

ДУКАРДТ ВИКТОР ВЛАДИМИРОВИЧ

**ОСОБЕННОСТИ СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ НЕЙТРОФИЛАМИ ПРИ
ФАГОЦИТОЗЕ БАКТЕРИЙ И ВОЗДЕЙСТВИИ СИНТЕТИЧЕСКОГО
ПЕПТИДА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГМ-КСФ)**

14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в лаборатории иммунологии воспаления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

**Зурочка
Александр Владимирович**

доктор медицинских наук, профессор

**Гриценко
Виктор Александрович**

Официальные оппоненты:

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Тотолян
Арег Артемович**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Калуцкий
Павел Вячеславович**

Ведущая организация: Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (г. Пермь)

Защита состоится «___» _____ 2019 года в _____ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 004.027.02 на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106)

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН и на сайте ИИФ УрО РАН – <http://iip.uran.ru>, с авторефератом – на сайте ВАК РФ <http://vak2.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года

Ученый секретарь Совета Д 004.027.02
на базе ИИФ УрО РАН,
д.м.н., проф., ЗДН РФ

И.А.Тузанкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Развитие, течение и исход инфекционно-воспалительного процесса в значительной степени связаны с функционированием иммунной системы (Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., 2001; Черешнев В.А., Юшков Б.Г., 2005; Черешнев В.А. и соавт., 2008; Хаитов Р.М. и соавт., 2009; Ярилин А.А., 2010). Ранние этапы формирования инфекционной патологии тесно сопряжены с взаимодействием бактерий и профессиональных фагоцитов (прежде всего, нейтрофилов) и вовлечением в него цитокинов. Последние могут выступать не только в роли чисто регуляторных молекул, усиливающих или снижающих воспаление, но и выступать в роли самостоятельных антимикробных факторов (Зурочка В.А., 2016; Зурочка А.В. и соавт., 2012, 2013, 2014, 2015, 2016). Поэтому регуляторные биологически активные молекулы, продуцируемые клетками иммунной системы для поддержания гомеостаза организма, становятся важными кандидатами для создания новых лекарственных препаратов. К таким веществам относятся, в первую очередь, цитокины (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Симбирцев А.С., 2013, 2018). Одним из важнейших из них является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), который широко применяется в клинике (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008.; Козлов В.А. и соавт., 2009; Симбирцев А.С., 2013, 2018; vanNieuwenhuijzeA., et al., 2013; Cruz A.F., et al., 2014). В 90-х годах были получены синтетические пептидные аналоги активного центра данного цитокина, обладающие иммуностимулирующей активностью, идентичной таковой цельной молекуле ГМ-КСФ (Жемчугов В.Е. и соавт., 1996, 2005; Зурочка А.В. и соавт., 1995, 1996, 2017), а в последние годы у одного из них (синтетический пептид ZP2) выявлен комплекс новых свойств, отражающий наличие у него не только широкого спектра иммуотропных, но антимикробных и репаративных эффектов (Зурочка В.А., 2016; Зурочка А.В. и соавт., 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017), что требует проведения дальнейших исследований иммунобиологической активности указанного пептида. В частности, остается открытым вопрос, связанный с особенностями влияния синтетического пептида ZP2 на секрецию цитокинов нейтрофилами, в том числе при фагоцитозе грамположительных и грамотрицательных бактерий.

С другой стороны, слабо изученным остается вопрос о взаимодействии бактерий с цитокинами, хотя недавно показано, что бактериальные метаболиты (супернатанты бульонных культур микроорганизмов) способны инактивировать отдельные цитокины (INF- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 и др.), то есть проявлять «антицитокиновую» активность (Бухарин О.В. и соавт., 2011; Сычева М.В. и соавт., 2015). Кроме того, неизвестно могут ли бактерии секретировать в среду экзометаболиты, которые способны взаимодействовать со специфическими антителами к цитокинам и улавливаться известными тест-системами для их определения в исследуемых образцах.

Аналізу указанных вопросов посвящено настоящее исследование.

