

СТАФИЛОКОККИ КАК ПРОДУЦЕНТЫ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ

Зурочка А. В.^{1,2}, Дукардт В. В.¹, Зурочка В. А.^{1,2}, Добрынина М. А.¹,
Зуева Е. Б.¹, Тяпаева Я. В.³, Гриценко В. А.^{4,5}

¹ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург; ²ФГАОУ ВО Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), Челябинск; ³Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург; ⁴ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург; ⁵ФГБУН Оренбургский научный центр УрО РАН, Оренбург, Россия

В экспериментах *in vitro* на 23 клинических изолятах *S. aureus* (n=23), с помощью 2 тест-систем Multiplex (Luminex, США) для определения 15 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MCP-1, MIP-1 β , TGF- α) и 27 цитокинов (BasicFGE, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF) изучали продукцию цитокиноподобных веществ (ЦПВ). Выявлена и охарактеризована межродовая и внутривидовая вариабельность бактерий по способности продуцировать ЦПВ в среду культивирования. Установлено, что изоляты *S. aureus* являются наиболее активными продуцентами ЦПВ. Обсуждается возможное патогенетическое значение продукции ЦПВ стафилококками и пути дальнейшего исследования данного феномена.

Ключевые слова: цитокины, *S. aureus*, цитокино-подобные вещества

Введение. Инфекционно-воспалительный процесс развивается в результате взаимодействия патогенных микроорганизмов с организмом хозяина, и в его регуляцию вовлекаются различные цитокины, вырабатываемые иммунокомпетентными клетками [1]. Ранее нами экспериментально установлено, что синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) существенно влиял на продукцию ряда цитокинов нейтрофилами периферической крови человека, а совместное добавление к фагоцитам синтетического пептида GM-CSF и супернатантов бульонных культур стафилококков и энтеробактерий разных видов существенно изменяло ответную реакцию нейтрофилов по цитокинопродукции [2, 3]. Нельзя исключить, что подобное модифицирующее действие бактериальных супернатантов на нейтрофилы могло быть обусловлено экскрецией в культуральную среду цитокинов (цитокино-подобных веществ – ЦПВ) самими микроорганизмами, поскольку известна способность ряда бактерий (например, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus) синтезировать большое количество регуляторных молекул, в том числе нейромедиаторов – гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), норадреналина, дофамина, серотонина, гистамина и др., которые могут влиять на функциональное состояние иммунокомпетентных клеток [4, 5].

Целью настоящей работы явился поиск ЦПВ в супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus*.

Материалы и методы. В экспериментах использовали 23 клинический изолята *S. aureus* (n=23, выделенный из ран у больных с синдромом диабетической стопы, из влагалища у женщин с миомой матки, из пустул у новорожденных с пиодермией). Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин и отбирали надосадочную жидкость (супернатант).

Наличие в супернатантах бактерий цитокинов (ЦПВ) определяли на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием тест-системы Multiplex (Luminex, США) для определения 15 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, INF- γ ,

IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MCP-1, MIP-1 β , TGF- α) и 27 цитокинов (BasicFGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF); контролем служил МПБ без бактерий. Опыты проводили в двух повторностях; результаты измерений округляли до 0,1 пкг/мл; при регистрации в супернатантах цитокинов в концентрации меньше 3 пкг/мл считали, что в образце ЦПВ отсутствуют. Данные обработаны методами вариационной статистики [6].

Результаты. При исследовании 15 цитокинов (опыт 1) выявлено, что в супернатантах бульонных культур *S. aureus* обнаруживаются те или иные ЦПВ, наличие и концентрация которых зависели от штамма микроорганизмов. Наиболее активные штаммы продуцировали ЦПВ до 13 из 15 тестируемых цитокинов (все, кроме IL-5 и TGF- α). При этом максимальные (штабмовые и средние) значения концентраций ЦПВ регистрировались у 8 изолятов *S. aureus*. Следует отметить, что 5 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-12p70, IL-17A) тестировались в супернатантах у ряда изолятов *S. aureus* в относительно высоких концентрациях (>20 пкг/мл). В последующем (опыт 2) нами были изучены 7 изолятов *S. aureus* и музейный штамм *S. aureus* Cowan P209 (ATCC 6538-P) на цитокинопродукцию с использованием 27-плексной тест-системы. Исследования показали, что все 7 клинических изолятов «суперпродуцентов» ЦПВ оказались наиболее сильными цитокинопродуцентами, при повторном исследовании, они секретировали в среду инкубации 24 цитокиноподобных фактора за исключением IL-4, IL-13, B Mip1b. Эталонный штамм *S. aureus* Cowan P209 (ATCC 6538-P) продуцировал вещества в более низкой концентрации ЦПВ и на 8 из 27 меньше.

Обращает на себя внимание несколько фактов: во-первых, наличие среди стафилококков явных «лидеров» по продукции ЦПВ, к которым можно отнести 7 штаммов; во-вторых, значительная вариабельность уровня продукции бактериями разных видов отдельных ЦПВ – от 3 до 900 пкг/мл; в-третьих, присутствие среди клинических изолятов *S. aureus*, штаммов-суперпродуцентов ЦПВ, у которых в супернатантах регистрировалось достаточно много, в среднем до 24 цитокиноподобных

веществ, на относительно высоком уровне (>20 пкг/мл).

