

1
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

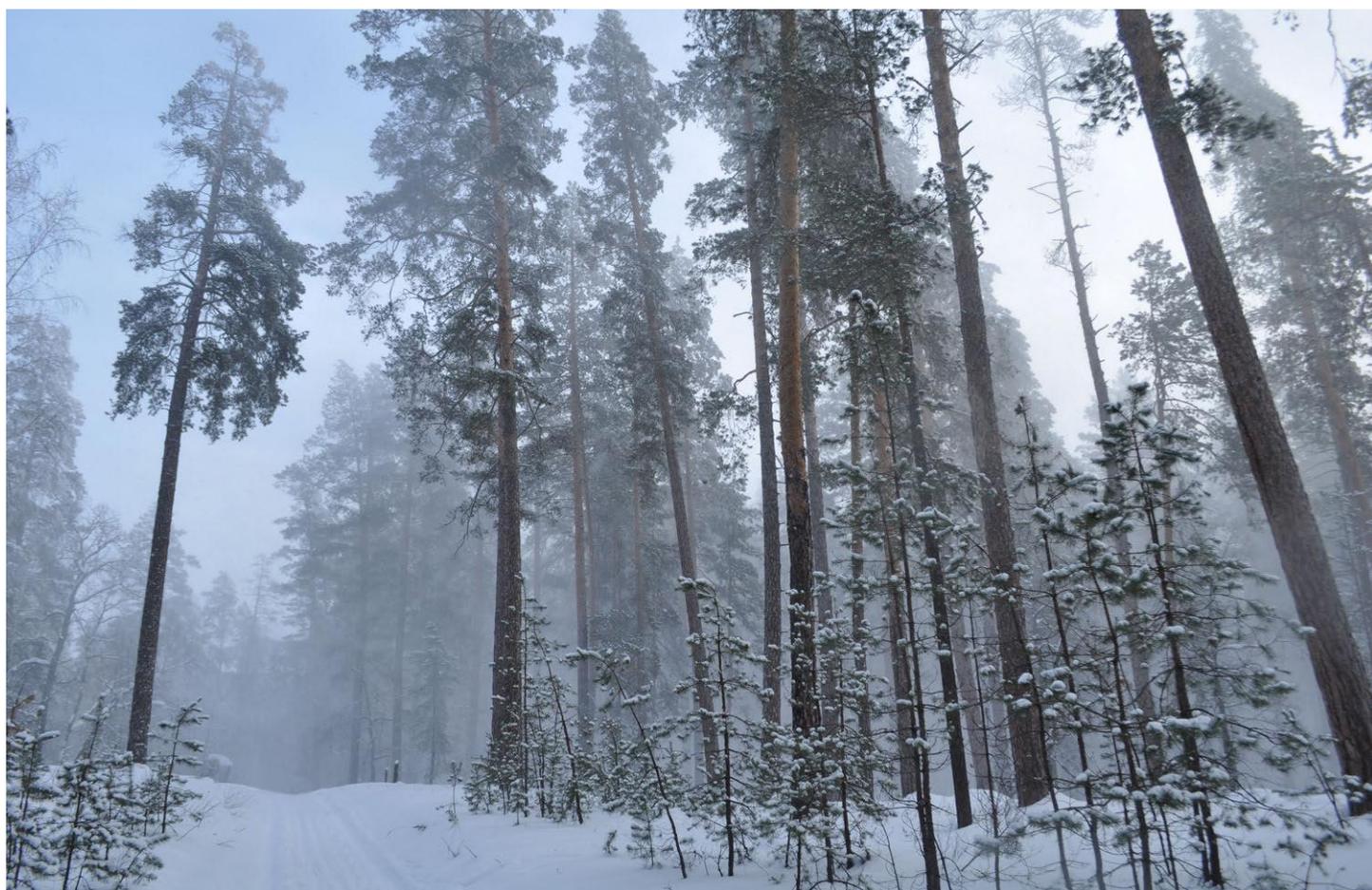
ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

On-line версия журнала на сайте

<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2017

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН

ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2017

УДК: 579.861.2-547.96

А.В. Зурочка^{1,2}, В.В. Дукардт¹, В.А. Зурочка^{1,2}, М.А. Добрынина¹, Е.Б. Зуева¹,
Ю.П. Белозерцева³, Я.В. Тяпаева^{3,4}, В.А. Грищенко^{4,5}

STAPHYLOCOCCUS AUREUS: СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНО-ПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ И ЕЁ РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИМ АНАЛОГОМ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГМ-КСФ)

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

² Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский), Челябинск, Россия

³ Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Россия

⁴ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

⁵ Оренбургский научный центр УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Оценить способность штаммов *Staphylococcus aureus* спонтанно продуцировать цитокино-подобные вещества (ЦПВ) и определить влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на этот процесс.

Материалы и методы. Опыты *in vitro* проведены на 24 штаммах *S. aureus*, включая музейный тест-штамм *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P) и 23 клинических изолята *S. aureus*, выделенных из гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы, отделяемого влагалища у женщин с миомой матки и содержимого пустул у новорожденных с пиодермией. ЦПВ в супернатантах суточных бульонных культур бактерий определяли с помощью тест-системы Multiplex (Luminex, США) на 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). Для изучения влияния синтетического аналога активного центра ГМ-КСФ на продукцию бактериями ЦПВ пептид ZP2 (химическая формула: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO) добавляли в культуральную среду в конечной концентрации 10 мкг/мл.

Результаты. Выявлено внутривидовое разнообразие *S. aureus* по способности продуцировать ЦПВ в среду культивирования. Установлено, что некоторые изоляты *S. aureus* являются активными продуцентами ЦПВ. Присутствие в питательной среде синтетического пептида активного центра GM-CSF (ZP2) отражается на способности *S. aureus* продуцировать цитокино-подобные вещества (ЦПВ), а направленность и выраженность этой реакции на пептид ZP2 характеризуются штаммовой вариабельностью.

