

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ БИОПЛЕНОК *S. AUREUS* РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Бирюкова Н.В.¹, Овсянников А.Г.¹, Аношкина Е.В.¹, Агниуллини А.Я.¹

¹Ресурсный центр «Медицинский Сеченовский прединститут», Москва, e-mail: a.a.lacerta@internet.ru

Настоящая статья посвящена изучению патогенных свойств *Staphylococcus aureus* и поиску фармацевтических средств предотвращения его развития. *Staphylococcus aureus* – грамположительная патогенная бактерия, возбудитель заболеваний различной тяжести и летальности. Микроорганизм имеет широкое распространение, обладает высокой вирулентностью, может долгое время паразитировать бессимптомно и нередко способен образовывать биопленку, которая благодаря сложной молекулярной регуляции легко формирует устойчивость к лекарственным средствам, в том числе к антибиотикам. Регулярное повышение доз препаратов для преодоления резистентности *S. aureus* может представлять большую опасность для жизни пациента, поэтому в медицине растет потребность поиска новых соединений, к которым биопленка окажется уязвима. В качестве источника наименее токсичных целевых веществ в статье рассмотрены растения. В связи с вышеизложенным проведен анализ 96 научных статей с ресурсов PubMed и «Киберленинка» за последние десятилетия, из которых 45 статей вошли в настоящее исследование. Как показали научные данные, компоненты растительных экстрактов, такие как алоэ-эмодин, карвакрол, тимол и другие, а также продукт ферментации DIM проявили свою действенность против незрелых биопленок. Мы предполагаем, что на основе подобных соединений будет возможна разработка профилактических и полноценных лекарственных средств против бесплечных инфекций *S. aureus* в дальнейшем. Поскольку метаболизм патогена на сегодняшний день изучен недостаточно, поиск мишеней против него остается сложной задачей.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, антибиотики, резистентность к антибиотикам, растительные соединения, карвакрол, алоэ-эмодин, тимол.

PROSPECTIVE *S.AUREUS* BIOFILM INHIBITORS OF PLANT ORIGIN

Biryukova N.V.¹, Ovsyannikov A.G.¹, Anoshkina E.V.¹, Agniullina A.Ya.¹

¹Resource Medical Center Sechenov Pre-University, Moscow, e-mail: a.a.lacerta@internet.ru

This article is devoted to the study of the pathogenic properties of *Staphylococcus aureus* and the search for pharmaceutical means to prevent its development. *Staphylococcus aureus* is a Gram-positive pathogenic bacterium, the causative agent of diseases of varying severity and mortality. The microorganism is widespread, highly virulent, can parasitize asymptotically for a long time and is often capable of forming a biofilm, which, due to complex molecular regulation, easily forms resistance to drugs, including antibiotics. Regularly increasing doses of drugs to overcome *S. aureus* resistance can pose a great danger to the patient's life, so in medicine there is a growing need to search for new compounds to which the biofilm will be vulnerable. The article considers plants as a source of the least toxic target substances. In connection with the above, an analysis of 96 scientific articles from PubMed and Cyberleninka resources over the past decades was carried out, of which 45 articles were included in this study. Scientific data has shown that components of plant extracts, such as aloe-emodin, carvacrol, thymol and others, as well as the fermentation product DIM, have been effective against immature biofilms. We assume that on the basis of such compounds it will be possible to develop preventive and complete drugs against membrane-free *S. aureus* infections in the future. Since the metabolism of the pathogen has not been sufficiently studied to date, the search for targets against it remains a challenge.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, antibiotics, antibiotic resistance, plant compounds, carvacrol, aloe-emodin, thymol.

Staphylococcus aureus – грамположительная патогенная бактерия, возбудитель заболеваний различной тяжести и летальности. Патоген отличается живучестью, вирулентностью и антибиотикорезистентностью многих штаммов. В связи с этим вызываемые им заболевания характеризуются заразностью, осложнениями, рецидивами и варьируются по тяжести течения и летальности.

Проникновение патогена в организм может произойти с кожных покровов, с пищевыми продуктами, с медицинских приборов и при вдыхе зараженных частиц слюны или носовой слизи. Риск возникновения инфекции повышен у бессимптомных носителей, составляющих 30% населения.

После попадания в организменную среду патоген разделяется на две формы существования: планктонную, провоцирующую абсцесс, и биопленочную. Биопленочная инфекция опасна скрытостью течения, высокой устойчивостью к иммунному ответу и лекарственным препаратам. Помимо того, в конце своего поэтапного развития на стадии рассеивания биопленка выпускает планктонные клетки, среди которых могут оказаться персистеры – почти невосприимчивые к антибиотику и иным агрессивным факторам среды бактерии.

Биопленка состоит из бактериальных клеток, скрепленных внеклеточным матриксом. Эта структура регулируется множеством каскадов реакций и белков, механизмы работы и роль которых до сих пор малоисследованы.

Несмотря на это, потребность медицины в ингибиторах роста биопленки возрастает, что связано с быстрой адаптацией *S. aureus* к антибиотикам. Поиск веществ с нужным эффектом ведется по многим направлениям, одним из которых являются растения.

По результатам обзора в данной статье исследований возможно констатировать, что растительные соединения потенциально могут быть использованы в борьбе с *S. aureus*. Эффективность натуральных веществ возможно увеличить, скомбинировав их с антибиотиками или модифицировав саму молекулу, что является дополнительным планом исследований на просторах изучения биопленки *S. aureus*.

