявляли синергический

антибактериальный эффект в сочетании с нитрофурантоином или друг с другом по отношению к МЛУ-УПЭК.

Растет интерес к разработке природных антиадгезивных средств для медицинских и промышленных применений. Одно из перспективных направлений, которое стоит изучить, – это использование сумаха. Данное исследование показывает, что сумах может значительно ингибировать адгезию УПЭК к полистирольным поверхностям. Таким образом, сумах потенциально может использоваться в качестве натуральной альтернативы синтетическим антиадгезивным средствам в медицине и промышленности. В целом, этот результат может иметь более широкие последствия для разработки новых стратегий предотвращения адгезии бактерий и образования биопленок на поверхностях.

AgNPs являются привлекательной альтернативой традиционным антибиотикам. В данном исследовании с использованием экстрактов пяти различных растений были успешно синтезированы AgNPs с хорошим распределением по размерам. Однако, полученные AgNPs не продемонстрировали антибактериальной активности по отношению к *E. coli*. Это указывает на важность изучения факторов, определяющих антибактериальную активность AgNPs, для оптимизации метода синтеза.

*Galleria mellonella* – это перспективная экологически чистая модель *in vivo* для оценки патогенности бактерий и токсичности лекарственных растений. Этот небольшой, не относящийся к млекопитающим модельный организм обладает рядом преимуществ перед традиционными животными моделями, включая низкую стоимость и высокую скорость размножения личинок. *G. mellonella* высокочувствительна ко многим фитогормонам и соединениям, содержащимся в лекарственных растениях, что делает ее идеальной системой для оценки их фармакологической активности и токсических эффектов. Эта модель была использована в данном исследовании для определения токсичности экстракта сумаха, патогенности УПЭК, а также оценки способности сумаха ослаблять вирулентность бактерий. LD50 водно-спиртового экстракта сумака составила 9.10

г/кг, что указывает на безопасность и нетоксичность данного экстракта. Однако обработка инфицированных УПЭК личинок высоким нетоксичным концентрациям экстракта сумаха не оказала существенного влияния на их выживаемость. Причины этого результата не совсем ясны и могут быть обусловлены несколькими факторами. Одним из возможных объяснений может быть различие в механизме действия экстракта *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, на полученные результаты могли повлиять различия в биодоступности и распределении экстракта внутри личинок, а также ограничения дизайна эксперимента. На основании этих результатов необходимы дальнейшие исследования для лучшего понимания того, как экстракт сумаха влияет на личинок, инфицированных УПЭК, и могут ли различные концентрации или способы введения экстракта привести к другим результатам. В целом, полученные *in vivo* результаты являются хорошим шагом на пути к тестированию эффективности лекарственных растений на других биологических моделях, и если их эффективность будет доказана, можно переходить к клиническим испытаниям.

В заключение, использование лекарственных растений в качестве альтернативы традиционным антибиотикам является важным шагом в борьбе с устойчивостью бактерий к антибиотикам. Этот метод лечения представляет собой безопасный и эффективный способ лечения ИМП, не требующий применения традиционных антибиотиков, которые могут быть неэффективны из-за множественной лекарственной устойчивости уропатогенов. Данное исследование предоставило доказательства того, что использование натуральных продуктов может стать альтернативой антибиотикам при лечении инфекций, вызванных МЛУ-УПЭК. Результаты этой работы могут быть использованы для разработки новых методов лечения ИМП, а также новых пищевых продуктов, содержащих растения с антибактериальными свойствами. Это позволит снизить риск развития устойчивости к антибиотикам, поскольку бактерии с меньшей вероятностью вырабатывают устойчивость к фитохимическим веществам по сравнению с антибиотиками.

## Выводы

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Высокая устойчивость штаммов УПЭК наблюдалась к ампициллину, тогда как наибольшая чувствительность была к имипенему, за ним следовали ципрофлоксацин, тетрациклины, цефтазидим/клавулановая кислота, цефтазидим и триметоприм. 50% исследованных штаммов УПЭК обладали множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ); один из них проявлял устойчивость ко всем протестированным антибиотикам (индекс MAR=1), а у остальных MAR-индекс превышал 0.2.

2. Антибактериальная активность водно-спиртовых экстрактов сумаха, гвоздики и заатара была продемонстрирована в отношении всех исследованных штаммов УПЭК и *E. coli* ATCC 25922 (МИК и МБК составили 3.125-50 мг/мл). Сумах является самым эффективным растением за ним следуют гвоздика и заатар. Все экстракты обладают бактерицидным действием в отношении УПЭК. Экстракт сумаха не повреждает клеточную мембрану УПЭК и не вызывает адаптации бактерий к нему после его длительного воздействия.

3. Исследуемые штаммы УПЭК агглютинировались с *S. cerevisiae* и ДПГ *C. albicans* по маннозочувствительному типу. Более устойчивые штаммы проявляли более сильную агглютинацию. Экстракт гвоздики ингибировал агглютинацию УПЭК с обоими видами дрожжей. Сумах и заатар ингибировали агглютинацию УПЭК с *S. cerevisiae*, но не влияли на агглютинацию с *C. albicans*. Штаммы УПЭК, обладающие наибольшей устойчивостью к антибиотикам, проявляли маннозочувствительную и маннозоустойчивую гемагглютинацию с эритроцитами человека. Экстракт сумаха смог ингибировать эту агглютинацию.

4. Адгезия штаммов УПЭК к поверхности из полистирола была существенно снижена (на 79.1-95.1%) при воздействии субингибирующей концентрации экстракта сумаха.

5. Переход УПЭК в нестабильную L-форму был вызван субингибирующими концентрациями экстрактов гвоздики, сумаха и заатара в различных процентах: гвоздика 96-99%, заатар 64-82%, сумах 10-30%. Экстракт сумаха вызвал значительное удлинение у одного из исследованных штаммов, при этом длина 56% обработанных клеток была  $> 4$  мкм и достигала 8.4 мкм (короткие филаменты).

6. Синергетический антибактериальный эффект в отношении МЛУ-УПЭК был выявлен при воздействии экстрактов гвоздики и сумаха в сочетании с нитрофурантоином или друг с другом. Комбинация антибиотиков (ципрофлоксацин или нитрофурантоин) с экстрактами растений (гвоздика или сумах) или только растительных экстрактов (гвоздика и сумах) привела к снижению МИК всех агентов по отношению к УПЭК.

7. Синтез AgNPs размером 56-96 нм был успешно проведен с использованием экстрактов пяти растений (гвоздика, заатар, лимонная вербена, крапива и зеленый чай). Полученные AgNPs не продемонстрировали антибактериальной активности по отношению к *E. coli* ATCC 25922 или УПЭК.

8. Патогенность УПЭК у личинок *G. mellonella* не была снижена после обработки бактерий субингибирующими концентрациями экстракта сумаха, также обработка личинок *G. mellonella*, инфицированных УПЭК, экстрактом сумаха в высоких нетоксичных концентрациях не повлияла на их выживаемость. Водно-спиртовой экстракт сумаха является безопасным и нетоксичным средством с значениями LD1, LD50, LD90 и LD99 равные 6.36, 9.10, 11.08 и 13.02 г/кг массы тела соответственно.