Заключение. Обсуждаются возможное патогенетическое значение продукции ЦПВ бактериями и пути дальнейшего исследования данного феномена.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, цитокино-подобные вещества, спонтанная продукция, регуляция, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), синтетический пептид активного центра.

A.V. Zurochka^{1,2}, V.V. Duckardt¹, V.A. Zurochka^{1,2}, M.A. Dobrynina¹, E.B. Zueva¹, Y.P. Belozertseva³, Y.V. Tyapaeva^{3,4}, V.A. Gritsenko^{4,5}

STAPHYLOCOCCUS AUREUS: SPONTANEOUS PRODUCTION OF CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES AND REGULATION BY SYNTHETIC ANALOGUE OF THE ACTIVE CENTRE OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR (GM-CSF)

¹ Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia

² South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia

³ Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

⁴ Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

⁵ Orenburg Scientific Centre UrB RAS, Orenburg, Russia

Objective. To evaluate the ability of *Staphylococcus aureus* strains to spontaneously producing the cytokine-like substance (CLS) and to determine the effect of synthetic peptide of the active site granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on this process.

Materials and methods. In vitro experiments carried out on 24 strains of *S. aureus*, including the Museum test-strain *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P) and 23 clinical isolates of *S. aureus* isolated from purulent wounds in patients with diabetic foot syndrome, discharge of the vagina in women with uterine myoma and the contents of the pustules in newborns with pyoderma. CLS in the daily supernatants of broth cultures of bacteria was determined using test-systems Multiplex (Luminex, USA) for 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). To study the effect of a synthetic analogue of the active site of GM-CSF on the production by bacteria of CLS peptide ZP2 (chemical formula: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS PRO SOU) was added to the culture medium at a final concentration of 10 μ g/ml.

Results. Revealed intraspecific diversity of *S. aureus* in their ability to produce CLS in the environment of cultivation. It was found that some isolates of *S. aureus* are the active producers of CLS. The presence in the nutrient medium synthetic peptide of the active site of GM-CSF (ZP2) affects the ability of *S. aureus* to produce the cytokine-like substance (CLS), and the direction and severity of this reaction to peptide ZP2 are characterized by strain variability.

Conclusion. Discusses the possible pathogenetic significance of products CLS bacteria and ways to further study this phenomenon.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, cytokine-like substances, spontaneous production, regulation, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), synthetic peptide of the active centre.

Введение

Одним из приоритетных возбудителей многих эндогенных инфекционно-воспалительных заболеваний человека является золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) [1]. При этом у части людей наблюдается транзиторное или резидентное бактерионосительство данных микроорганизмов в различных биотопах (кожа, носоглотка, кишечник, урогенитальный тракт) [2, 3]. Иногда под действием определенных экзо- и эндогенных факторов (стрессовые воздействия, иммуносупрессивная терапия, онкопатология, эндокринные заболевания и др.) бессимптомное вегетирование *S. aureus* может трансформироваться в манифестные формы инфекции либо в локусах обитания золоти-

стого стафилококка, либо в иммунокомпрометированных органах, куда бактерии транслоцируются (мигрируют) по лимфатическим сосудам или гематогенно [4, 5]. В регуляции инфекционно-воспалительного процесса существенную роль играют цитокины, секретируемые иммунокомпетентными клетками, в том числе гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) [6].

В этом плане интересны ранее полученные экспериментальные данные о влиянии синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на продукцию ряда цитокинов нейтрофилами периферической крови человека, а также о модификации их ответной реакции при совместном воздействии на фагоциты указанного пептида и супернатантов бульонных культур бактерий, в том числе стафилококков [7, 8]. Нельзя исключить, что подобный модифицирующий эффект бактериальных супернатантов на нейтрофилы связан с экскрецией в культуральную среду цитокинов (цитокино-подобных веществ – ЦПВ) самими микроорганизмами, поскольку известна способность ряда бактерий (включая *S. aureus*) синтезировать большое количество регуляторных молекул, в том числе нейромедиаторов – норадреналина, дофамина, серотонина, гистамина, гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и др., которые могут влиять на функциональное состояние иммунокомпетентных клеток [9, 10]. С другой стороны, имеются данные о переменном характере влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на развитие бульонных культур стафилококков, в частности *S. aureus*, и формирование ими биопленок [11].

Эти обстоятельства указывают на поливалентное действие синтетического пептида ZP2 – аналога активного центра ГМ-КСФ, в орбиту которого могут вовлекаться не только эукариотные клетки, но и прокариоты, что побуждает к дальнейшему изучению его биологических эффектов.

Цель настоящей работы явилась оценка способности штаммов *S. aureus* спонтанно продуцировать цитокино-подобные вещества (ЦПВ) с определением влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на этот процесс.

Материалы и методы

Опыты *in vitro* проведены на 24 культурах *S. aureus*, включая музейный тест-штамм *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P) и 23 клинических изолята *S. aureus*,

выделенных из гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы, отделяемого влагалища у женщин с миомой матки и содержимого пустул у новорожденных с пиодермией (коллекция ИКВС УрО РАН). Выделение и идентификация микроорганизмов проводились в соответствии с действующими рекомендациями общепринятыми методами по культуральным, тинкториальным и биохимическими признакам, в том числе с помощью официальных систем «STARHYtest» («Erba Lachema s.r.o.», European Union) [12, 13].

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 цитокино-подобных веществ (ЦПВ) фиксировали 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); отрицательным контролем служил МПБ без бактерий. Опыты проводили в двух повторностях (с двумя препаративными пробами); результаты измерений округляли до 0,1 пкг/мл; при регистрации в супернатантах цитокинов в концентрации меньше 3 пкг/мл считали, что штамм бактерий не является продуцентом данного ЦПВ.