Цель исследования: изучение оценки эффективности ингибирующего действия веществ растительного происхождения на биопленку *S. aureus*.

Материалы и методы исследования. Был проведен обзор научных статей по теме за последние 20 лет. Источники избирались из информационных баз «Киберленинка» и преимущественно PubMed. Отбор материала производился в зависимости от актуальности, грамотности употребления авторами источников и рейтинга публикуемых журналов.

Результаты исследования и их обсуждение. *Staphylococcus aureus* – это грамположительная патогенная бактерия, отличающаяся повсеместностью распространения, многочисленностью резистентных штаммов и разнообразием вызываемых ею заболеваний. Возбудитель может поразить все системы человеческого организма [1-3] и является основной причиной внутрибольничных бактериемий [4] и послехирургических инфекций [5].

Заболевания разнятся по тяжести и летальности. Ранее проводилось исследование, показавшее, что число зафиксированных смертельных исходов от бактериемии, вызванной

S. aureus, выше, чем от СПИДа, туберкулеза и вирусного гепатита в совокупности [6]. Во многих случаях даже после выздоровления пациенты оставались с осложнениями, а вероятность рецидива оценивалась в 5-10% [7].

Проникновение патогена в организм может произойти с кожных покровов, с пищевыми продуктами, посредством медицинских приборов и при вдыхе зараженных частиц слюны или носовой слизи.

Опасным, но распространенным явлением является бессимптомное носительство. Количество бессимптомных носителей составляет около 30% населения. *S. aureus* может колонизировать зоны носа, подмышек и паха [8]. Бессимптомное носительство опасно высоким риском поражения организма. При ослаблении иммунитета *S. aureus* проникает во внутреннюю среду носителя, начиная патогенный процесс.

При употреблении зараженной пищи в организм попадают стафилококковые энтеротоксины (SEs), отличающиеся устойчивостью к кишечным сокам. Даже в низких дозах SEs вызывает рвоту и стимулирует Т-клетки на нерегулируемый иммунный ответ [9].

Заражение *S. aureus* возможно с поверхностей медицинских приборов. Попадая в организм на катетерах или имплантах, патоген быстро образует биопленку [10].

После проникновения во внутренние ткани *S. aureus* синтезирует ряд адгезивных белков. Эти белки связываются с пептидогликаном с помощью сортазы А, закрепляя патоген на поверхности клеток хозяина [11]. Наконец, *S. aureus* образует инкапсулированный абсцесс или очаг распространения биопленки.

Как и многие бактериальные агенты, *S. aureus* может образовывать колонии из планктонных клеток и в составе биопленки. Биопленка состоит из единичных клеток возбудителя, крепко скрепленных внеклеточным матриксом. Преимущества этой формы существования колонии над планктонной формой заключаются в разнообразных механизмах уклонения от внешних воздействий, таких как нейтрофилы или антибиотик, и эффективном распространении по организму-хозяину.

S. aureus обостряет проблему распространения резистентных инфекций. Его высокая устойчивость к препаратам обуславливается свойствами патогена и плотностью биоплёночного матрикса [5]. Обработка неправильно подобранным антибиотиком может способствовать уничтожению клеток с поверхности колонии, но не достигнет глубоких слоев, что повлечёт появление резистентности штамма и осложнения заболевания. Были зафиксированы случаи, когда для уничтожения бактерий в биопленке требовалось превышение дозы лекарств в 10-1000 раз [12].

Плотность клеток в биопленке определяет работу чувства кворума (система Agr), от которого зависит ее рост и регуляция колонии. Система Agr является каскадом реакций и

влияет на экспрессию белков, отвечающих за процессы воспаления [13], и ферментов, поддерживающих целостность пленки. Их соотношение в матриксе не постоянно и изменяется на каждом этапе развития колонии [14].

Первый этап – **прикрепление**. Планктонная клетка *S. aureus* адгезируется с подходящим субстратом (такой основой могут быть ткани организма-хозяина) и начинает деление, синтезируя первые компоненты внеклеточного матрикса.

Второй этап - **исход**. Под влиянием внутренних факторов внеклеточный матрикс частично расщепляется, выпуская часть бактериальных клеток в окружающую среду.

В течение третьего этапа – **созревания** - биопленка наращивает массу и оформляется в грибовидную структуру.

Наконец четвертый этап – **распространение**. Дошедшая до пика развития биопленка разрушает внеклеточный матрикс, выпуская планктон, среди которого возможны «персистеры» - спящие клетки. В сравнении с большей частью бактериальных клеток они почти нечувствительны к антибиотикам. В дальнейшем персистер оседает на новом субстрате, начав рецидив инфекции [15].

Для медицины особый интерес представляют начальные стадии биопленочного развития, так как на первых этапах будущая биопленка наиболее восприимчива к воздействию препаратов.

S. aureus может адгезироваться с органическими и неорганическими субстратами и материалами. Наиболее часто обсеменяются поверхности из нержавеющей стали [16], поверхности контактных линз, мочевыводящих и венозных катетеров, эндотрахеальных трубок, механических клапанов сердца, кардиостимуляторов и протезов суставов [17]. Прикрепление патогена происходит с помощью гидрофобных взаимодействий и адгезивных поверхностных белков – CWA [18]. Они и другие вещества, помогающие в адгезии и развитии патогенного процесса, являются потенциальными мишенями для атаки лекарственных средств.