### **Практические рекомендации**

Результаты этой работы могут быть использованы для разработки новых методов лечения ИМП, а также новых пищевых продуктов, содержащих растения с антибактериальными свойствами. Это позволит снизить риск устойчивости к антибиотикам, поскольку бактерии с меньшей вероятностью вырабатывают устойчивость к фитохимическим веществам по сравнению с антибиотиками.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Отдельное внимание следует уделить оптимизации метода экстракции для сумаха, гвоздики и заатара с целью максимизации их антибактериальной активности. Анализ фитохимического состава позволит глубже понять механизмы данной активности, что потребует дальнейшего изучения. Кроме того, перспективным направлением является исследование синергического эффекта с различными антибиотиками. Более того, оптимизация процесса зеленого синтеза наночастиц серебра с использованием растений, использованных в данном исследовании, может привести к разработке эффективных антибактериальных агентов. Проведение исследований *in vivo* с применением различных моделей также является важнейшим шагом для подтверждения полученных результатов и их перевода в клинически значимые приложения.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Negus M., Phillips C., Hindley R. Recurrent urinary tract infections: a critical review of the currently available treatment options // *The Obstetrician & Gynaecologist*. Wiley, 2020. Vol. 22, № 2. P. 115–121.
2. Lodhia S., Sharaf A., Foley C. Management of recurrent urinary tract infections in adults // *Surgery (Oxford)*. Elsevier Ltd, 2020. Vol. 38, № 4. P. 197–203.
3. Kot B. Antibiotic Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli* // *Pol J Microbiol*. 2019. Vol. 68, № 4. P. 403–415.
4. Russo T.A. et al. Chromosomal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of *Escherichia coli* Strains Causing Recurrent Urinary Tract Infections in Young Women // *Journal of Infectious Diseases*. 1995. Vol. 172, № 2. P. 440–445.
5. Jakobsen L. et al. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients // *Int J Food Microbiol*. Elsevier, 2010. Vol. 142, № 1–2. P. 264–272.
6. Mellata M., Johnson J.R., Curtiss R. *Escherichia coli* isolates from commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and urinary tract infection in rodent models of human infections // *Zoonoses Public Health*. Wiley-VCH Verlag, 2018. Vol. 65, № 1. P. 103–113.
7. Asadi Karam M.R., Habibi M., Bouzari S. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli* // *Mol Immunol*. 2019. Vol. 108. P. 56–67.
8. Wiles T.J., Kulesus R.R., Mulvey M.A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* // *Exp Mol Pathol*. 2008. Vol. 85, № 1. P. 11–19.
9. Terlizzi M.E., Gribaudo G., Maffei M.E. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies // *Front Microbiol*. 2017. Vol. 8, № AUG. P. 1566.

10. Vahlensieck W. et al. Management of Uncomplicated Recurrent Urinary Tract Infections // *European Urology, Supplements*. 2016.
11. Алекова С.Т., Койчева Р. МНОЖЕСТВЕННАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ УРОПАТОГЕНОВ КАК ФАКТОР РИСКА ПРИ ОКАЗАНИИ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ (ОПЫТ ЦЕНТРАЛЬНОЙ БОЛГАРИИ) // *Анализ риска здоровью*. 2024. № 2. P. 132–140.
12. Суадкиа С. et al. Антибиотикорезистентные уропатогенные *Escherichia coli*, выделенные от детей с врожденными аномалиями развития мочевыделительной системы // *Antibiotiki i Khimioterapiya*. 2020. Vol. 65, № 7–8. P. 23–26.
13. Walker E. et al. Clinical Management of an Increasing Threat: Outpatient Urinary Tract Infections Due to Multidrug-Resistant Uropathogens // *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press, 2016. Vol. 63, № 7. P. 960–965.
14. Peleg A.Y., Hooper D.C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria // *New England Journal of Medicine*. 2010.
15. Zalewska-Piątek B.M., Piątek R.J. Alternative treatment approaches of urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* strains // *Acta Biochim Pol*. 2019. Vol. 66. P. 129–138.
16. Khameneh B. et al. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint // *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2019 8:1. BioMed Central, 2019. Vol. 8, № 1. P. 1–28.
17. Álvarez-Martínez F.J. et al. Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review // *Curr Med Chem*. *Curr Med Chem*, 2020. Vol. 27, № 15. P. 2576–2606.
18. Álvarez-Martínez F.J. et al. The antimicrobial capacity of *Cistus salviifolius* and *Punica granatum* plant extracts against clinical pathogens is related to their polyphenolic composition // *Scientific Reports* 2021 11:1. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–12.

19. Lee S.H., Jun B.-H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine // *Int J Mol Sci. MDPI*, 2019. Vol. 20, № 4. P. 865.
20. Dakal T.C. et al. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles // *Front Microbiol. Frontiers Media S.A.*, 2016. Vol. 7, № NOV. P. 1831.
21. Adeolu M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. // *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016. Vol. 66, № 12. P. 5575–5599.
22. Cronan J.E. *Escherichia coli* as an Experimental Organism // eLS. Wiley, 2014.
23. Drasar B.S., Hill M.J. Human intestinal flora. Academic Press London, 1974. 36–43 p.
24. Yan F., Polk D.B. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are // *Curr Opin Gastroenterol*. 2004. Vol. 20, № 6. P. 565–571.
25. Nataro J.P., Kaper J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli* // *Clin Microbiol Rev*. 1998. Vol. 11, № 1. P. 142–201.
26. Marrs C.F., Zhang L., Foxman B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? // *FEMS Microbiol Lett*. 2005. Vol. 252, № 2. P. 183–190.
27. Dhakal B.K., Kulesus R.R., Mulvey M.A. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli* // *Eur J Clin Invest*. John Wiley & Sons, Ltd, 2008. Vol. 38, № SUPPL.2. P. 2–11.
28. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs // *Disease-a-Month*. 2003. Vol. 49, № 2. P. 53–70.
29. Clermont O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups // *Environ Microbiol Rep*. 2013. Vol. 5, № 1. P. 58–65.

30. Bien J., Sokolova O., Bozko P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage // *Int J Nephrol*. 2012. Vol. 2012. P. 1–15.
31. Lee J.H. et al. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea // *Lett Appl Microbiol*. 2016. Vol. 62, № 1. P. 84–90.
32. Ochoa S.A. et al. Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Strains: Phylogenetic Groups Widely Associated with Integrons Maintain High Genetic Diversity // *Front Microbiol*. 2016. Vol. 7.
33. Hacker J. et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution // *Mol Microbiol*. 1997. Vol. 23, № 6. P. 1089–1097.
34. Wurpel D.J. et al. Comparative analysis of the uropathogenic *Escherichia coli* surface proteome by tandem mass-spectrometry of artificially induced outer membrane vesicles // *J Proteomics*. 2015. Vol. 115. P. 93–106.
35. Wurpel D.J. et al. Comparative proteomics of uropathogenic *Escherichia coli* during growth in human urine identify UCA-like (UCL) fimbriae as an adherence factor involved in biofilm formation and binding to uroepithelial cells // *J Proteomics*. 2016. Vol. 131. P. 177–189.
36. Stenutz R., Weintraub A., Widmalm G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens // *FEMS Microbiol Rev*. 2006. Vol. 30, № 3. P. 382–403.
37. Johnson J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection // *Clin Microbiol Rev*. 1991. Vol. 4, № 1. P. 80–128.
38. EWERS C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? // *International Journal of Medical Microbiology*. 2007. Vol. 297, № 3. P. 163–176.
39. Flores-Mireles A.L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options // *Nat Rev Microbiol*. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 13, № 5. P. 269–284.