Цель исследования. Экспериментальное изучение цитокиновой активности нейтрофилов при фагоцитозе грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов при воздействии синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – ZP2.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Определить уровень цитокиновой продукции нейтрофилов в норме и при фагоцитозе различных бактерий.
2. Выявить наличие или отсутствие цитокиновой продукции у различных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.
3. Оценить влияние синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокинов грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами и нейтрофилами в процессе фагоцитоза микроорганизмов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Грамположительные, грамотрицательные бактерии и их супернатанты, способны как стимулировать, так и снижать секрецию цитокинов нейтрофилами, при этом направленность повышения/снижения зависит от вида и штамма бактерий.
2. Грамположительные и грамотрицательные бактерии обладают цитокиноподобной активностью, при этом наиболее выраженной активностью по спектру и концентрации цитокинов обладают штаммы *S.aureus*.
3. Синтетический пептид ZP2 способен снижать или повышать цитокиноподобную продукцию бактерий, а характер модификации их цитокиноподобной активности зависит от вида и штамма микроорганизмов и обладает выраженной вариабельностью.
4. Синтетический пептид ZP2 обладает выраженной стимуляцией цитокинопродукции *in vitro* как интактными нейтрофилами, так и в условиях воздействия на них грамположительных, грамотрицательных бактерий, их продуктов секреции, а бактерии и их продукты снижают цитокиновую секрецию активированных пептидом нейтрофилов.

Методология и методы исследований. Работа была выполнена на базе лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН (г. Екатеринбург). Были проведены биохимические, иммунологические и бактериологические исследования. Проводились эксперименты на 138 штаммах грамотрицательных и грамположительных культур бактерий (на музейных штаммах и изолятов, полученных от больных). Для получения и изучения клеток крови была использована кровь 60 доноров. Работа выполнена в рамках Плана научно-исследовательской деятельности ИИФ УрО РАН (г. Екатеринбург) (№ Гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, дата регистрации 06.02.2018). Все опыты проводились согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Критерием отбора доноров являлось отсутствие хронических воспалительных, аллергических,

аутоиммунных заболеваний, отсутствие приема антибактериальных, гормональных, иммуностроительных препаратов и наличие информированного согласия доноров на использование их биологического материала в научных целях. Согласно поставленной цели исследования были проанализированы цитокиноподобная активность бактерий различных видов, про- и антицитокиновая активность грамположительных и грамотрицательных бактерий и оценено влияние синтетического пептида ZP2 на цитокиновую активность нейтрофилов периферической крови в условиях взаимодействия нейтрофилы-бактерии/экзометаболиты бактерий-пептид.

Научная новизна и теоретическая значимость. Впервые показано, что синтетический пептид ZP2 активирует секрецию цитокинов гранулоцитами периферической крови (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , INF- γ , MIP-1 β).

Бактерии различных видов и продукты их жизнедеятельности способны как повышать уровень секреции цитокинов нейтрофилами, так и снижать их активность, этот процесс также связан с видом бактерий.

Впервые изучены новые свойства грамположительных и грамотрицательных бактерий – способность секретировать в культуральную среду цитокиноподобные вещества.

Показано, что наибольшей цитокиноподобной активностью, как по спектру, так и по уровню цитокинопродукции, обладали бактерии вида *S.aureus*.

Синтетический пептид ZP2 обладал способностью снижать/повышать цитокинопродукцию бактерий, при этом варибельность ответов зависела от вида и штамма микроорганизмов.

Применение синтетического пептида ZP2 повышает продукцию цитокинов нейтрофилами, при влиянии на них как самих бактерий, так и продуктов их секреции, независимо снижалась или повышалась активность цитокинопродукции нейтрофилов в ответ на воздействие только различных бактерий или их супернатантов. Бактерии и их продукты снижают в зависимости от вида и штамма микроорганизмов цитокиновую продукцию активированных пептидом нейтрофилов, а степень выраженности влияния зависит от вида изучаемых бактерий.

Практическая значимость работы. На основе полученных данных была разработана методология оценки цитокинового статуса фагоцитов (в частности, нейтрофилов), в том числе при их взаимодействии с грамположительными и грамотрицательными бактериями, их экзометаболитами и синтетическим пептидом ZP2, включая различные комбинации указанных факторов.