- Межклеточный адгезин (PIA), он же поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG) – главный полисахарид внеклеточного матрикса. Это основной образующий компонент биопленки, скрепляющий ее структуру и обеспечивающий выживаемость при воздействии антимикробных пептидов и иммунного ответа. Регуляция PIA осуществляется локусом генов *icaABCD*.

Клетка синтезирует предшественник PIA белками, кодируемыми генами *icaA* (N-актеилглюкозаминтрансфераза) и *icaD* (PIA-деацетилаза). Образовавшееся соединение транспортируется белком гена *icaC* к мембранному белку гена *icaB*, который лишает молекулу

заряда. Далее готовый PIA закрепляется на поверхности патогена в толще пептидогликана. Репрессором локуса является ген *icaR* [19].

- Тейхоевые кислоты (WTA) и липотейхоевые кислоты (LTA) - анионные гликополимеры пептидогликана грамположительных бактерий, в том числе *S. aureus*. LTA закрепляются в толще липидного бислоя цитоплазматической мембраны, WTA ковалентно связываются с клеточной стенкой. Так, локализуясь, они становятся самыми доступными мишенями для иммунной системы и бактерицидных средств [20].

- Внеклеточная ДНК (эДНК) - ДНК, содержащаяся во внеклеточном матриксе биопленки. Она совместно с PIA участвует в закреплении биопленки на субстрате и скреплении ее. эДНК продуцируется путем аутолиза клеток в колонии. Смерть клетки наступает в результате опосредованной активности муреингидролаз, кодируемых генами *atl* и *lytM*. При повышенной экспрессии данных оперонов активируется система генов *cidABC* и *lrgAB* (о них ниже), которые являются непосредственно инициатором и репрессором аутолиза соответственно [21]. При частичном разрушении биопленки эДНК подвергается ферментированию двумя нуклеазами - Nuc1 и Nuc2 [22].

- α -гемолизин (Hla) – он же α -токсин - белок вирулентности *S. aureus*, выполняющий важную функцию в процессе инвазии и патогенеза инфекций мягких тканей, пневмоний, перинеальных инфекций и сепсиса [23].

- PSM - семейство поверхностных пептидов с разнообразными функциями. К ним принадлежащие белки являются важными составляющими вирулентности биопленки, поддерживают форму колонии, задавая грибовидную форму, и участвуют в механизмах защиты от иммунного ответа, цитолизируя нейтрофилы. Семейство представлено PSM α , PSM β и δ -токсином, кодированными оперонами *psm α* , *psm β* и *hld* соответственно. На данный момент работа PSM изучена плохо, его биологические функции не ясны, однако известно, что эти пептиды вносят значительный вклад в развитие инфекций кожных покровов, легких и сердечно-сосудистой системы [22; 24].

- Rbf – фермент, предположительно стимулирует или ингибирует транскрипцию других белков. Механизм активности не известен, биологическая роль также плохо исследована. Известно, что он способствует формированию внеклеточного матрикса и биопленки: увеличивает продукцию PIA, репрессируя *icaR*, подавляет экспрессию *hla* и *psm α* , блокирует системы лизиса и гемолитическую активность клетки-возбудителя [25].

- Белок A (SpA) – важный белок для вирулентности *S. aureus*. Он помогает уклоняться клетке возбудителя от иммунного ответа и подавлять воспалительные процессы [26].

- *dltABCD* – оперон, необходимая составляющая для вирулентности *S. aureus*. Он связывает положительно заряженный аланин с тейхоевыми кислотами и липидами бактериальной стенки, благодаря чему клетки патогена становятся устойчивы к катионным антимикробным пептидам [27].

- *FnbA* и *FnbB* - адгезивные белки, необходимые для прикрепления к субстрату. Важный компонент вирулентности *S. aureus* [5].

- *SarA* – белок, главным образом регулятор экспрессии гена *fnb*. Связываясь с промоторами, он контролирует вирулентность, воздействуя на опероны (*hla*, *sra*, *sna*, *var*, *ica*, *fnbA* и т.д.) и активность регуляторных систем (генов *agr*, *sarS* и *sarV* и т.д.). Факторы среды, стимулирующие экспрессию пептида, неизвестны, поэтому мы плохо представляем его функции в биопленке [28].

- Аутоиндуцирующий пептид (AIP) – белок, регулирующий разрушение внеклеточного матрикса. Со временем накапливается в биопленке. По достижении определенной концентрации стимулирует *Agg* в клетках активировать разрушающие биопленку компоненты. Скрепляющие матрикс связи расщепляются протеазами, нуклеазами и PSM, и возбудитель разносится по организму [29].

- *cidABC* и *lrgAB* – гены холин-антихолиновой системы, также известные как опероны-координаторы лизиса структурных клеток биопленки. В результате их экспрессии клетка «вытекает», и в межклеточный матрикс попадает ДНК, которая после преобразований становится эДНК – важным образующим звеном, способствующим адгезии и образованию биопленки.

- *cidABC* – оперон, ответственный за образование пор и ферментации пирувата в ацетат в процессе метаболизма. Его экспрессия контролируется регулированием активности муреингидролаз клеточный аутолиз. Индукция *cidABC* зависит от *Agg*. В качестве силы-противодействия выступает оперон *lrgAB*.