40. Bischoff S. et al. Empiric antibiotic therapy in urinary tract infection in patients with risk factors for antibiotic resistance in a German emergency department // *BMC Infect Dis. BioMed Central Ltd.*, 2018. Vol. 18, № 1. P. 56.
41. Mann R. et al. Metabolic Adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract // *Front Cell Infect Microbiol. Frontiers Media S.A.*, 2017. Vol. 7, № JUN. P. 241.
42. ECDCP. Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European Acute Care Hospitals, 2011–2012. Stockholm (Sweden): European Center for Disease Control and Prevention, 2013.
43. Smelov V., Naber K., Bjerklund Johansen T.E. Improved Classification of Urinary Tract Infection: Future Considerations // *European Urology Supplements. Elsevier B.V.*, 2016. Vol. 15, № 4. P. 71–80.
44. Russo T.A. et al. Chromosomal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of *Escherichia coli* Strains Causing Recurrent Urinary Tract Infections in Young Women // *Journal of Infectious Diseases*. 1995. Vol. 172, № 2. P. 440–445.
45. Jakobsen L. et al. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients☆ // *Int J Food Microbiol*. 2010. Vol. 142, № 1–2. P. 264–272.
46. Klemm P., Schembri M.A. Fimbriae assisted bacterial surface display of heterologous peptides // *International Journal of Medical Microbiology. Urban & Fischer*, 2000. Vol. 290, № 3. P. 215–221.
47. Mol O. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli* // *FEMS Microbiol Rev*. No longer published by Elsevier, 1996. Vol. 19, № 1. P. 25–52.
48. Vigil P.D. et al. Presence of Putative Repeat-in-Toxin Gene *tosA* in *Escherichia coli* Predicts Successful Colonization of the Urinary Tract // *mBio / ed. Rappuoli R*. 2011. Vol. 2, № 3.
49. Zhang G., Meredith T.C., Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria // *Curr Opin Microbiol*. 2013. Vol. 16, № 6. P. 779–785.

50. Aguiniga L.M. et al. Lipopolysaccharide Domains Modulate Urovirulence // *Infect Immun* / ed. McCormick B.A. 2016. Vol. 84, № 11. P. 3131–3140.
51. Kikuchi T. et al. Curli Fibers Are Required for Development of Biofilm Architecture in *Escherichia coli* K-12 and Enhance Bacterial Adherence to Human Uroepithelial Cells // *Microbiol Immunol*. 2005. Vol. 49, № 9. P. 875–884.
52. Goyal P. et al. Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgG // *Nature*. 2014. Vol. 516, № 7530. P. 250–253.
53. Luna-Pineda V.M. et al. Curli of Uropathogenic *Escherichia coli* Enhance Urinary Tract Colonization as a Fitness Factor // *Front Microbiol*. 2019. Vol. 10.
54. Henderson I.R. et al. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004. Vol. 68, № 4. P. 692–744.
55. Skaar E.P. The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts // *PLoS Pathog* / ed. Madhani H.D. 2010. Vol. 6, № 8. P. e1000949.
56. Reigstad C.S., Hultgren S.J., Gordon J.I. Functional Genomic Studies of Uropathogenic *Escherichia coli* and Host Urothelial Cells when Intracellular Bacterial Communities Are Assembled // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, № 29. P. 21259–21267.
57. Schwechheimer C., Kuehn M.J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions // *Nat Rev Microbiol*. 2015. Vol. 13, № 10. P. 605–619.
58. Mascher T., Helmann J.D., Uden G. Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006.
59. Nakamura S., Minamino T. Flagella-Driven Motility of Bacteria // *Biomolecules* 2019, Vol. 9, Page 279. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 9, № 7. P. 279.
60. Lane M.C. et al. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. Vol. 104, № 42. P. 16669–16674.

61. Nakamura Y. et al. Establishment of a multi-species biofilm model and metatranscriptomic analysis of biofilm and planktonic cell communities // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016. Vol. 100, № 16. P. 7263–7279.
62. Adamus-Białek W. et al. The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains // *Mol Biol Rep*. 2018.
63. Bartoletti R. et al. Treatment of Urinary Tract Infections and Antibiotic Stewardship // *European Urology Supplements*. 2016. Vol. 15, № 4. P. 81–87.
64. Edelsberg J. et al. Prevalence of antibiotic resistance in US hospitals // *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014. Vol. 78, № 3. P. 255–262.
65. Habibi A., Khameneie M.K. Antibiotic resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli*; isolated from pregnant women with history of recurrent urinary tract infections // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2016. Vol. 15, № 8. P. 1745.
66. Димитрова Н.И. et al. Чувствительность и резистентность к антимикробным препаратам БЛРС-продуцирующих и не продуцирующих БЛРС штаммов *E. coli* у больных с инфекцией мочевыводящих путей // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019. Vol. 64, № 2. P. 104–110.
67. Яковлев С.В., Суворова М.П. Обоснование выбора антибиотика для лечения цистита: рекомендации клинических фармакологов. Обзор литературы. // *Терапевтический архив. Consilium Medicum*, 2022. Vol. 94, № 8. P. 1006–1013.
68. Сычева С. В., Коренькова О. А., Ефимова Т. В. Выявление энтеробактерий - продуцентов бета-лактамаз расширенного спектра у пациентов урологического отделения многопрофильного стационара // *Материалы научно-практических конференций в рамках VIII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2022) : Сборник тезисов*. Москва, 2022. P. 96.
69. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data. Stockholm, 2023.
70. Dehbanipour R. et al. High prevalence of multidrug-resistance uropathogenic *Escherichia coli* strains, Isfahan, Iran // *J Nat Sci Biol Med*. 2016.

71. Hadifar S. et al. Epidemiology of Multidrug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: a Systematic Review and Meta-Analysis // *Jpn J Infect Dis*. 2017. Vol. 70, № 1. P. 19–25.
72. Peleg A.Y., Hooper D.C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria // *New England Journal of Medicine*. 2010.
73. Stalder T. et al. Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance // *Front Microbiol*. 2012. Vol. 3.
74. Deng Y. et al. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons // *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015. Vol. 14, № 1. P. 45.
75. Pandey N., Cascella M. Beta Lactam Antibiotics. [Updated 2020 Sep 9]. StatPearls Publishing, 2020.
76. Bradford P.A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat // *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology Journals, 2001. Vol. 14, № 4. P. 933–951.
77. Baudry P.J. et al. Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America // *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009.
78. Dashti A.A. et al. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Kuwait and UK strains identified by the Vitek system, and subsequent comparison of the Vitek system with other commercial ESBL-testing systems using these strains // *J Med Microbiol*. 2006.
79. Shahbazi S. et al. Distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactam, quinolone and carbapenem resistance genes, and genetic diversity among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Tehran, Iran // *J Glob Antimicrob Resist*. 2018.
80. Rezai M.S. et al. Characterization of Multidrug Resistant Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* among Uropathogens of Pediatrics in North of Iran // *Biomed Res Int*. 2015.