Для изучения влияния синтетического аналога активного центра ГМ-КСФ (пептид ZP2 с химической формулой: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO) на продукцию ЦПВ 16 штаммами *S. aureus* пептид ZP2 добавляли в МПБ в конечной концентрации 10 мкг/мл, куда инокулировали взвеси бактерий (опыт); контролем служили культуры без добавления в МПБ пептида ZP2. Получение супернатантов и определение в них ЦПВ осуществляли вышеописанными способами.

Данные были обработаны методами вариационной статистики [14, 15].

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы изучена способность музейного тест-штамма *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P) продуцировать ЦПВ в культуральную среду. Отметим, что в контроле (МПБ) цитокины не выявлялись, в то время как в супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P) регистрировался широкий спектр ЦПВ, средние значения концентрации которых оказались выше установленного порога (>3 пкг/мл): G-CSF – 58,1; GM-CSF –

29,6; IFN- γ – 166,9; IL-12(p70) – 105,9; IL-13 – 3,5; IL-17A – 51,4; IL-1b – 5,7; IL-2 – 5,9; IL-4 – 10,2; MCP-1 – 10,2; MIP-1 β – 3,8 пкг/мл. Уровни остальных ЦПВ в супернатантах не превышали порогового значения: IL-10 – 2,8, IL-5 – 1,1, IL-6 – 2,2 и TGF α – 1,9 пкг/мл.

Обращает на себя внимание тот факт, что ряд ЦПВ в супернатантах бульонных культур *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P) обнаруживался в относительно высоких концентрациях ($\geq 20,0$ пкг/мл): G-CSF – 58,1; GM-CSF – 29,6; IFN- γ – 166,9; IL-12(p70) – 105,9 и IL-17A – 51,4 пкг/мл, тогда как уровень других ЦПВ был ниже принятой градации ($> 3,0$, но $< 20,0$ пкг/мл): IL-13 – 3,5; IL-1 β – 5,7; IL-2 – 5,9; IL-4 – 10,2; MCP-1 – 10,2 и MIP-1 β – 3,8 пкг/мл.

Таким образом, установлено, что эталонный штамм *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P) обладает способностью секретировать в культуральную среду большой набор ЦПВ (G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-12(p70), IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, MCP-1, MIP-1 β), причем их концентрация варьировала в достаточно широком диапазоне – от 3,5 до 166,9 пкг/мл. Условно можно считать, что данный штамм *S. aureus* не являлся продуцентом ЦПВ, «сходных» с IL-10, IL-5, IL-6 и TGF α , так как их концентрации в супернатантах были ниже установленного порога (3 пкг/мл), сопоставимого с ошибкой метода: 2,8; 1,1; 2,2 и 1,9 пкг/мл соответственно.

На следующем этапе работы была дана оценка способности 23 клинических изолятов *S. aureus*, выделенных из разных источников, продуцировать ЦПВ в среду культивирования.

Как видно из представленных в таблице 1 данных, в супернатантах бульонных культур клинических штаммов золотистого стафилококка присутствовали 13 из 15 тестируемых цитокинов (все, кроме IL-5 и TGF- α , концентрация которых не превышала принятый порог 3 пкг/мл), а их концентрация варьировала в широком диапазоне значений.

С другой стороны, не все клинические изоляты *S. aureus* обладали способностью продуцировать отдельные ЦПВ, что свидетельствовало о внутривидовом разнообразии золотистых стафилококков по данному признаку. Так, ЦПВ, «тождественные» цитокинам G-CSF, IFN- γ , IL-12(p70) и IL-17A, тестировались в супернатантах у 52,2-73,9% культур *S. aureus*, в то время как «аналоги» цитокинов IL-10, IL-13, IL-1 β и IL-6 выявлялись в культуральной среде лишь у 4,3-13,0% изолятов золотистого стафилококка. Остальные ЦПВ

(«подобные» GM-CSF, IL-2, IL-4, MCP-1 и MIP-1 β) обнаруживались в супернатантах у 26,1-43,5% штаммов *S. aureus*.

Таблица 1. Характеристика продукции цитокино-подобных веществ (ЦПВ) клиническими изолятами *S. aureus* (n=23) в супернатанты

Цитокины	Диапазон (min-max) концентраций ЦПВ во всей выборке штаммов (пкг/мл)	Средний уровень ЦПВ во всей выборке штаммов (M \pm m, пкг/мл)	Доля штаммов-продуцентов ЦПВ (%)	Диапазон (min-max) концентраций ЦПВ у штаммов-продуцентов (пкг/мл)	Средний уровень ЦПВ у штаммов-продуцентов (M \pm m, пкг/мл)
G-CSF	0-68,8	21,5 \pm 4,6	73,9	3,8-68,8	28,9 \pm 3,6
GM-CSF	0-29,6	5,4 \pm 1,8	39,1	5,2-29,6	13,3 \pm 2,1
INF- γ	0-239,6	63,7 \pm 17,9	52,2	12,1-239,6	121,9 \pm 16,8
IL-10	0-8,6	1,0 \pm 0,4	4,3	8,4-8,6	8,5 \pm 0,1
IL-12p70	0-105,9	22,2 \pm 6,7	52,2	5,6-105,9	42,5 \pm 6,6
IL-13	0-8,0	1,2 \pm 0,4	8,7	3,5-8,0	5,8 \pm 1,3
IL-17A	0-51,8	14,7 \pm 4,1	52,2	3,3-51,8	27,8 \pm 3,8
IL-1 β	0-7,6	1,5 \pm 0,4	13,0	3,5-7,6	5,6 \pm 0,8
IL-2	0-10,1	2,2 \pm 0,6	26,1	3,7-10,1	6,2 \pm 0,6
IL-4	0-14,0	2,5 \pm 0,8	30,4	3,3-14,0	7,0 \pm 1,0
IL-5	0,6-1,3	0,8 \pm 0,1	0	-	-
IL-6	0-4,3	0,4 \pm 0,2	4,3	4,1-4,3	4,2 \pm 0,1
MCP-1	0-16,5	3,7 \pm 0,9	43,5	3,5-16,5	7,9 \pm 0,8
MIP-1 β	0-14,0	3,6 \pm 1,0	34,8	5,2-14,0	9,4 \pm 0,9
TGF- α	0-1,9	0,4 \pm 0,2	0	-	-