- *lrgAB* – оперон, подавляющий активность ферментов *cidABC*. Изучен плохо, требуются дополнительные исследования для прояснения его биологической роли. Предполагается, что *lrgAB* участвует в образовании пор *CidA* и транспортирует пируват.

- *CidA* и *LrgA*, белки оперонов *cidA* и *lrgA* соответственно, олигомеризуются в бактериальной мембране, образуя пору. Дальнейший детальный процесс клеточной гибели и иных механизмов не известен, однако возможно предположить, что совместная активность *CidA* и *LrgA* влияет на деполяризацию мембраны и нарушение протонной движущей силы. Это приводит к локальному увеличению pH, в результате чего активируются муреингидролазы и происходит лизис [30]. Также наблюдения показали, что образовавшийся

олигомер может участвовать в системе мембранного транспорта пирувата, однако достоверных подтверждений этой гипотезы пока нет.

- Функции CidB и LrgB неизвестны.
- cidC опосредует ферментацию пирувата до ацетата. Без должной регуляции активность белка может привести к окислению цитоплазмы бактериальной клетки и ее смерти, как следствие [31].
- nuc1 и nuc2 – опероны нуклеаз эДНК. Их механизмы действия до сих пор плохо изучены.
- Ген nuc1 индуцируется чаще всего при высокой плотности клеток *S. aureus*, участвует в механизмах уклонения от иммунного ответа, а при подавлении увеличивает развитие биопленки.
- Ген nuc2 индуцируется чаще всего при низкой плотности клеток, способствует накоплению эДНК и, закономерно, уплотнению внеклеточного матрикса.

Регуляция оперонов происходит в ходе неизвестного механизма при косвенном влиянии чувства кворума – Agr. Интересно, что экспрессия nuc1 и nuc2 усиливается на периферии биоплёночной культуры *in vitro*, что требует изучения пространственной регуляции этих и других генов *S. aureus*.

Крайне примечательным моментом также является то, что при определенных условиях действие антибиотика, влияющего на активность оперонов nuc, может привести к усиленному росту биопленки. Так, цефтриаксон, который, по-видимому, подавляет экспрессию nuc1, увеличивал образование биопленки при воздействии на резистентный к нему штамм MRSA [32].

Биопленка *S. aureus* – это сложно организованная структура, являющаяся причиной заболеваний и их рецидивов. Данная форма существования колонии отличается эффективностью распространения бактериальных клеток, защищенностью от иммунной системы и высокой устойчивостью к антибиотикам. Несмотря на множество проведенных исследований, наука до сих пор имеет весьма размытое представление о ее регуляции, строении и работе компонентов.

На данный момент поиск новых соединений, эффективных против биопленки *S. aureus*, ведется в различных направлениях, в том числе из растительных источников. Фармацевтическая значимость растений не вызывает сомнений, и меж тем науке остаются неизвестны многие полезные вещества, продуцируемые ими.

Ранее проводимые исследования показали, что хиноны, терпеноиды и флавоноиды воздействовали преимущественно на клеточную стенку *S. aureus*, алкалоиды также и на ДНК,

полифенолы и дубильные вещества - на активность ферментов и образовывали комплексы с металлами [33].

В данной статье проведен обзор на ряд, по мнению авторов, перспективных ингибиторов роста биопленки *S. aureus*, заслуживающих внимания.

- Вещества из растительных экстрактов. У масел растений *Eucalyptus globulus* [34], *Melaleuca alternifolia* [35], *Curcuma longa*, *Curcuma aromatica* и *Curcuma angustifolia* [36] был обнаружен антибиопленочный эффект. Значит, в их составе имеются соединения, способные ингибировать рост биопленки, что создает интерес для медицинской науки.

Рассмотрение цельных растительных масел как лекарственного средства не так важно, как выделение действующих веществ из них. Химическое строение сока каждого из перечисленных растений еще предстоит изучить.

- Алоэ-эмодин (АЭ) – антрахинон, одно из известнейших растительных веществ. Проводились исследования таких его свойств, как, например, эффективность против онкологических заболеваний [37] и инфекционных поражений [38], но главное, было рассмотрено влияние АЭ на рост и развитие биопленки *S. aureus*.

Целевой эффект отрицательно коррелировал с возрастом биопленки, но даже так были получены впечатляющие результаты. Концентрация АЭ для исследования составила 128 мкг/мл. Биопленка возрастом 0 ч после обработки замедляла свой рост на 90%, биопленка возрастом 1 ч – на 65% и т.д. Полная устойчивость к обработке наблюдалась у образцов после 12 часов инкубации, то есть созревшая биопленка становилась неуязвимой к АЭ.

Авторы исследований предполагают, что столь высокие результаты обусловлены активностью АЭ в отношении CWA и процесса их адгезии с субстратом. То есть соединение препятствует прикреплению патогена к поверхности.

Также крайне интересным наблюдением являются зафиксированные в обработанной биопленке изменения внеклеточного матрикса. Помимо уменьшения концентраций скрепляющих структуру компонентов - эДНК, PIA и некоторых белков – замечены дозозависимые нарушения в олигомеризации α -токсина, а также снижение активности ряда оперонов: *dltB*, *icaA*, *SarA*, *agrA*, *SortaseA*, *cidA*, *dltS*. Вопрос о том, как АЭ спровоцировал эти изменения, остается открытым и требует дальнейших исследований [39].