81. Komp Lindgren P., Karlsson A., Hughes D. Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections // *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. Vol. 47, № 10. P. 3222–3232.
82. Reece R.J., Maxwell A., Wang J.C. DNA gyrase: Structure and function // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* Informa Healthcare, 1991. Vol. 26, № 3–4. P. 335–375.
83. Shakti L., Veeraraghavan B. Advantage and limitations of nitrofurantoin in multi-drug resistant Indian scenario // *Indian Journal of Medical Microbiology.* 2015.
84. Sandegren L. et al. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli* // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2008.
85. Falagas M.E. et al. Fosfomycin // *Clin Microbiol Rev.* 2016. Vol. 29, № 2. P. 321 LP – 347.
86. Dijkmans A.C. et al. Fosfomycin: Pharmacological, clinical and future perspectives // *Antibiotics.* 2017.
87. Popovic M. et al. Fosfomycin: An old, new friend? // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2010.
88. Vahlensieck W. et al. Management of Uncomplicated Recurrent Urinary Tract Infections // *European Urology Supplements.* 2016. Vol. 15, № 4. P. 95–101.
89. Idil N. et al. High trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection // *Minerva Biotecnol.* 2016. Vol. 28, № 3. P. 159–163.
90. Wignall G.R. et al. The Effects of Triclosan on Uropathogen Susceptibility to Clinically Relevant Antibiotics // *J Endourol.* 2008. Vol. 22, № 10. P. 2349–2356.
91. Parish A., Holliday K. Long-Term Care Acquired Urinary Tract Infections' Antibiotic Resistance Patterns and Empiric Therapy: A Pilot Study // *Geriatr Nurs (Minneap).* Mosby, 2012. Vol. 33, № 6. P. 473–478.
92. Huntington J.A. et al. Efficacy of ceftolozane/tazobactam versus levofloxacin in the treatment of complicated urinary tract infections (cUTIs) caused by levofloxacin-resistant pathogens: Results from the ASPECT-cUTI trial // *Journal of*

- Antimicrobial Chemotherapy. Oxford University Press, 2016. Vol. 71, № 7. P. 2014–2021.
93. Cole S.T. Who will develop new antibacterial agents? // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, 2014. Vol. 369, № 1645. P. 20130430.
  94. Shaheen G. et al. Therapeutic potential of medicinal plants for the management of urinary tract infection: A systematic review // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. Blackwell Publishing, 2019. Vol. 46, № 7. P. 613–624.
  95. Upadhyay A. et al. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis // *Biomed Res Int*. 2014. Vol. 2014. P. 1–18.
  96. Khameneh B. et al. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint // *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019. Vol. 8, № 1. P. 118.
  97. Deipenbrock M., Hensel A. Polymethoxylated flavones from *Orthosiphon stamineus* leaves as antiadhesive compounds against uropathogenic *E. coli*. // *Fitoterapia*. Netherlands, 2019. Vol. 139. P. 104387.
  98. Sarshar S. et al. Antiadhesive hydroalcoholic extract from *Apium graveolens* fruits prevents bladder and kidney infection against uropathogenic *E. coli* // *Fitoterapia*. Elsevier B.V., 2018. Vol. 127. P. 237–244.
  99. Scharf B. et al. Influence of Cranberry Extract on Tamm-Horsfall Protein in Human Urine and its Antiadhesive Activity Against Uropathogenic *Escherichia coli*. // *Planta Med*. Germany, 2019. Vol. 85, № 2. P. 126–138.
  100. Mutters N.T. et al. Treating urinary tract infections due to MDR *E. coli* with Isothiocyanates – a phytotherapeutic alternative to antibiotics? // *Fitoterapia*. Elsevier B.V., 2018. Vol. 129. P. 237–240.
  101. Al-Manhel A.J., Niamah A.K. Effect of aqueous and alcoholic plant extracts on inhibition of some types of microbes and causing spoilage of food // *Pakistan Journal of Food Sciences*. 2015. Vol. 25, № 3. P. 104–109.

102. Sabadash M., Shulyak A. Canephron® N in the treatment of recurrent cystitis in women of child-bearing Age: a randomised controlled study // *Clinical Phytoscience*. Springer Nature, 2017. Vol. 3, № 1. P. 9.
103. Dufour V., Stahl M., Baysse C. The antibacterial properties of isothiocyanates // *Microbiology (United Kingdom)*. 2015. Vol. 161, № 2. P. 229–243.
104. Lee J.H., Kim Y.G., Lee J. Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli* // *J Appl Microbiol*. Blackwell Publishing Ltd, 2017. Vol. 123, № 6. P. 1420–1428.
105. Lagha R. et al. Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients // *Molecules*. MDPI AG, 2019. Vol. 24, № 6. P. 1161.
106. Hidalgo G., Chan M., Tufenkji N. Inhibition of *Escherichia coli* CFT073 *fliC* expression and motility by cranberry materials. // *Appl Environ Microbiol*. 2011. Vol. 77, № 19. P. 6852–6857.
107. Ranfaing J. et al. Propolis potentiates the effect of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) in reducing the motility and the biofilm formation of uropathogenic *Escherichia coli*. // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, № 8. P. e0202609.
108. Fazly Bazzaz B.S. et al. In vitro evaluation of antibacterial activity of verbascoside, lemon verbena extract and caffeine in combination with gentamicin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* clinical isolates. // *Avicenna J Phytomed*. Mashhad University of Medical Sciences, 2018. Vol. 8, № 3. P. 246–253.
109. Bazzaz B.S.F. et al. Effect of catechins, green tea extract and methylxanthines in combination with gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*-Combination therapy against resistant bacteria // *J Pharmacopuncture*. Korean Pharmacopuncture Institute, 2016. Vol. 19, № 4. P. 312–318.
110. Rosenberg S. et al. Intravesical administration of green tea extract attenuates the inflammatory response of bacterial cystitis - A rat model // *BJU International*. 2014. Vol. 114, № 4. P. 601–607.