Кроме того вариабельность касалась и уровня выраженности этой способности у золотистых стафилококков, поскольку диапазон концентраций ЦПВ у штаммов-продуцентов был достаточно широк. При этом следует отметить, что высокие средние значения уровней ЦПВ коррелировали с большой долей в выборке *S. aureus* штаммов-продуцентов; в частности, это относилось к G-CSF, INF- γ , IL-12(p70) и IL-17A, концентрации которых в супернатантах были максимальными – 28,9 \pm 3,6, 121,9 \pm 16,8, 42,5 \pm 6,6 и 27,8 \pm 3,8 пкг/мл соответственно.

Таким образом, как эталонный штамм *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P), так и клинические изоляты золотистого стафилококка оказались способными спонтанно синтезировать и продуцировать в культуральную среду (суперна-

тант) широкий спектр ЦПВ, причем данные микроорганизмы характеризовались внутривидовой (межштаммовой) вариабельностью по наличию и выраженности указанного признака. Необходимо отметить присутствие среди клинических изолятов *S. aureus* штаммов-продуцентов ЦПВ, у которых в супернатантах регистрировалось несколько (3-5) ЦПВ на относительно высоком уровне (>20 пкг/мл). При этом все высоко продуцируемые ЦПВ относятся или к факторам роста (G-CSF, GM-CSF), или к группе провоспалительных цитокинов (IFN- γ , IL-12(p70) и IL-17A), что может иметь непосредственное отношение к развитию и регуляции воспалительной реакции в месте вегетирования *S. aureus*.

Поскольку в очаге воспаления наблюдается выброс иммунокомпетентными клетками цитокинов, в том числе GM-CSF [6, 16, 17], важно было определить влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на продукцию золотистыми стафилококками ЦПВ.

По результатам экспериментов *in vitro* проведена сравнительная оценка спонтанной и индуцированной синтетическим пептидом ZP2 продукции ЦПВ эталонным штаммом *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P) и 15 клиническими изолятами золотистого стафилококка (рис. 1 и 2, табл. 2)

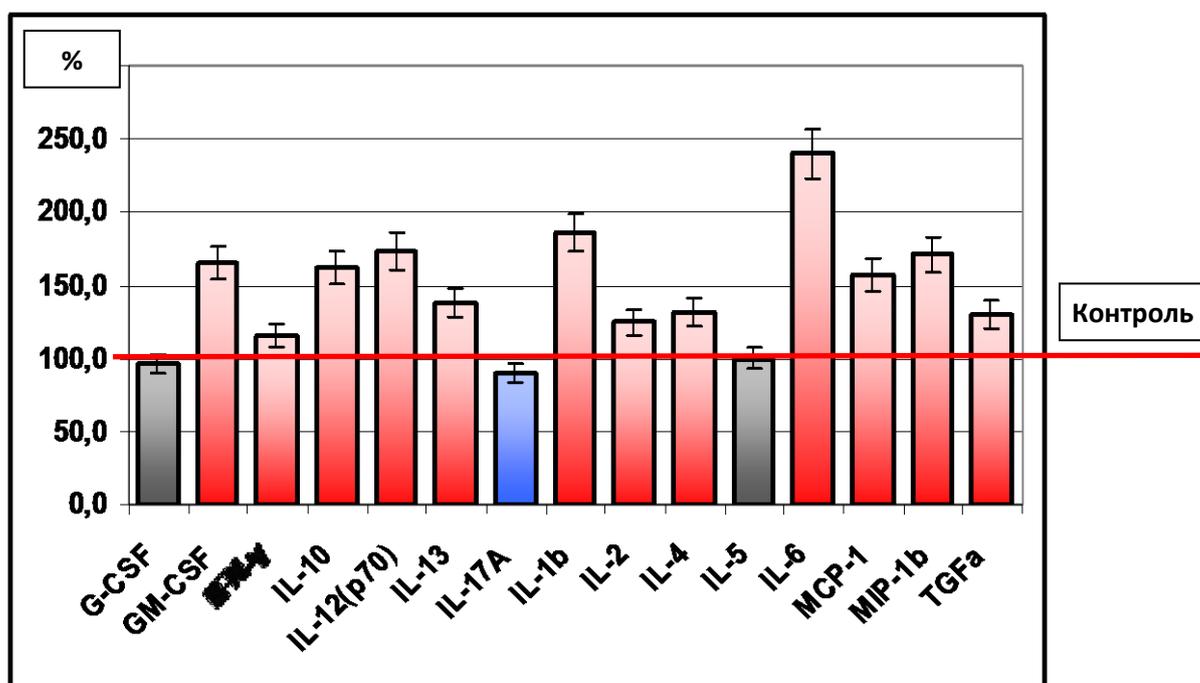


Рис. 1. Влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на продукцию ЦПВ эталонным штаммом *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P). Обозначения: ось ординат – уровень соответствующих ЦПВ в опыте относительно контроля (%); красная линия – уровень ЦПВ в контроле, принятый за 100%.

Как видно из рисунка 1, синтетический пептид ZP2 в той или иной степени (на 15,0-139,9%) стимулировал продукцию эталонным штаммом *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P) большинства ЦПВ (12 из 15 изученных, то есть все, кроме G-CSF, IL-17A и IL-5).

Следует отметить, что эталонный штамм *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P), который спонтанно не продуцировал ЦПВ, «аналогичные» цитокинам IL-10 и IL-6 (концентрации в контроле – 2,8 и 2,2 пкг/мл соответственно), под действием синтетического пептида ZP2 увеличивал их продукцию в 1,62 и 2,40 раза (концентрации в опыте – 4,5 и 5,2 пкг/мл соответственно, которые превышали принятый порог – 3 пкг/мл).