- Ализарин (Ал), эмодин (Э), пурпурин (П) и хинализарин [40] – родственные АЭ антрахиноны. Каждый из них показал в отношении биопленки, возрастом 0 ч, ингибирующий эффект $\geq 70\%$ при концентрации 10 мкг/мл. Но из трех представленных веществ Ал дал наиболее интересные результаты. Обработка им замедлила рост молодой биопленки на $\geq 80\%$, а при удвоении дозировки он полностью устранил гемолитическую активность. При этом достижение данных результатов не было производным его бактерицидного действия, так как

МИК Ал в десять раз больше исследуемых доз. Это подтвердило способность ализарина нарушать метаболические процессы патогена.

Возможно, антибиопленочный эффект Ал обусловлен его способностью связываться в комплекс с Ca^{2+} , что нарушает поступление иона в строящийся внеклеточный матрикс, а также наличие двух гидроксильных групп, что является обязательным признаком антрахинона с антибиопленочной активностью.

Помимо препятствования поступления ионов, обработка ализарином повлекла изменение экспрессии некоторых генов. Частично нарушилась экспрессия *agrA*, *nuc1* и *nuc2* и полностью прекратилась у *rsmA*, *gbf* и *sra*. Активность *hla*, кодирующего α -токсин, снизилась в 9 раз. Наконец, замечены изменения в экспрессии оперонов *cid* и *lrg*, где Ал стимулировал индукцию *cidB* в ≥ 13 раз и подавил *lrgAB*.

Какие конкретно метаболиты подверглись действию Ал – неизвестно, что требует дальнейших исследований.

- 3,3'-дииндолилметан (DIM) [16] – это производное индола, продукт пищеварительной ферментации индол-3-карбинола, вещества, содержащегося в овощах. Эффективность DIM отрицательно коррелировала с возрастом биопленки. При концентрации 62,5 мкмоль/л DIM снижал рост молодой биопленки на 90%, ее биомассу на 97% и толщину на 58%. Также уменьшилось содержание эДНК, составив 69%.

Антибиопленочный механизм действия DIM, а также изменения во внеклеточном матриксе биопленки после обработки остаются неизвестными.

- Тимол – монотерпен, один из наиболее обещающих соединений своего класса. В концентрации 150 мкг/мл он воспрепятствовал развитию биопленки на 62-65%. Тимол оказался менее эффективен, чем вещества, описанные выше, но в отличие от них его антибиопленочный механизм изучен лучше. Понимание причинно-следственной связи в воздействии соединения на метаболизм биопленки делает вещество управляемым и проясняет понимание строения клетки *S. aureus*.

Тимол повреждает бактериальную мембрану и проникает в цитозоль, где связывается с белками-мишенями, что приводит клетку к гибели. В итоге это соединение разрушает непосредственно структурирующие биопленку патогенные единицы, т.е. оказывает бактерицидное действие, которое, что удивительно, усиливается благодаря внеклеточному матриксу.

Чтобы нарушить целостность бактериальной мембраны, гидрофобный тимол связывается с жирными кислотами. После обработки у клеток *S. aureus* были зафиксированы изменения в концентрации ЖК с разветвлённой цепью, снизившейся с 59,1% до 29,9%, и

прямой, возросшей с 39,6% до 68,5%. Разрушая липиды, тимол образует бреши и проникает внутрь [41].

Мишенями для тимола предположительно являются некоторые компоненты биосинтеза двух поверхностных ферментов - NOX2 [41] и Iols [42]. В присутствии рассматриваемого монотерпена экспрессия их оперонов увеличивается вследствие неизвестных факторов. Функции NOX2 и Iols не исследованы, но включают окисление NADPH, поэтому, когда тимол нарушает их активность, клетка деполяризуется, т.е. умирает.

Интересно, что при добавлении NADPH в суспензию обработанной тимолом биопленки выживаемость бактериальных клеток увеличилась незначительно, что сообщает либо о нанесении тимолом фатальных повреждений, либо о нарушении систем нормализации гомеостаза в патогене.

Также нельзя не упомянуть, что тимол влияет на бактериальную ДНК, каким-то образом деформируя ее, а удаление гена Iols делает клетку устойчивой к разрушительному действию монотерпена [41; 42].

- Комбинация тимола и берберины – сочетание монотерпена и алкалоида в концентрациях 64 и 32 мкг/мл соответственно. В результате воздействия на биопленку *S. aureus* возрастом 0 ч ее рост почти полностью останавливался.

После обработки поверхность некоторых клеток была шершавой или сморщенной. Берберин, дополняя действие тимола, создал нарушения в некоторых трансмембранных белках-транспортерах и разрушил липосахариды в стенке бактерии, сделав последнюю менее восприимчивой к агрессивной среде. Проникнув, комбинация снижала экспрессию CWA, оперонов *hla*, *SEs*, *dltABC* и, особенно заметно, транспортных ферментов, транспортеров катионов калия и двухвалентного железа. Тимол подавлял активность АТФ-синтаз. Но присутствие соединений в среде спровоцировало удвоенную экспрессию генов, кодирующих белки бактериальной капсулы.

Молекулярные механизмы, обеспечивающие действия тимола и берберины против *S. aureus*, остаются плохо изученными. Как показало рассматриваемое исследование, эти соединения являются перспективным средством против биопленочной инфекции, и влияние их присутствия в кровотоке живых организмов требует дальнейшего рассмотрения [43].

