

## IMMUNO-ENDOCRINE INTERACTION IN ALLOXAN DIABETES MELLITUS IN RATS AND ITS CORRECTION BY LIPOIC ACID

Emelyanov V. V.<sup>1</sup>, Shmakova S. E.<sup>2,1</sup>, Chereshnev V. A.<sup>2,1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin»; <sup>2</sup>Institute of immunology and physiology of UB RAS, Ekaterinburg, Russia

In this study, for the first time, shows the role of lipoic acid in the correction of glucose, glycated hemoglobin, insulin, pro – and anti-inflammatory cytokines in the blood of rats in the formation of alloxan diabetes.

**Key words:** diabetes mellitus, lipoic acid, hyperglycemia, insulin, cytokines

## БАКТЕРИИ КАК ПРОДУЦЕНТЫ ЦИТОКИНО-ПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ

Зурочка А. В.<sup>1,2</sup>, Дукардт В. В.<sup>1</sup>, Зурочка В. А.<sup>1,2</sup>, Добрынина М. А.<sup>1</sup>,  
Зуева Е. Б.<sup>1</sup>, Тяпаева Я. В.<sup>3</sup>, Гриценко В. А.<sup>4,5</sup>

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

В экспериментах *in vitro* на 61 клиническом изоляте *S. aureus* (n=23), *S. haemolyticus* (n=10), *Enterococcus faecalis* и *E. faecalis* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=8), энтеробактерий – *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli* (n=12) с помощью тест-системы Multiplex (Luminex, США) для определения 15 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , TGF- $\alpha$ ) изучали продукцию цитокино-подобных 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 бактериями и пути дальнейшего исследования данного феномена.

**Ключевые слова:** цитокины, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, 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 до-

бавление к фагоцитам синтетического пептида GM-CSF и супернатантов бульонных культур стафилококков и энтеробактерий разных видов существенно изменяло ответную реакцию нейтрофилов по цитокино-продукции [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*, *Sta-*

*phyllococcus 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 грамположительных и грамотрицательных бактерий.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали 61 клинический изолят *S. aureus* (n=23), *S. haemolyticus* (n=10), *Enterococcus faecalis* и *E. faecalis* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=8), энтеробактерий – *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli* (n=12), выделенный из ран у больных с синдромом диабетической стопы, из влажной язвы 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- $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , TGF- $\alpha$ ); 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.** Установлено, что в супернатантах бульонных культур бактерий обнаруживаются те или иные ЦПВ, наличие и концентрация которых зависели от видовой/родовой принадлежности микроорганизмов. Наиболее активными продуцентами ЦПВ оказались штаммы *S. aureus*, в супернатантах которых присутствовали 13 из 15 тестируемых цитокинов (все, кроме IL-5 и TGF- $\alpha$ ); бактерии остальных таксонов в порядке убывания числа продуцируемых ЦПВ распределились в ряд: *S. haemolyticus* (7 цитокинов – G-CSF, GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-12p70, IL-17A, IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\beta$ ), *Enterococcus spp.*, (4 – G-CSF, INF- $\gamma$ , IL-12p70, IL-17A), *K. pneumoniae*, *E. coli* и *P. aeruginosa* (1 – G-CSF).

Отмечено внутривидовое разнообразие бактерий по наличию и концентрации в супернатантах ЦПВ – доля штаммов-продуцентов с учетом их вида и типа ЦПВ колебалась в диапазоне 4,3-83,3%, а уровни варьировали от 3,3 до 239,6 пкг/мл. При этом максимальные (штабмовые и средние) значения концентраций ЦПВ регистрировались у изолятов *S. aureus* и *S. haemolyticus*. Следует отметить, что 5 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-12p70, IL-17A) тестировались в супернатантах у ряда изолятов *S. aureus*, *S. haemolyticus* и *E. faecalis* в относительно высоких концентрациях (>20 пкг/мл), другие ЦПВ в изученных образцах либо не обнаруживались, либо их уровень был ниже указанного порога.

Обращает на себя внимание несколько фактов: во-первых, наличие среди микроорганизмов явных «лидеров» по продукции ЦПВ, к которым можно отнести стафилококки, в частности *S. aureus*, которые продуцировали 13 из 15 изученных цитокинов; во-вторых, значительная вариабельность уровня продукции бактериями разных видов отдельных ЦПВ – от 3 до 240 пкг/мл; в-третьих, присутствие среди клинических изолятов бактерий, чаще всего в группе *S. aureus*, штаммов-суперпродуцентов ЦПВ, у которых в супернатантах регистрировалось несколько (3-5) ЦПВ на относительно высоком уровне (>20 пкг/мл).

**Заключение.** Представленные результаты свидетельствуют о том, что тест-система 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 изученными грамположительными и грамотрицательными бактериями зависит от их таксономической принадлежности и характеризуется внутривидовой вариабельностью. Наиболее активными продуцентами ЦПВ являются стафилококки (*S. aureus* и *S. haemolyticus*), которые способны синтезировать 7-13 цитокинов, причем 5 из них (G-CSF, GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-12p70, IL-17A) в относительно высоких концентрациях (>20 пкг/мл). 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 бактериями, в частности путем ранней

активации иммунокомпетентных клеток, что требует дальнейшего изучения данного феномена. С другой стороны, необходимо выяснить структурно-молекулярное сходство/различие 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. – M., 2013. – 280 p.]
2. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Зуева Е. Б., Добрынина М. А., Дукардт В. В., Черкасов С. В., Гриценко 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 cytokines 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. – 352 с. [Lakin G. F. Biometry. – M.: Vishaya shkola, 1990. – 352 p.]

### BACTERIA AS PRODUCERS OF CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES

Zurochka A. V.<sup>1,2</sup>, Dukardt V. V.<sup>1</sup>, Zurochka V. A.<sup>1,2</sup>, Dobrynina M. A.<sup>1</sup>,  
Zueva E. B.<sup>1</sup>, Tyapayeva Y. V.<sup>3</sup>, Gritsenko V. A.<sup>4,5</sup>

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

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

In experiments *in vitro* on the 61 clinical isolates *S. aureus* (n=23), *S. haemolyticus* (n=10), *Enterococcus faecalis* and *E. faecalis* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=8), *enterobacteria* – *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* (n=12) using a test-system Multiplex (Luminex, USA) to determine the 15 cytokines (G-CSF, GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , TGF- $\alpha$ ) studied the production of cytokine-like substances (CLS). Identified and characterized the intergeneric and intraspecific variability of bacteria 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 bacteria and ways to further study this phenomenon were discussed.

**Key words:** cytokines, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, cytokine-like substances