111. Fazliana M. et al. *Labisia pumila* var. *alata* reduces bacterial load by inducing uroepithelial cell apoptosis. // *J Ethnopharmacol.* Ireland, 2011. Vol. 136, № 1. P. 111–116.
112. Shabbir A. *Rhus coriaria* Linn, a plant of medicinal, nutritional and industrial importance: A review // *J Anim Plant Sci.* 2012. Vol. 22, № 2. P. 505–512.
113. Sakhr K., El Khatib S. Physiochemical properties and medicinal, nutritional and industrial applications of Lebanese Sumac (Syrian Sumac - *Rhus coriaria*): A review // *Heliyon.* Elsevier Ltd, 2020. Vol. 6, № 1. P. e03207.
114. Dziki D. et al. The fruits of sumac (*Rhus coriaria* L.) as a functional additive and salt replacement to wheat bread // *LWT.* Academic Press, 2021. Vol. 136. P. 110346.
115. Ravindran P.N., Pillai G.S., Divakaran M. Other herbs and spices: mango ginger to wasabi // *Handbook of Herbs and Spices.* Elsevier, 2012. Vol. 2. P. 557–582.
116. Reidel R.V.B. et al. Evolution of Volatile Emission in *Rhus coriaria* Organs During Different Stages of Growth and Evaluation of the Essential Oil Composition // *Chem Biodivers.* Wiley-VCH Verlag, 2017. Vol. 14, № 11. P. e1700270.
117. Tohma H. et al. Measurement of anticancer, antidiabetic and anticholinergic properties of sumac (*Rhus coriaria*): analysis of its phenolic compounds by LC–MS/MS // *Journal of Food Measurement and Characterization.* Springer Verlag, 2019. Vol. 13, № 2. P. 1607–1619.
118. Farag M.A., Fayek N.M., Abou Reidah I. Volatile profiling in *Rhus coriaria* fruit (sumac) from three different geographical origins and upon roasting as analyzed via solid-phase microextraction. // *PeerJ.* 2018. Vol. 6. P. e5121.
119. Shidfar F. et al. The effect of Sumac *Rhus coriaria* L. Powder on serum glycemic status, ApoB, ApoA-I and total antioxidant capacity in type 2 diabetic patients // *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2014. Vol. 13, № 4. P. 1249–1255.

120. Akbari-Fakhrabadi M. et al. Effect of sumac (*Rhus Coriaria*) on blood lipids: A systematic review and meta-analysis // *Complementary Therapies in Medicine*. Churchill Livingstone, 2018. Vol. 40. P. 8–12.
121. Mohammadi S. et al. Effect of Hydroalcoholic Leaves Extract of *Rhus Coriaria* on Pain in Male Rats // *Anesth Pain Med*. Kowsar Medical Publishing Company, 2016. Vol. 6, № 1. P. e32128.
122. Pourahmad J. et al. A search for hepatoprotective activity of aqueous extract of *Rhus coriaria* L. against oxidative stress cytotoxicity // *Food and Chemical Toxicology*. Pergamon, 2010. Vol. 48, № 3. P. 854–858.
123. Beretta G. et al. Anti-ischemic activity and endothelium-dependent vasorelaxant effect of hydrolysable tannins from the leaves of *Rhus coriaria* (Sumac) in isolated rabbit heart and thoracic aorta // *Planta Med*. 2009. Vol. 75, № 14. P. 1482–1488.
124. Ardalani H. et al. Identification and characterization of chemical composition of *Rhus coriaria* L. fruit from Hamadan, Western Iran // *Journal of Medicinal Herbs*. Islamic Azad University, Shahr-e-Quds Branch Islamic Azad University, ShahreKord Branch, 2016. Vol. 6, № 4. P. 195–198.
125. Elagbar Z.A. et al. Phytochemical Diversity and Pharmacological Properties of *Rhus coriaria* // *Chemistry and Biodiversity*. Wiley-VCH Verlag, 2020. Vol. 17, № 4. P. e1900561.
126. Akrayi H.F.S., Abdullrahman Z.F.A. Screening in Vitro and in Vivo the Antibacterial Activity of *Rhus Coriaria* Extract Against *S. Aureus* // *Ijrras*. 2013. Vol. 15, № 3. P. 390–397.
127. Gabr S.A., Alghadir A.H. Evaluation of the Biological Effects of Lyophilized Hydrophilic Extract of *Rhus coriaria* on Myeloperoxidase (MPO) Activity, Wound Healing, and Microbial Infections of Skin Wound Tissues // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Hindawi Limited, 2019. Vol. 2019. P. 1–14.

128. Mahdavi S. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Iranian Sumac (*Rhus coriaria* L.) Fruit Ethanolic Extract // *J Appl Microbiol Biochem. Scitechnol Biosoft Pvt. Ltd.*, 2018. Vol. 02, № 02. P. 5.
129. Cortés-Rojas D.F., de Souza C.R.F., Oliveira W.P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice // *Asian Pac J Trop Biomed. Asian Pacific Tropical Biomedicine Press*, 2014. Vol. 4, № 2. P. 90–96.
130. Pérez-Jiménez J. et al. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: An application of the Phenol-Explorer database // *Eur J Clin Nutr. Nature Publishing Group*, 2010. Vol. 64, № 3. P. 112–120.
131. El-Saber Batiha G. et al. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities // *Biomolecules. MDPI AG*, 2020. Vol. 10, № 2. P. 202.
132. Kamatou G.P., Vermaak I., Viljoen A.M. Eugenol - From the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule // *Molecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 2012. Vol. 17, № 6. P. 6953–6981.
133. Vicidomini C., Roviello V., Roviello G.N. Molecular Basis of the Therapeutical Potential of Clove (*Syzygium aromaticum* L.) and Clues to Its Anti-COVID-19 Utility // *Molecules. MDPI AG*, 2021. Vol. 26, № 7. P. 1880.
134. Han X., Parker T.L. Anti-inflammatory activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in human dermal fibroblasts // *Pharm Biol. Taylor and Francis Ltd*, 2017. Vol. 55, № 1. P. 1619–1622.
135. Reichling J. et al. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties - An overview // *Forsch Komplementarmed. Forsch Komplementmed*, 2009. Vol. 16, № 2. P. 79–90.
136. Fu Y.J. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination // *Phytotherapy Research. Phytother Res*, 2007. Vol. 21, № 10. P. 989–994.

137. Santoro G.F. et al. Trypanosoma cruzi: Activity of essential oils from Achillea millefolium L., Syzygium aromaticum L. and Ocimum basilicum L. on epimastigotes and trypomastigotes // Exp Parasitol. Academic Press, 2007. Vol. 116, № 3. P. 283–290.
138. Machado M. et al. Anti-Giardia activity of Syzygium aromaticum essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure // Exp Parasitol. Academic Press, 2011. Vol. 127, № 4. P. 732–739.
139. El-kady A.M. et al. Eugenol, a potential schistosomicidal agent with anti-inflammatory and antifibrotic effects against Schistosoma mansoni, induced liver pathology // Infect Drug Resist. Dove Medical Press Ltd., 2019. Vol. 12. P. 709–719.
140. Kumar K. et al. Recent Trends in Indian Traditional Herbs Syzygium Aromaticum and its Health Benefits // J Pharmacogn Phytochem. 2012. Vol. 1. P. 13–22.
141. Ahmad S. et al. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles - an ecofriendly approach // Int J Nanomedicine. Dove, 2019. Vol. 14. P. 5087–5107.
142. Garg D. et al. Synthesis of silver nanoparticles utilizing various biological systems: mechanisms and applications—a review // Prog Biomater. Springer Science and Business Media LLC, 2020. Vol. 9, № 3. P. 81–95.
143. Tyagi P.K. et al. Antifungal Effects of Silver Nanoparticles Against Various Plant Pathogenic Fungi and its Safety Evaluation on Drosophila melanogaster // Biointerface Res Appl Chem. AMG Transcend Association, 2020. Vol. 10, № 6. P. 6587–6596.
144. Jain A. et al. Multi dye degradation and antibacterial potential of Papaya leaf derived silver nanoparticles // Environ Nanotechnol Monit Manag. Elsevier B.V., 2020. Vol. 14. P. 100337.
145. Ivanova N. et al. Silver Nanoparticles as Multi-Functional Drug Delivery Systems // Nanomedicines / ed. Farrukh M.A. Rijeka: IntechOpen, 2018.