- Комбинация галловой кислоты (Г), карвакрола (Ка) и куркумина (Ку) – сочетание органической кислоты, монотерпена и куркуминоида в концентрациях 2,5, 0,128 и 0,064 мг/мл соответственно. Смесь показала высокую эффективность и полностью ингибировала рост незрелой биопленки.

Весьма показательными были результаты обработки зрелой биопленки каждым компонентом по отдельности. Галловая кислота в концентрации 5 мг/мл подавляла рост на 2

log. Карвакрол в концентрации 0,5 мг/мл показал сильное ингибирующее действие, а при 5 мг/мл полное уничтожение биопленки. Обработка Ку в концентрации 0,25 или 0,5 мг/мл приводила к снижению бактериальной массы на 0,5 log [44].

Изменения внеклеточного матрикса в исследовании не фиксировались. Выяснение ингибирующих механизмов каждого из компонентов смеси требует дальнейших исследований.

- Комбинация карвакрола, тимола и низина – сочетание монотерпенов и антибиотика. В концентрациях 400, 300 и 60 мкг/мл соответственно смесь снизила бактериальную массу на 4,98 log КОЕ/мл в сравнении с контролем. В исследовании также проводилось рассмотрение парных комбинаций этих трех веществ. Из них наиболее эффективным стало сочетание низина и тимола в концентрациях 60 и 300 мкг/мл соответственно, продемонстрировавшее снижение бактериальной массы биопленки на 3,52 log КОЕ/мл.

Вспомогательное действие растительных веществ заключается в том, что тимол и карвакрол, являясь монотерпенами, оказывают разрушающий эффект непосредственно на клетки возбудителя. Они перфорируют бактериальную мембрану, что позволяет соединениям проникнуть в цитозоль и нарушить клеточный метаболизм. После смерти поврежденная клетка выпускает ионы, фатально изменяющие pH матрикса. Это изменение усиливает действие монотерпенов по всей биопленке, частично уничтожая ее [45].

Выводы

1. *Staphylococcus aureus* - это патоген, представляющий опасность здоровью населения повсеместностью распространения, разнообразными способами проникновения в организм человека, многочисленностью резистентных штаммов, а также способностью образовывать биопленку. Биопленочные инфекции трудны в лечении и имеют риск рецидива. Поиск эффективных препаратов против них ведется во многих направлениях, включая растительные источники.

2. В литературных источниках обозначены интересные особенности биопленки, расширяющие ее возможности как патогена. Биопленка состоит из клеток патогена и их скрепляющего внеклеточного матрикса. Ее регуляция осуществляется главным образом чувством кворума (система Agr). Рост биопленки состоит из четырех стадий, за которые планктонная клетка *S. aureus* адгезируется с субстратом с помощью CWA (среди них FnbA и FnbB), делится, выделяет компоненты биопленки. Плотность биопленочного матрикса зависит от PIA, AIP, PSM, nuc1 и эДНК, получаемой путем аутолиза. Аутолиз контролируется концентрацией AIP и активностями оперонов cidABC и lrgAB. Все это свидетельствует о сложных молекулярно-генетических механизмах патогенеза, вызываемых данным патогеном.

3. Исследования антибиопленочных свойств растительных соединений показали большую перспективность антрахинонов, монотерпенов, DIM, а также их некоторых комбинаций. Практически во всех случаях ингибирующий эффект средств коррелирует со зрелостью биопленки.

4. Информации об изменениях активности эДНК и других компонентов биопленки недостаточно для понимания механизмов действия данных веществ, но данные, сообщающие об изменении клеточной массы биопленки после обработки, показывают их эффективность. Для выявления новых целевых веществ требуется продолжать исследования в данном направлении.

Таким образом, анализ литературы показал, что исследования, касающиеся вопросов свойств и развития *Staphylococcus aureus* и его биопленки, являются весьма актуальными и значимыми, т.к. с каждым годом в человеческих популяциях усиливаются риски заражения этим патогеном с последующим осложнением и параллельно расширяется список антибиотиков, к которым вырабатывается достаточно устойчивая резистентность. В этой связи особый интерес представляют молекулярные и клеточные механизмы действия данного микроорганизма, изучение которых важно для поиска и получения эффективных фармацевтических средств, позволяющих предотвратить развитие и распространение инфекции.

Список литературы

1. Parlet C.P., Brown M.M., Horswill A.R. Commensal Staphylococci Influence Staphylococcus aureus Skin Colonization and Disease // Trends Microbiol. 2019. Vol. 27. Is. 6. P. 497-507. DOI: 10.1016/j.tim.2019.01.008.
2. Liesenborghs L., Meyers S., Vanassche T., Verhamme P. Coagulation: At the heart of infective endocarditis // J. Thromb Haemost. 2020. Vol. 18. Is. 5. P. 995-1008. DOI: 10.1111/jth.14736.
3. Urish K.L., Cassat J.E. Staphylococcus aureus Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery // Infect Immun. 2020. Vol. 88. Is. 7. P. e00932-19. DOI: 10.1128/IAI.00932-19.
4. van Hal S.J., Jensen S.O., Vaska V.L., Espedido B.A., Paterson D.L., Gosbell I.B. Predictors of mortality in Staphylococcus aureus Bacteremia // Clin Microbiol Rev. 2012. Vol. 25. Is. 2. P. 362-386. DOI: 10.1128/CMR.05022-11.
5. Cheung G.Y.C., Bae J.S. Otto M. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus // Virulence. 2021. Vol. 12. Is. 1. P. 547-569. DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688.

6. Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J., et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States // *JAMA*. 2007. Vol. 298. Is. 15. P. 1763-1771. DOI: 10.1001/jama.298.15.1763.
7. Kwiecinski J.M., Horswill A.R. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms // *Curr Opin Microbiol*. 2020. Vol. 53. P. 51-60. DOI: 10.1016/j.mib.2020.02.005.
8. Sakr A., Brégeon F., Mège J.L., Rolain J.M., Blin O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections // *Front Microbiol*. 2018. Vol. 9. P. 2419. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02419.
9. Chen H., Zhang J., He Y., et al. Exploring the Role of *Staphylococcus aureus* in Inflammatory Diseases // *Toxins (Basel)*. 2022. Vol. 14. Is. 7. P. 464. DOI: 10.3390/toxins14070464.
10. Tong S.Y., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G. Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management // *Clin Microbiol Rev*. 2015. Vol. 28. Is. 3. P. 603-661. DOI: 10.1128/CMR.00134-14.
11. Foster T.J. The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci // *Trends Microbiol*. 2019. Vol. 27. Is. 11. P. 927-941. DOI: 10.1016/j.tim.2019.06.007.
12. Idrees M., Sawant S., Karodia N., Rahman A. *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies // *Int J. Environ Res Public Health*. 2021. Vol. 18. Is. 14. P. 7602. DOI: 10.3390/ijerph18147602.
13. Thurlow L.R., Hanke M.L., Fritz T., et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo // *J. Immunol*. 2011. Vol. 186. Is. 11. P. 6585-6596. DOI: 10.4049/jimmunol.1002794.
14. Rahman M.A., Amirkhani A., Chowdhury D., et al. Proteome of *Staphylococcus aureus* Biofilm Changes Significantly with Aging // *Int J. Mol Sci*. 2022. Vol. 23. Is. 12. P. 6415. DOI: 10.3390/ijms23126415.
15. Felix L., Mishra B., Khader R., Ganesan N., Mylonakis E. In Vitro and In Vivo Bactericidal and Antibiofilm Efficacy of Alpha Mangostin Against *Staphylococcus aureus* Persister Cells // *Front Cell Infect Microbiol*. 2022. Vol. 12. P. 898794. DOI: 10.3389/fcimb.2022.898794.
16. Golberg K., Markus V., Kagan B.E., et al. Anti-Virulence Activity of 3,3'-Diindolylmethane (DIM): A Bioactive Cruciferous Phytochemical with Accelerated Wound Healing Benefits // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14. Is. 5. P. 967. DOI: 10.3390/pharmaceutics14050967.
17. Donlan R.M. Biofilms and device-associated infections // *Emerg Infect Dis*. 2001. Vol. 7. Is. 2. P. 277-281. DOI: 10.3201/eid0702.010226.

18. Foster T.J. Surface Proteins of *Staphylococcus aureus* // *Microbiol Spectr*. 2019. Vol. 7. Is. 4. P. 0046-2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0046-2018.
19. Nasser A., Dallal M.M.S., Jahanbakhshi S., Azimi T., Nikouei L. *Staphylococcus aureus*: Biofilm Formation and Strategies Against it // *Curr Pharm Biotechnol*. 2022. Vol. 23. Is. 5. P. 664-678. DOI: 10.2174/1389201022666210708171123.
20. van Dalen R., Peschel A., van Sorge N.M. Wall Teichoic Acid in *Staphylococcus aureus* Host Interaction // *Trends Microbiol*. 2020. Vol. 28. Is. 12. P. 985-998. DOI: 10.1016/j.tim.2020.05.017.
21. Hu Y., Xie Y., Tang J., Shi X. Comparative expression analysis of two thermostable nuclease genes in *Staphylococcus aureus* // *Foodborne Pathog Dis*. 2012. Vol. 9. Is. 3. P. 265-271. DOI: 10.1089/fpd.2011.1033.
22. Gudeta D.D., Lei M.G., Lee C.Y. Contribution of hla Regulation by SaeR to *Staphylococcus aureus* USA300 Pathogenesis // *Infect Immun*. 2019. Vol. 87. Is. 9. P. e00231-19. DOI: 10.1128/IAI.00231-19.
23. Lade H., Chung S.H., Lee Y., Joo H.S., Kim J.S. Genotypes of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates Are Associated with Phenol-Soluble Modulins (PSM) Production // *Toxins (Basel)*. 2022. Vol. 14. Is. 8. P. 556. DOI: 10.3390/toxins14080556.
24. Fang B., Liu B., Sun B. Transcriptional regulation of virulence factors Hla and phenol-soluble modulins α by AraC-type regulator Rbf in *Staphylococcus aureus* // *Int J. Med Microbiol*. 2020. Vol. 310. Is. 5. P. 151436. DOI: 10.1016/j.ijmm.2020.151436.
25. Rigi G., Ghaedmohammadi S., Ahmadian G. A comprehensive review on staphylococcal protein A (SpA): Its production and applications // *Biotechnol Appl Biochem*. 2019. Vol. 66. Is. 3. P. 454-464. DOI: 10.1002/bab.1742.
26. Pasquina L., Santa Maria J.P. Jr, McKay Wood B., et al. A synthetic lethal approach for compound and target identification in *Staphylococcus aureus* // *Nat Chem Biol*. 2016. Vol. 12. Is. 1. P. 40-45. DOI: 10.1038/nchembio.1967.
27. Jenul C., Horswill A.R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence // *Microbiol Spectr*. 2019. Vol. 7. Is. 2. P. 0031-2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.
28. Boles B.R., Horswill A.R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms // *PLoS Pathog*. 2008. Vol. 4. Is. 4. P. e1000052. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000052.
29. Laabei M., Duggan S. CidA and LrgA: a "Hole" Lot More than Programmed Cell Death // *mBio*. 2022. Vol. 13. Is. 3. P. e0076122. DOI: 10.1128/mbio.00761-22.
30. Zhang X., Bayles K.W., Luca S. *Staphylococcus aureus* CidC Is a Pyruvate:Menaquinone Oxidoreductase // *Biochemistry*. 2017. Vol. 56. Is. 36. P. 4819-4829. DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00570.