В то же время данный штамм *S. aureus* при контакте с синтетическим пептидом ZP2 практически не изменял продукцию ЦПВ, «сходных» с G-CSF и IL-5, так как в супернатантах контрольных и опытных культур их концентрации существенно (более чем на 10% от контрольных значений) не отличались, то есть по указанным ЦПВ наблюдалась индифферентная реакция бактерий на синтетический пептид ZP2.

Вместе с тем рост этого штамма *S. aureus* в присутствии синтетического пептида ZP2 сопровождался ингибированием на 10,7% продукции ЦПВ, «тождественного» IL-17A, относительно спонтанного уровня в контроле ($45,9 \pm 0,2$ против $51,4 \pm 0,3$ пкг/мл; $p < 0,05$).

Таким образом, полученные результаты показали не однозначный характер влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на продукцию ЦПВ эталонным штаммом *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P): данный пептид мог вызывать у бактерий стимулирующий (в отношении 12 ЦПВ), ингибирующий (в отношении 1 ЦПВ) или индифферентный (в отношении 2 ЦПВ) эффекты.

Эти результаты были учтены при анализе влияния синтетического пептида ZP2 на продукцию ЦПВ 15 клиническими изолятами *S. aureus*.

Как видно из рисунка 2, добавление в питательную среду (МПБ) синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 (в конечной концентрации 10 мкг/мл) по-разному влияло на продукцию отдельных ЦПВ клиническими изолятами *S. aureus*: у одних штаммов данный пептид стимулировал продукцию ЦПВ (>10% от контроля), у другой части культур – не оказывал на этот процесс заметного влияния (в пределах $\pm 10\%$ от контроля), в третьей

подгруппе изолятов – ингибировал выработку ЦПВ (<10% от контроля).

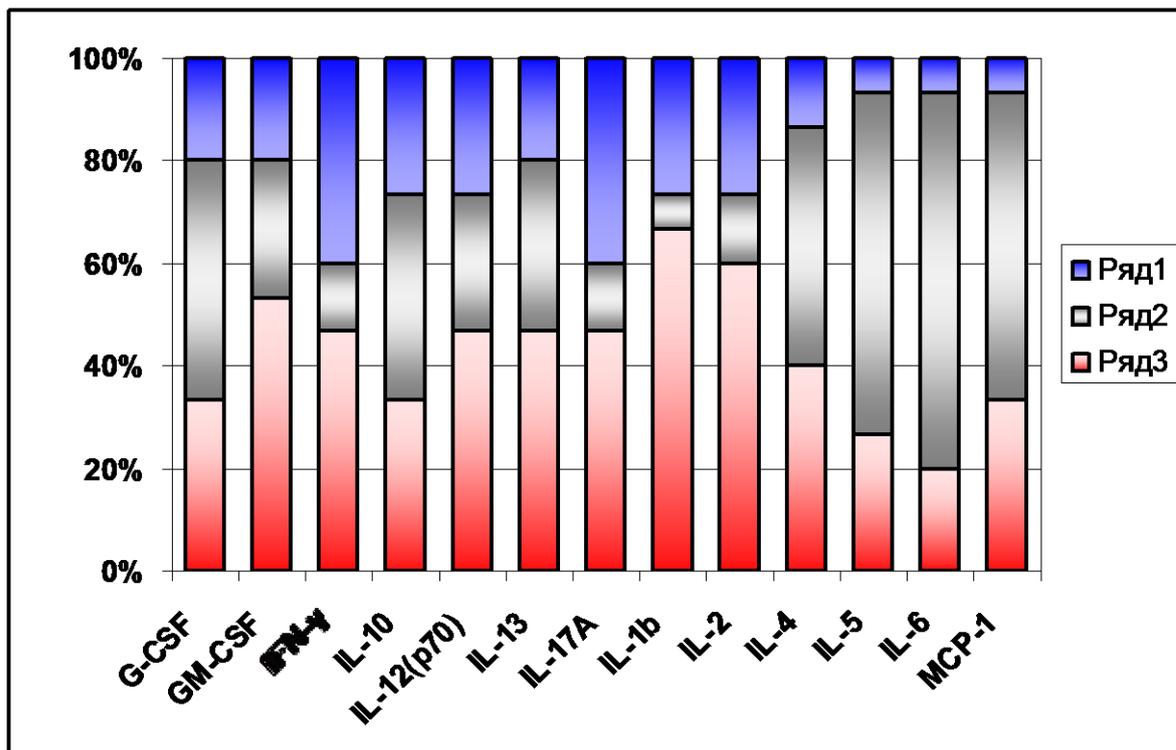


Рис 2. Структура штаммов *S. aureus* с учетом эффектов воздействия синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на продукцию бактериями цитокино-подобных веществ (ЦПВ).
 Обозначения: ось ординат – доля штаммов с соответствующей реакцией на пептид ZP2 (%); Ряд 1 - ингибирование продукции ЦПВ; ряд 2 - индифферентное влияние; ряд 3 – стимулирование продукции ЦПВ.

Кроме того вариабельность ответной реакции клинических штаммов золотистого стафилококка проявлялась и в степени выраженности изменения продукции ЦПВ под действием синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2, что отражено в таблице 2.

Из представленных в таблице 2 данных видно, что ингибирующий эффект синтетического пептида ZP2 в отношении продукции ЦПВ регистрировался у 6,7-40,0% штаммов *S. aureus* и чаще всего касался таких ЦПВ, как INF-γ IL-17A, при этом средняя степень ингибирования продукции изученных ЦПВ колебалась в диапазоне -12,0...-65,8% (амплитуда колебаний степени ингибирования продукции конкретных ЦПВ также была значительной).