146. Anees Ahmad S. et al. Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review // Mater Sci Energy Technol. Elsevier BV, 2020. Vol. 3. P. 756–769.
147. Holladay R. et al. Silver/water, silver gels and silver-based compositions; and methods for making and using the same. Google Patents, 2005.
148. Feng Q.L. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* // J Biomed Mater Res. John Wiley & Sons Inc, 2000. Vol. 52, № 4. P. 662–668.
149. Gupta A., Silver S. Molecular Genetics: Silver as a biocide: Will resistance become a problem? // Nat Biotechnol. Nat Biotechnol, 1998. Vol. 16, № 10. P. 888–888.
150. Asghar M.A. et al. Synergistic Nanocomposites of Different Antibiotics Coupled with Green Synthesized Chitosan-Based Silver Nanoparticles: Characterization, Antibacterial, in vivo Toxicological and Biodistribution Studies // Int J Nanomedicine. Dove Medical Press Ltd, 2020. Vol. Volume 15. P. 7841–7859.
151. Rai M.K. et al. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria // Journal of Applied Microbiology. John Wiley & Sons, Ltd, 2012. Vol. 112, № 5. P. 841–852.
152. Tamayo L.A. et al. Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes* // Materials Science and Engineering: C. Elsevier BV, 2014. Vol. 40. P. 24–31.
153. Loo C.Y. et al. Combination of Silver Nanoparticles and Curcumin Nanoparticles for Enhanced Anti-biofilm Activities // J Agric Food Chem. American Chemical Society, 2016. Vol. 64, № 12. P. 2513–2522.
154. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 31st ed. CLSI supplement M100. // Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2021. 352 p.
155. Ayandele A. et al. Prevalence of Multi-Antibiotic Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* species obtained from a Tertiary Medical Institution in Oyo State, Nigeria // Qatar Med J. Hamad Medical Corporation, 2020. Vol. 2020, № 1. P. 9.

156. Basak S., Singh P., Rajurkar M. Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study // *J Pathog.* Hindawi Limited, 2016. Vol. 2016. P. 1–5.
157. Schoch C.L. et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools // *Database.* Oxford University Press, 2020. Vol. 2020. P. baaa062.
158. Kothari V., Gupta A., Naraniwal M. Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds // *Journal of Natural Remedies.* 2012. Vol. 12/2. P. 162–173.
159. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review // *J Pharm Anal.* Xi'an Jiaotong University, 2016. Vol. 6, № 2. P. 71–79.
160. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. // *Nat Protoc.* England, 2008. Vol. 3, № 2. P. 163–175.
161. Lara V.M. et al. Antimicrobial Susceptibility of Escherichia coli Strains Isolated from Alouatta spp. Feces to Essential Oils // *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016/05/30. Hindawi Publishing Corporation, 2016. Vol. 2016. P. 1643762.
162. Mouafo H.T. et al. In vitro antimicrobial activity of Millettia laurentii De Wild and Lophira alata Banks ex C. F. Gaertn on selected foodborne pathogens associated to gastroenteritis // *Heliyon.* Elsevier Ltd, 2021. Vol. 7, № 4. P. e06830.
163. Stærk K. et al. Uropathogenic Escherichia coli Express Type 1 Fimbriae Only in Surface Adherent Populations Under Physiological Growth Conditions // *Journal of Infectious Diseases.* Oxford University Press, 2016. Vol. 213, № 3. P. 386–394.
164. Evans D.J. et al. Hemagglutination typing of Escherichia coli: Definition of seven hemagglutination types // *J Clin Microbiol.* American Society for Microbiology (ASM), 1980. Vol. 12, № 2. P. 235–242.
165. Bellio P. et al. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay // *MethodsX.* Elsevier, 2021. Vol. 8. P. 101543.

166. Celenza G. et al. In vitro antimicrobial activity of pannarin alone and in combination with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates // *Phytomedicine*. Urban & Fischer, 2012. Vol. 19, № 7. P. 596–602.
167. Zheng S. et al. SynergyFinder Plus: Toward Better Interpretation and Annotation of Drug Combination Screening Datasets // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2022. Vol. 20, № 3. P. 587–596.
168. Huang J. et al. Antibacterial activity of *Artemisia asiatica* essential oil against some common respiratory infection causing bacterial strains and its mechanism of action in *Haemophilus influenzae* // *Microb Pathog*. Elsevier, 2018. Vol. 114. P. 470.
169. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // *Anal Biochem*. *Anal Biochem*, 1976. Vol. 72, № 1–2. P. 248–254.
170. Arsene M.M.J. et al. Prolonged Exposure to Antimicrobials Induces Changes in Susceptibility to Antibiotics, Biofilm Formation and Pathogenicity in *Staphylococcus aureus* // *J Pharm Res Int. Sciencedomain International*, 2021. P. 140–151.
171. Tharmalingam N. et al. Repurposing the anthelmintic drug niclosamide to combat *Helicobacter pylori* // *Sci Rep. Sci Rep*, 2018. Vol. 8, № 1.
172. Ballesteros-Monrreal M.G. et al. Virulence and Resistance Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Pregnant and Non-Pregnant Women from Two States in Mexico // *Infect Drug Resist*. Dove Press, 2020. Vol. 13. P. 295–310.
173. Gupta K., Scholes D., Stamm W.E. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women // *J Am Med Assoc*. American Medical Association, 1999. Vol. 281, № 8. P. 736–738.
174. Hart A. et al. Ampicillin-resistant *Escherichia coli* in gestational pyelonephritis: Increased occurrence and association with the colonization factor Dr adhesin // *Journal of Infectious Diseases*. Oxford Academic, 2001. Vol. 183, № 10. P. 1526–1529.

175. Greer L.G. et al. Ampicillin Resistance and Outcome Differences in Acute Antepartum Pyelonephritis // *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2008. Vol. 2008. P. 1–5.
176. Sáez-Llorens X., McCracken G.H. *Clinical Pharmacology of Antibacterial Agents // Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.* Elsevier, 2006. P. 1223–1267.
177. Osundiya O., Oladele R., Oduyebo O. Multiple Antibiotic Resistance (MAR) indices of *Pseudomonas* and *Klebsiella* species isolates in Lagos University Teaching Hospital // *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology. African Journals Online (AJOL)*, 2013. Vol. 14, № 3. P. 164–168.
178. Adenaike O. et al. Multidrug Resistance and Multiple Antibiotic Resistance Index of *Escherichia coli* Strains Isolated from Retailed Smoked Fish // *Journal of Natural Sciences Research. Online*, 2016. Vol. 6, № 9. P. 7–10.
179. Titilawo Y. et al. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of faecal contamination of water // *Environmental Science and Pollution Research. Springer Verlag*, 2015. Vol. 22, № 14. P. 10969–10980.
180. Baldiris-Avila R., Montes-Robledo A., Buelvas-Montes Y. Phylogenetic Classification, Biofilm-Forming Capacity, Virulence Factors, and Antimicrobial Resistance in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) // *Curr Microbiol. Springer*, 2020. Vol. 77, № 11. P. 3361–3370.
181. De Souza G.M. et al. Comparative study of genetic diversity, virulence genotype, biofilm formation and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from nosocomial and community acquired urinary tract infections // *Infect Drug Resist. Dove Medical Press Ltd.*, 2019. Vol. 12. P. 3595–3606.
182. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria // *Annual Review of Biochemistry. NIH Public Access*, 2009. Vol. 78. P. 119–146.
183. Zhong Z.X. et al. Nitrofurantoin Combined With Amikacin: A Promising Alternative Strategy for Combating MDR Uropathogenic *Escherichia coli* // *Front Cell Infect Microbiol. Frontiers Media S.A.*, 2020. Vol. 10. P. 811.