31. Yu J., Jiang F., Zhang F., et al. Thermonucleases Contribute to *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation in Implant-Associated Infections-A Redundant and Complementary Story // *Front Microbiol.* 2021. Vol. 12. P. 687888. DOI: 10.3389/fmicb.2021.687888.
32. Liang M., Ge X., Xua H., et al. Phytochemicals with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Phytomedicine.* 2022. Vol. 100. P. 154073. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154073.
33. Elangovan S., Mudgil P. Antibacterial Properties of *Eucalyptus globulus* Essential Oil against MRSA: A Systematic Review // *Antibiotics (Basel).* 2023. Vol. 12. Is. 3. P. 474. DOI: 10.3390/antibiotics12030474.
34. Iseppi R., Mariani M., Benvenuti S., Truzzi E., Messi P. Effects of *Melaleuca alternifolia* Chell (Tea Tree) and *Eucalyptus globulus* Labill. Essential Oils on Antibiotic-Resistant Bacterial Biofilms // *Molecules.* 2023. Vol. 28. Is. 4. P. 1671. DOI: 10.3390/molecules28041671.
35. Albaqami J.J., Hamdi H., Narayanankutty A., et al. Chemical Composition and Biological Activities of the Leaf Essential Oils of *Curcuma longa*, *Curcuma aromatica* and *Curcuma angustifolia* // *Antibiotics (Basel).* 2022. Vol. 11. Is. 11. P. 1547. DOI: 10.3390/antibiotics11111547.
36. Cheng G., Liu Z., Zheng Z., Song F., Zhuang X., Liu S. Cell Metabolomics Reveals the Potential Mechanism of Aloe Emodin and Emodin Inhibiting Breast Cancer Metastasis // *Int J. Mol Sci.* 2022. Vol. 23. Is. 22. P. 13738. DOI: 10.3390/ijms232213738.
37. Li T., Lu Y., Zhang H., et al. Antibacterial Activity and Membrane-Targeting Mechanism of Aloe-Emodin Against *Staphylococcus epidermidis* // *Front Microbiol.* 2021. Vol. 12. P. 621866. DOI: 10.3389/fmicb.2021.621866.
38. Xiang H., Cao F., Ming D., et al. Aloe-emodin inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms and extracellular protein production at the initial adhesion stage of biofilm development // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017. Vol. 101. Is. 17. P. 6671-6681. DOI: 10.1007/s00253-017-8403-5.
39. Jiang L., Yi T., Shen Z., Teng Z., Wang J. Aloe-emodin Attenuates *Staphylococcus aureus* Pathogenicity by Interfering With the Oligomerization of α -Toxin // *Front Cell Infect Microbiol.* 2019. Vol. 9. P. 157. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00157.
40. Lee J.H., Kim Y.G., Yong Ryu S., Lee J. Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* // *Sci Rep.* 2016. Vol. 6. P. 19267. DOI: 10.1038/srep19267.
41. Li Q., Huang K.X., Pan S., Su C., Bi J., Lu X. Thymol Disrupts Cell Homeostasis and Inhibits the Growth of *Staphylococcus aureus* // *Contrast Media Mol Imaging.* 2022. Vol. 2022. P. 8743096. DOI: 10.1155/2022/8743096.

42. Zhou W., Wang Z., Mo H., et al. Thymol Mediates Bactericidal Activity against *Staphylococcus aureus* by Targeting an Aldo-Keto Reductase and Consequent Depletion of NADPH // *J. Agric Food Chem.* 2019. Vol. 67. Is. 30. P. 8382-8392. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b03517.
43. Aksoy C.S., Avci F.G., Ugurel O.M., Atas B., Sayar N.A., Sariyar Akbulut B. Potentiating the activity of berberine for *Staphylococcus aureus* in a combinatorial treatment with thymol // *Microb Pathog.* 2020. Vol. 149. P. 104542. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104542.
44. Gobin M., Proust R., Lack S., et al. A Combination of the Natural Molecules Gallic Acid and Carvacrol Eradicates *P. aeruginosa* and *S. aureus* Mature Biofilms // *Int J. Mol Sci.* 2022. Vol. 23. Is. 13. P. 7118. DOI: 10.3390/ijms23137118.
45. Heckler C., Sant'anna V. Brandelli A., Malheiros P.S. Combined effect of carvacrol, thymol and nisin against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis* // *An Acad Bras Cienc.* 2021. Vol. 93. Is. 4. P. e20210550. DOI: 10.1590/0001-3765202120210550.