Индифферентную реакцию на присутствие в питательной среде синтетического пептида ZP2 по продукции ЦПВ проявляли от 6,7 до 66,7% клинических изолятов; подобную «инертность» культуры *S. aureus* чаще проявляли в отношении «аналогов» цитокинов TGF-α (60,0%), MCP-1 (60,0%), IL-5

(66,7%) и IL-6 (73,3%), реже в отношении - IL-1 β (6,7%), INF- γ , IL-17A и IL-2 (по 13,3% штаммов).

Таблица 2. Влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на продукцию *S. aureus* (n=15) цитокино-подобных веществ (ЦПВ)

Цитокины	Эффекты и параметры влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на продукцию <i>S. aureus</i> ЦПВ				
	Ингибирование		Индифферентность	Стимулирование	
	Доля штаммов (%)	Степень ингибирования (min...max M \pm m, %)	Доля штаммов без изменения (%)	Доля штаммов (%)	Степень стимулирования (min-max M \pm m, %)
G-CSF	20,0	<u>-18,1...-40,2</u> -30,4 \pm 4,1	46,7	33,3	<u>40,1...421,6</u> +134,3 \pm 48,7
GM-CSF	20,0	<u>-10,1...-50,0</u> -27,4 \pm 7,5	26,7	53,3	<u>16,9...573,3</u> +198,4 \pm 43,7
INF- γ	40,0	<u>-10,4...-78,8</u> -37,5 \pm 8,9	13,3	46,7	<u>15,2...366,7</u> +102,4 \pm 32,3
IL-10	26,7	<u>-47,0...-73,8</u> -58,7 \pm 3,9	40,0	33,3	<u>55,8...741,7</u> +283,9 \pm 79,0
IL-12p70	26,7	<u>-25,5...-35,5</u> -30,7 \pm 1,7	26,7	46,7	<u>17,3...2869,0</u> +482,7 \pm 150,4
IL-13	20,0	<u>-27,2...-75,7</u> -48,9 \pm 9,0	33,3	46,7	<u>38,5...611,1</u> +158,3 \pm 52,3
IL-17A	40,0	<u>-10,7...-29,2</u> -22,1 \pm 2,0	13,3	46,7	<u>18,4...125,9</u> +57,2 \pm 9,4
IL-1 β	26,7	<u>-19,1...-38,3</u> -27,0 \pm 3,1	6,7	66,7	<u>36,2...179,4</u> +110,1 \pm 9,4
IL-2	26,7	<u>-26,1...-54,7</u> -39,9 \pm 4,0	13,3	60,0	<u>18,6...113,9</u> +65,4 \pm 8,7
IL-4	13,3	<u>-23,1...-37,8</u> -30,5 \pm 4,3	46,7	40,0	<u>31,6...546,9</u> +155,3 \pm 54,1
IL-5	6,7	<u>-11,0...-13,1</u> -12,0 \pm 1,1	66,7	26,7	<u>13,6...31,6</u> +22,4 \pm 2,6
IL-6	6,7	<u>-65,1...-67,9</u> -65,8 \pm 1,6	73,3	20,0	<u>139,9...242,6</u> +200,5 \pm 19,6
MCP-1	6,7	<u>-48,8...-56,2</u> -51,4 \pm 2,8	60,0	33,3	<u>57,5...176,6</u> +112,6 \pm 15,7
MIP-1 β	13,3	<u>-26,1...-57,8</u> -42,0 \pm 9,2	46,7	40,0	<u>51,5...191,1</u> +115,5 \pm 14,2
TGF- α	6,7	<u>-50,8...-64,2</u> -54,9 \pm 2,4	60,0	33,3	<u>20,0...200,0</u> +72,2 \pm 21,3

В то же время у определенной части (20,0-66,7%) клинических изолятов *S. aureus* синтетический пептид ZP2, добавленный в питательную среду в концентрации 10 мкг/мл, стимулировал продукцию ЦПВ. Относительно большая группа штаммов золотистого стафилококка (53,3-66,7%) под действием данного пептида увеличивала выделение таких ЦПВ, как GM-CSF, IL-1 β и IL-2, причем стимулирующий эффект был достаточно выражен – в супернатантах концентрация этих ЦПВ в опыте по сравнению с контролем повышалась на 198,4 \pm 43,7, 110,1 \pm 9,4 и 65,4 \pm 8,7% соответственно.

Следует отметить, что максимально выраженный стимулирующий эффект синтетического пептида ZP2 регистрировался в отношении продукции золотистыми стафилококками таких ЦПВ, как IL-6 (+200,5 \pm 19,6%), IL-10 б (+283,9 \pm 79,0%) и IL-12p70 (+482,7 \pm 150,4% относительно контроля), а минимально данный пептид активировал продукцию ЦПВ, «сходных» с IL-17A (+57,2 \pm 9,4%) и IL-5 (+22,4 \pm 2,6%).

Таким образом, результаты анализа свидетельствовали о гетерогенности изученной выборки клинических изолятов *S. aureus* по их ответной реакции на присутствие в питательной среде синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2, что проявлялось вариабельным характером изменения продукции бактериями конкретных ЦПВ (ингибирование, индифферентность, стимулирование) и, очевидно, обусловлено наличием среди них различных клоновых линий *S. aureus*, ассоциированных с вегетированием в разных биотопах тела человека, в том числе при развитии той или иной инфекционно-воспалительной патологии.

Заключение

Представленные данные интересны в нескольких аспектах.

В методическом плане они показывают принципиальную возможность с помощью тест-системы для мультиплексного анализа Lumiplex (США) выявлять в супернатантах бульонных культур *S. aureus* (вероятно, не только этих бактерий) наличие цитокино-подобных веществ (ЦПВ) с их количественной регистрацией в широком диапазоне концентраций, а также определять регулирующее влияние различных факторов (в нашем случае – синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2) на синтез микроорганизмами ЦПВ.