184. Hassuna N.A. et al. Molecular characterization of Extended-spectrum  $\beta$  lactamase-producing *E. coli* recovered from community-acquired urinary tract infections in Upper Egypt // *Sci Rep. Nature Research*, 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–8.
185. Vasudevan S. et al. Reciprocal Cooperation of Type A Procyanidin and Nitrofurantoin Against Multi-Drug Resistant (MDR) UPEC: A pH-Dependent Study // *Front Cell Infect Microbiol. Frontiers Media S.A.*, 2020. Vol. 10. P. 421.
186. Gonelimali F.D. et al. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms // *Front Microbiol. Frontiers Media S.A.*, 2018. Vol. 9. P. 1639.
187. Fazeli M.R. et al. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria // *Food Control*. 2007. Vol. 18, № 6. P. 646–649.
188. Nasar-Abbas S.M., Halkman A.K. Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens // *International Journal of Food Microbiology*. 2004. Vol. 97, № 1. P. 63–69.
189. Vahid-Dastjerdi E. et al. Effect of *Rhus coriaria* L. water extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. // *Iran J Microbiol. Tehran University of Medical Sciences*, 2014. Vol. 6, № 4. P. 269–275.
190. Zhaleh M. et al. Chemical Composition and Antibacterial Effects of Essential Oil of *Rhus coriaria* Fruits in the West of Iran (Kermanshah) // *Journal of Essential Oil-Bearing Plants. Har Krishan Bhalla and Sons*, 2018. Vol. 21, № 2. P. 493–501.
191. Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains // *Asian Pac J Trop Med*. No longer published by Elsevier, 2010. Vol. 3, № 4. P. 266–269.
192. Takó M. et al. Plant Phenolics and Phenolic-Enriched Extracts as Antimicrobial Agents against Food-Contaminating Microorganisms // *Antioxidants (Basel)*. MDPI, 2020. Vol. 9, № 2. P. 165.

193. Mandal S.M., Dias R.O., Franco O.L. Phenolic Compounds in Antimicrobial Therapy // *J Med Food*. *J Med Food*, 2017. Vol. 20, № 10. P. 1031–1038.
194. Oulkheir S. et al. Antibacterial Activity of Essential Oils Extracts from Cinnamon, Thyme, Clove and Geranium Against a Gram Negative and Gram Positive Pathogenic Bacteria // *Journal of Diseases and Medicinal Plants*. Special Issue: New Vistas of Research in Ayurveda System of Medicine. Science Publishing Group, 2017. Vol. 3, № 1. P. 1–5.
195. Revati S. et al. In vitro antibacterial activity of seven Indian spices against high level gentamicin resistant strains of enterococci // *Archives of Medical Science*. Poland, 2015. Vol. 11, № 4. P. 863–868.
196. Rosarior V.L. et al. Antioxidant-rich Clove Extract, A Strong Antimicrobial Agent against Urinary Tract Infections-causing Bacteria in vitro // *Trop Life Sci Res*. 2021. Vol. 32, № 2. P. 45–63.
197. SM M., RO D., OL F. Phenolic Compounds in Antimicrobial Therapy // *J Med Food*. *J Med Food*, 2017. Vol. 20, № 10. P. 1031–1038.
198. Mak K.-K. et al. A comprehensive review on eugenol's antimicrobial properties and industry applications: A transformation from ethnomedicine to industry // *Pharmacogn Rev*. 2019. Vol. 13, № 25. P. 1.
199. Bouarab-Chibane L. et al. Antibacterial Properties of Polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) Models // *Front Microbiol*. *Frontiers*, 2019. Vol. 10, № APR. P. 829.
200. Shelef L.A. Antimicrobial effects of spices // *J Food Saf*. John Wiley & Sons, Ltd, 1984. Vol. 6, № 1. P. 29–44.
201. Pham H. et al. Effect of Extraction Solvents and Drying Methods on the Physicochemical and Antioxidant Properties of *Helicteres hirsuta* Lour. Leaves // *Technologies* (Basel). MDPI AG, 2015. Vol. 3, № 4. P. 285–301.
202. Nizet V., Varki A., Aebi M. Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins // *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Chapter 37 p.

203. Mrázková J., Malinovská L., Wimmerová M. Microscopy examination of red blood and yeast cell agglutination induced by bacterial lectins // *PLoS One* / ed. Yu L.-G. Public Library of Science, 2019. Vol. 14, № 7. P. e0220318.
204. Kisiela D.I. et al. Evolutionary Analysis Points to Divergent Physiological Roles of Type 1 Fimbriae in *Salmonella* and *Escherichia coli* // *mBio* / ed. Mobley H., Schneewind O. 2013. Vol. 4, № 2. P. e00625-12.
205. Barbieri N. et al. FNR Regulates Expression of Important Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of Uropathogenic *Escherichia coli* // *Infect Immun.* 2014. Vol. 82.
206. Alp G. et al. The role of hemagglutination and effect of exopolysaccharide production on bifidobacteria adhesion to Caco-2 cells in vitro // *Microbiol Immunol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2010. Vol. 54, № 11. P. 658–665.
207. Hagberg L. et al. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections // *Infect Immun.* 1981. Vol. 31, № 2. P. 564–570.
208. HRV R., Devaki R., Kandi V. Comparison of Hemagglutination and Hemolytic Activity of Various Bacterial Clinical Isolates Against Different Human Blood Groups // *Cureus.* Cureus, Inc., 2016. Vol. 8, № 2. P. e489.
209. Shareef H.A., Abdulla E.T., Mostafa Z.N. Hemagglutination properties of some intestinal bacterial pathogens isolated from clinical samples // *Tikrit Journal of Pure Science.* Tikrit University, 2010. Vol. 15, № 3. P. 5–10.
210. Möllby R. et al. P-fimbriae of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: Detection in clinical material by a rapid receptor-specific agglutination test // *Infection.* Springer-Verlag, 1983. Vol. 11, № 1. P. 68–72.
211. Busch A., Phan G., Waksman G. Molecular mechanism of bacterial type 1 and P pili assembly // *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.* Royal Society of London, 2015. Vol. 373, № 2036. P. 20130153.