Заключение. Представленные результаты свидетельствуют о том, что различные тест-системы для мультиплексного анализа Luminex (США) позволяет выявлять в супернатантах суточных бульонных культур микроорганизмов наличие цитокино-подобных веществ (ЦПВ). При этом продукция (наличие и уровень) ЦПВ изученных *S. aureus* характеризуется внутривидовой вариабельностью в очень широком диапазоне от цитокин-непродуцирующих штаммов до «суперпродуцентов». Наиболее активные продуценты ЦПВ способны синтезировать до 24 цитокинов (из 27 изученных), причем в относительно высоких концентрациях (>20 пкг/мл). Обращает на себя внимание и тот факт, что и эталонный штамм *S. aureus* Cowan P209 (ATCC 6538-P), также относится к цитокинпродуцирующим стафилококкам, хотя концентрация выявленных цитокинов была ниже и количество продуцируемых веществ также было меньше (19 из 27). Учитывая принадлежность указанных цитокинов к провоспалительным и ростовым факторам, нельзя исключить их причастность к развитию начальных этапов воспалительной реакции при инфицировании тканей макроорганизма цитокин-продуцирующими стафилококками, в частности путем ранней активации иммунокомпетентных клеток, что требует дальнейшего изучения данного феномена. С другой стороны, необходимо выяснить структурно-молекулярное сходство/различия ЦПВ бактерий с цитокинами макроорганизма, определить их генетическое детерминирование, эволюционное происхождение и роль в биологии прокариотов, а также их участие в формировании патогенного потенциала микроорганизмов.

(Работа выполнена по проектам ИИФ УрО РАН № 15-3-4-33 и ИКВС УрО РАН № 15-3-4-34 в рамках Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иммунология: структура и функции иммунной системы / Под ред. Р.М. Хайтова. – М., 2013. – 280 с. [Immunology: structure and function of the immune system / Ed. by R. M. Haitov. – М., 2013. – 280 p.]
2. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Зуева Е. Б., Добрынина М. А., Дукарт В. В., Черкасов С. В., Грицен

- ко В. А. Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. 4: 9 с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/ZAV-2015-4.pdf>). [Zurochka A. V., Zurochka V. A., Zueva E. B., Dobrynina M. A., Dukardt V. V., Cherkasov S. V., Gritsenko V. A. The effect of synthetic peptide of the active center granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on cytokine production by human peripheral blood neutrophils. // Bulletin of Orenburg scientific center UrB RAS. – 2015. – № 4. – 9 p. [An electronic resource]. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/ZAV-2015-4.pdf>).]
3. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Зуева Е. Б., Добрынина М. А., Дукардт В. В., Ю. П. Белозерцева, Тяпаева Я. В., Гриценко В. А.. Сравнительная оценка влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (Zp2) и супернатантов суточных культур грамотрицательных и грамположительных бактерий на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека. // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10 (19), № 4. – С. 430-433. [Zurochka A. V., Zurochka V. A., Zueva E. B., Dobrynina M. A., Dukardt V. V., Belozertseva Y. V., Tyapayeva Y. V., Gritsenko V. A. Comparative assessment of influence of synthetic peptide of the GM-CSF active center (Zp2) and supernatants of daily cultures of gramnegative and grampositive bacteria on production cytokins neutrophils by human peripheral blood. // Russian journal of immunology. – 2016. – Т. 10 (19), No. 4. – P. 430-430].
 4. Олескин А. В. Нейрохимия, симбиотическая микрофлора и питание (биополитический подход). // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2009. – № 1. – С. 8-16. [Oleskin A. V. neurochemistry, symbiotic microflora and the power (the biopolitical approach). // Gastroenterology Of Saint Petersburg. – 2009. – No. 1. – P. 8-16.]
 5. Цавкелова Е. А., Ботвинко И. Б., Кудрин В. С. и др. Детекция нейромедиаторных аминов у микроорганизмов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Доклады РАН. – 2000. – Т. 372. – С. 840-842. [Tsavkelova E. A., Botvinko I. B., Kudrin V. S., et al. the Detection of neurotransmitter amines in microorganisms using high-performance liquid chromatography // Dokl. RAS. – 2000. – Т. 372. – P. 840-842].
 6. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352с. [Lakin G. F. Biometry. – M.: Vishaya shkola, 1990. – 352 p.]

STAPHYLOCOCCUS AS PRODUCERS OF CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES

Zurochka A. V.^{1,2}, Dukardt V. V.¹, Zurochka V. A.^{1,2}, Dobrynina M. A.¹, Zueva E. B.¹, Tyapayeva Y. V.³, Gritsenko V. A.^{4,5}

¹Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg; ²South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk; ³Orenburg State Medical University, Orenburg;

⁴Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg; ⁵Orenburg Scientific Centre UrB RAS, Orenburg, Russia

In experiments *in vitro* on the 23 clinical isolates *S. aureus* (n=23) a test-system Multiplex (Luminex, USA) to determine the 15 cytokines (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MCP-1, MIP-1 β , TGF- α) and test-system studied to determine the 27 cytokines (BasicFGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF) the production of cytokine-like substances (CLS). Identified and characterized the intergeneric and intraspecific variability of *S. aureus* in their ability to produce CLS in the environment of cultivation. It is established that isolates of *S. aureus* are the most active producers of CLS. The possible pathogenetic significance of products CLS *S. aureus* and ways to further study this phenomenon were discussed.

Key words: cytokines, *S. aureus*, cytokine-like substances