В теоретическом ключе полученные результаты, во-первых, отражают способность золотистых стафилококков спонтанно (конститутивно) проду-

цировать в культуральную среду широкую гамму ЦПВ (13 из 15 тестируемых цитокинов); во-вторых, указывают на внутривидовое (межштаммовое) разнообразие *S. aureus* по данному признаку, что проявлялось вариабельностью данных бактерий как по наличию/отсутствию в супернатантах отдельных ЦПВ, так и по диапазону их концентраций. При оценке количественных параметров продукции ЦПВ клиническими штаммами золотистого стафилококка обнаружено, что среди всех регистрируемых в супернатантах ЦПВ 5 из них (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-12p70, IL-17A) выявлялись в относительно высоких концентрациях (>20 пкг/мл), сопоставимых с уровнем этих цитокинов в супернатантах активированных нейтрофилов периферической крови человека [7, 8].

Учитывая принадлежность указанных ЦПВ, регистрируемых у *S. aureus* в высоких концентрациях, к провоспалительным цитокинам и факторам роста, нельзя исключить их причастность к развитию начальных этапов воспалительной реакции при инфицировании тканей макроорганизма цитокин-продуцирующими бактериями, в частности путем ранней активации иммунокомпетентных клеток. Однако данное предположение требует дальнейшего изучения.

В прикладном ракурсе полученные данные указывают на подверженность продукции бактериями ЦПВ регуляции экзогенными факторами, в частности синтетическим пептидом активного центра ГМ-КСФ – ZP2, который является основным компонентом новых косметических средств – АЦЕГРАМ-спрей и АЦЕГРАМ-гель [18]. При этом выявлена вариабельность эффектов данного пептида на продукцию ЦПВ (стимуляция, индифферентность, ингибирование) клиническими изолятами *S. aureus*, что отражает внутривидовое разнообразие указанных бактерий по их реакции на действующий фактор.

Из выше изложенного возникает серия логичных вопросов (на которые пока трудно дать внятные ответы). Действительно ли регистрируемые тест-системой Lumineх (США) в супернатантах бактерий отдельные ЦПВ являются структурными и функциональными аналогами истинных цитокинов, синтезируемых иммунокомпетентными клетками макроорганизма? Какова генетическая детерминация (хромосомная, плазмидная) синтеза бактериями ЦПВ? Какие биохимические системы обеспечивают выработку ЦПВ и их транспорт из бактериальной клетки? Насколько тождественны молекулярно-генетические механизмы продукции ЦПВ у бактерий и цитокинов у эукари-

от? Являются ли ЦПВ бактерий эволюционно более древним приобретением, чем цитокины макроорганизма, или они «заимствованы» у последнего в процессе коэволюции? Каков биологический смысл конститутивного синтеза (продукции) ЦПВ микроорганизмами, в частности *S. aureus*? Какую патогенетическую роль играют ЦПВ *S. aureus* в развитии инфекционно-воспалительной патологии?

Безусловно, дальнейшие исследования по всему спектру поставленных вопросов позволят расшифровать механизмы продукции бактериями ЦПВ и особенности её регуляции различными факторами, что будет способствовать прогрессу наших знаний о биологии прокариот и их роли в патологии человека.

(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)

ЛИТЕРАТУРА

1. Rhee Y., Aroutcheva A., Hota B., et. al. Evolving Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015. 36(12): 1417-1422.
2. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Карташова О.Л. Биология патогенных кокков. М.: Медицина: Екатеринбург: УрО РАН, 2002. 282 с.
3. Rocha L.C., Carvalho M.O.S., Nascimento V.M.L., dos Santos M.S., Barros T.F., Adorno E.V., Reis J.N., da Guarda C.C., Santiago R.P., Gonçalves M.dS. Nasopharyngeal and Oropharyngeal Colonization by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* and Prognostic Markers in Children with Sickle Cell Disease from the Northeast of Brazil. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 217. doi: 10.3389/fmicb.2017.00217.
4. Гриценко В.А., Иванов Ю.Б. Роль персистентных свойств в патогенезе эндогенных инфекций. *Журн. микробиол.* 2009. 4: 66-71.
5. Krezalek M.A., Hyoju S., Zaborin A., Okafor E., Chandrasekar L., Bindokas V., Guyton K., Montgomery C.P., Daum R.S., Zaborina O., Boyle-Vavra S., Alverdy J.C. Can Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Silently Travel From the Gut to the Wound and Cause Post-operative Infection? Modeling the "Trojan Horse Hypothesis". *Ann Surg.* 2017; Feb 9. doi: 10.1097/SLA.0000000000002173.
6. Иммунология: структура и функции иммунной системы / Под ред. Р.М. Хаитова. - М., 2013. - 280 с.
7. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Дукарт 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>).
8. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Дукарт 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: 430-433.
9. Олескин А.В. Нейрохимия, симбиотическая микрофлора и питание (биополитический

- подход). Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2009. 1: 8-16.
10. Цавкелова Е.А., Ботвинко И.Б., Кудрин В.С. и др. Детекция нейромедиаторных аминов у микроорганизмов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Доклады РАН. 2000. 372: 840-842.
 11. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Дукардт В.В., Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Черешнев В.А. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 2: 30с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>).
 12. Приказ МЗ СССР от 22.04.1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».
 13. Донецкая Э.Г. Клиническая микробиология: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 480 с.
 14. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
 15. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2013.
 16. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552с.
 17. Козлов В.А., Борисов А.Г., Смирнова С.В., Савченко А.А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: Руководство для врачей. Новосибирск: Наука, 2009. 274с.
 18. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Дукардт В.В., Гриценко В.А. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) как основа для создания косметических средств нового поколения с комбинированными эффектами – АЦЕГРАМ-гель и АЦЕГРАМ-спрей. Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10 (19). 3: 269-272.