212. Mikcha J.M.G. et al. Hemagglutinating properties of *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolated from different sources // *Brazilian Journal of Microbiology*. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2004. Vol. 35, № 1–2. P. 54–58.
213. Dunne W.M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? // *Clin Microbiol Rev*. 2002. Vol. 15, № 2. P. 155–166.
214. Simo M. Recent Trends in Biofilm Science and Technology // *Recent Trends in Biofilm Science and Technology*. Elsevier, 2020.
215. Kırmusaoğlu S. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents // *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. IntechOpen, 2019.
216. Ruiz V. et al. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to polystyrene plates and epithelial cells and the antiadhesive potential of Albumin and Xylitol // *Pediatr Res*. 2011. Vol. 69, № 1. P. 23–27.
217. Khatoon Z. et al. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention // *Heliyon*. Elsevier Ltd, 2018. Vol. 4, № 12. P. 1067.
218. Amalaradjou M.A.R. et al. Antibiofilm Effect of Trans-Cinnamaldehyde on Uropathogenic *Escherichia coli* // *Journal of Urology*. 2010. Vol. 184, № 1. P. 358–363.
219. Rodríguez-Pérez C. et al. Antibacterial activity of isolated phenolic compounds from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) against *Escherichia coli*. // *Food Funct*. England, 2016. Vol. 7, № 3. P. 1564–1573.
220. Packiavathy I.A.S.V. et al. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa* // *Food Chem*. 2014. Vol. 148. P. 453–460.
221. Kacergius T. et al. Inhibitory capacity of *Rhus coriaria* L. extract and its major component methyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical profilometry: Potential applications for oral health // *Mol Med Rep*. Spandidos Publications, 2017. Vol. 16, № 1. P. 949–956.

222. Krasowska A., Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers, 2014. Vol. 4, № AUG. P. 112.
223. Szakiel A. et al. Antibacterial and antiparasitic activity of oleanolic acid and its glycosides isolated from marigold (*Calendula officinalis*) // *Planta Med*. Planta Med, 2008. Vol. 74, № 14. P. 1709–1715.
224. Kurek A. et al. Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes* // *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2010. Vol. 97, № 1. P. 61–68.
225. Dorota W., Marta K., Dorota T.-G. Effect of asiatic and ursolic acids on morphology, hydrophobicity, and adhesion of UPECs to uroepithelial cells. // *Folia Microbiol (Praha)*. 2013. Vol. 58, № 3. P. 245–252.
226. Buijs J. et al. Concentration-dependency of  $\beta$ -lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria // *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd, 2008. Vol. 14, № 4. P. 344–349.
227. Justice S.S. et al. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy // *Nat Rev Microbiol*. Nature Publishing Group, 2008. Vol. 6, № 2. P. 162–168.
228. Dörr T., Moynihan P.J., Mayer C. Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics // *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 10. P. 2051.
229. Sykes J.E. Cell wall-deficient bacterial infections // *Canine and Feline Infectious Diseases*. W.B. Saunders, 2013. P. 380–381.
230. Fabijan A. et al. L-form switching confers antibiotic, phage and stress tolerance in pathogenic *Escherichia coli* // *bioRxiv*. 2021. № 10. P. 2021.06.21.449206.
231. Kawai Y., Mickiewicz K., Errington J. Lysozyme Counteracts  $\beta$ -Lactam Antibiotics by Promoting the Emergence of L-Form Bacteria // *Cell*. Cell Press, 2018. Vol. 172, № 5. P. 1038-1049.e10.

232. Glover W.A., Yang Y., Zhang Y. Insights into the Molecular Basis of L-Form Formation and Survival in *Escherichia coli* // PLoS One. Public Library of Science, 2009. Vol. 4, № 10. P. 7316.
233. Chikada T. et al. Direct Observation of Conversion From Walled Cells to Wall-Deficient L-Form and Vice Versa in *Escherichia coli* Indicates the Essentiality of the Outer Membrane for Proliferation of L-Form Cells // Front Microbiol. Frontiers Media S.A., 2021. Vol. 12. P. 537.
234. Samoilova Z. et al. Medicinal plant extracts variously modulate susceptibility of *Escherichia coli* to different antibiotics // Microbiol Res. Urban & Fischer, 2014. Vol. 169, № 4. P. 307–313.
235. Sibanda T., Okoh A. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents // Afr J Biotechnol. 2010. Vol. 6, № 25. P. 2886–2896.
236. Anand U. et al. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery // Metabolites. MDPI AG, 2019. Vol. 9, № 11. P. 258.
237. Chu C.M., Lowder J.L. Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups // Am J Obstet Gynecol. Mosby Inc., 2018. Vol. 219, № 1. P. 40–51.
238. Uppala A., King E.A., Patel D. Cefazolin versus fluoroquinolones for the treatment of community-acquired urinary tract infections in hospitalized patients // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Springer Verlag, 2019. Vol. 38, № 8. P. 1533–1538.
239. Arsène M.M.J. et al. Antibacterial activity of grapefruit peel extracts and green-synthesized silver nanoparticles // Vet World. 2021. Vol. 14, № 5. P. 1330–1341.
240. Faleiro M.L., Miguel M.G. Use of Essential Oils and Their Components against Multidrug-Resistant Bacteria // Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components. Academic Press, 2013. P. 65–94.

241. Scorzoni L. et al. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds // *J Microbiol Methods*. Elsevier, 2016. Vol. 123. P. 68–78.
242. Segatore B. et al. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and  $\Delta E$  model methods // *Phytomedicine*. Urban & Fischer, 2012. Vol. 19, № 3–4. P. 341–347.
243. Xu X. et al. Synergistic combination of two antimicrobial agents closing each other's mutant selection windows to prevent antimicrobial resistance // *Sci Rep*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 8, № 1. P. 7237.
244. Chanda S., Rakholiya K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases // *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. 2011. P. 520–529.
245. Atteia H.G., Hussein E. In vitro antibacterial and synergistic effects of some plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* // *Journal of Antimicrobials*. 2014. Vol. 129. P. 338–346.
246. Arsene M.M.J., Viktorovna P.I., Davares A.K.L. *Galleria mellonella* (Greater wax moth) as an eco-friendly in vivo approach for the assessment of the acute toxicity of medicinal plants: Application to some plants from cameroon // *Open Vet J*. Faculty of Veterinary Medicine, University of Tripoli, 2021. Vol. 11, № 4. P. 651–661.
247. Gadaleta D. et al. SAR and QSAR modeling of a large collection of LD50 rat acute oral toxicity data // *J Cheminform*. BioMed Central, 2019. Vol. 11, № 1.
248. Conde-González J.E. et al. Adsorption of silver nanoparticles from aqueous solution on copper-based metal organic frameworks (HKUST-1) // *Chemosphere*. Pergamon, 2016. Vol. 150. P. 659–666.

249. Badi'ah H.I. et al. Synthesis of Silver Nanoparticles and the Development in Analysis Method // IOP Conf Ser Earth Environ Sci. 2019. Vol. 217, № 1. P. 012005.
250. Azizi S. et al. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Brown Marine Macroalga, Sargassum Muticum Aqueous Extract // Materials. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2013. Vol. 6, № 12. P. 5942.
251. Helmlinger J. et al. Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects // RSC Adv. The Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 6, № 22. P. 18490–18501.