Поступила 18.03.2017

(Контактная информация: Зурочка Александр Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник Института иммунологии и физиологии УрО РАН; адрес: 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106; тел.: +7(343)374-00-70; E-mail: av_zurochka@mail.ru;

Гриценко Виктор Александрович – доктор медицинских наук, профессор, ведущий лабораторией Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ученый секретарь Президиума Оренбургского научного центра УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел.: +7(3532)77-05-12; E-mail: vag59@mail.ru)

LITERATURA

1. Rhee Y., Aroutcheva A., Hota B., et. al. Evolving Epidemiology of Staphylococcus aureus Bacteremia. Infect Control Hosp Epidemiol. 2015. 36(12): 1417-1422.
2. Buharin O.V., Usvjacov B.Ja., Kartashova O.L. Biologija patogennyh kokkov. М.: Medicina: Ekaterinburg: UrO RAN, 2002. 282 s.
3. Rocha L.C., Carvalho M.O.S., Nascimento V.M.L., dos Santos M.S., Barros T.F., Adorno E.V., Reis J.N., da Guarda C.C., Santiago R.P., Gonçalves M.dS. Nasopharyngeal and Oropharyngeal Colonization by Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae and Prognostic Markers in Children with Sickle Cell Disease from the Northeast of Brazil. Front. Microbiol. 2017; 8: 217. doi: 10.3389/fmicb.2017.00217.
4. Gricenko V.A., Ivanov Ju.B. Rol' persistentnyh svojstv v patogeneze jendogennyh infekcij. Zhurn. mikrobiol. 2009. 4: 66-71.

5. Krezalek M.A., Hyoju S., Zaborin A., Okafor E., Chandrasekar L., Bindokas V., Guyton K., Montgomery C.P., Daum R.S., Zaborina O., Boyle-Vavra S., Alverdy J.C. Can Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Silently Travel From the Gut to the Wound and Cause Postoperative Infection? Modeling the "Trojan Horse Hypothesis". Ann Surg. 2017; Feb 9. doi: 10.1097/SLA.0000000000002173.
6. Immunologija: struktura i funkcii immunnoj sistemy / Pod red. R.M. Haitova. - M., 2013. - 280 s.
7. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Dukart V.V., Cherkasov S.V., Gricenko V.A. Vlijanie sinteticheskogo peptida aktivnogo centra granulocitarno-makrofagal'nogo koloniestimulirujushhego faktora (GM-KSF) na produkciju cito-kinov nejtrofilami perifericheskoj krovi cheloveka. Bjulleten' Orenburgskogo na-uchnogo centra UrO RAN. 2015. 4: 9 s. [Jelektronnyj resurs] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/ZAV-2015-4.pdf>).
8. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Dukardt V.V., Ju.P. Belozerceva, Tjapaeva Ja.V., Gricenko V.A.. Sravnitel'naja ocenka vlijanija sinteticheskogo peptida aktivnogo centra GM-KSF (Zp2) i supernatantov sutochnyh kul'tur gramot-ricatel'nyh i grampolozhitel'nyh bakterij na produkciju citokinov nejtrofilami perifericheskoj krovi cheloveka. Rossijskij immunologicheskij zhurnal. 2016. T. 10(19), 4: 430-433.
9. Oleskin A.V. Nejrohimiya, simbioticheskaja mikroflora i pitanie (biopoliticheskij podhod). Gastrojenterologija Sank-Peterburga. 2009. 1: 8-16.
10. Cavkelova E.A., Botvinko I.B., Kudrin V.S. i dr. Detekcija nejromediatornyh aminov u mikroorganizmov metodom vysokoeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii. Doklady RAN. 2000. 372: 840-842.
11. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Dukardt V.V., Gricenko V.A., Tjapaeva Ja.V., Chereshev V.A. Fenomen nalichija unikal'noj kombinacii immunobiologicheskikh svojstv u sinteticheskogo analoga aktivnogo centra granulocitarno-makrofagal'nogo koloniestimulirujushhego faktora (GM-KSF). Bjulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN. 2016. 2: 30c. [Jelektronnyj resurs] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>).
12. Prikaz MZ SSSR ot 22.04.1985 g. № 535 «Ob unifikacii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovanija, primenjaemyh v kliniko-diagnosticheskikh laboratorijah lecebno-profilakticheskikh uchrezhdenij».
13. Doneckaja Je.G. Klinicheskaja mikrobiologija: Rukovodstvo dlja specialistov klinicheskoj laboratornoj diagnostiki. M.: GJeOTAR-Media, 2011. 480 s.
14. Lakin G.F. Biometrija. M.: Vysshaja shkola, 1990. 352 s.
15. Truhacheva N.V. Matematicheskaja statistika v mediko-biologicheskikh issledovanijah s primeneniem paketa Statistica. M.: GOJeTAR-Media, 2013.
16. Ketlinskij S.A., Simbirev A.S. Citokiny. SPb.: Foliant, 2008. 552s.
17. Kozlov V.A., Borisov A.G., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Prakticheskie aspekty diagnostiki i lechenija immunnyh narushenij: Rukovodstvo dlja vrachej. Novosibirsk: Nauka, 2009. 274s.
18. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Dukardt V.V., Gricenko V.A. Sinteticheskij peptid aktivnogo centra granulocitarno-makrofagal'nogo koloniestimulirujushhego faktora (GM-KSF) kak osnova dlja sozdanija kosmeticheskikh sredstv novogo pokolenija s kombinirovannymi jeffektami – ACEGRAM-gel' i ACEGRAM-sprej. Rossijskij immunologicheskij zhurnal. 2016. T. 10 (19). 3: 269-272.

Образец ссылки на статью:

Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Белозерцева Ю.П., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. *Staphylococcus aureus*: спонтанная продукция цитокиноподобных веществ и её регуляция синтетическим аналогом активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2017. 1: 15с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-1/Articles/ZAV-2017-1.pdf>).