Показано, что в качестве дополнительных контролей необходимо определять цитокиноподобную активность бактерий и учитывать ее значение при исследованиях, в которых изучаются цитокиновый профиль на моделях взаимодействия бактерии-клетки-цитокины.

При сочетанном воздействии на фагоциты супернатантов бактерий и

препаратов цитокинов, обладающих иммуностропной, антимикробной и репаративной активностью, необходимо учитывать цитокиноподобную и антицитокиновую активность используемых в опытах микроорганизмов.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора

Достоверность полученных результатов исследования обусловлена широким спектром современных лабораторных и инструментальных исследований, достаточным объемом выборки. Достоверность результатов подтверждена актом проверки первичной документации, проведенной экспертной комиссией Института 15 июня 2019г. (на основании Приказа ИИФ УрО РАН № 5 от 14.06.2019).

Основные материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на конференциях иммунологов Урала (Калининград 2016, Челябинск 2017), 11, 12, 13 Всероссийских конференциях с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск 2016, 2017, 2018), Дни иммунологии в Санкт-Петербурге (2017). Личный вклад соискателя состоит в непосредственном выполнении всех этапов диссертационного исследования. Основная идея исследования, планирование научной работы, цели и задачи, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научными руководителями д.м.н., проф. Зурочкой А.В. и д.м.н., проф. Гриценко В.А. Часть экспериментов проводилась совместно с сотрудниками лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН (д.м.н., с.н.с. В.А. Зурочка, к.б.н., с.н.с. Е.Б. Зуева, м.н.с. М.А. Добрынина), лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН (аспирант Тяпаева Я.В., аспирант Белозерцева Ю.П.), НИИ Особо чистых биопрепаратов ФМБА России (д.б.н. Колобов А.А.)

Анализ современной зарубежной и отечественной литературы по изучаемой проблеме цитокинов и их синтетических аналогов был проведен лично диссертантом.

Сбор первичных материалов, статистическая обработка данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление диссертации, представление результатов работы в научных статьях и в виде докладов на конференциях осуществлялись соискателем лично.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ в том числе: в журналах из перечня ВАК – 12 публикаций (из них, 2 статьи – Scopus, РИНЦ, 10 статей – РИНЦ), статьи в рецензируемых журналах не входящих в перечень ВАК – 3 (РИНЦ).

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН (г.Екатеринбург), Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН ФГБУН Оренбургского федерального

исследовательского центра УрО РАН (г.Оренбург), НИИ Особо чистых биопрепаратов ФМБА РФ (г.Санкт-Петербург), в учебный процесс кафедры микробиологии и вирусологии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (г.Ростов-на-Дону), в производственную деятельность ООО «НПФ Верта» (г.Санкт-Петербург), ООО «Академический инновационный научный центр» (г.Челябинск), в медицинскую практику работы ООО «Медицинского лабораторного центра «Фамилия» (г. Челябинск).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, главы «Обзор литературы», главы «Материалы и методы», 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 122 источника, из них 55 иностранных и 67 отечественных. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 3 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящей главе нами представлены основные лабораторные и вспомогательные методы исследования для оценки иммуностропных и антибактериальных действия синтетического пептида – ZP2. Проведены эксперименты на 30 штаммах грамотрицательных и 108 штаммах грамположительных культур бактерий (как музейных штаммах, так и изолятов от больных пациентов). Для получения и изучения клеток крови была использована кровь 60 условно-здоровых доноров.

Синтез пептида. Нами была применена стандартная методика синтеза пептидных последовательностей активного центра ГМ-КСФ (синтетический пептид ZP2).

Синтез пептида ZP2 проводился твердофазным способом на синтезаторе «Applied Biosystems 430A» по методу *in situ* с использованием Na-Вос-защищенных производных аминокислот (Жемчугов В.Е. и соавт. 1996, 2005, Зурочка А.В. и соавт., 1995, 1996, 2017). Конечные продукты охарактеризованы данными аминокислотного и масс-спектрального анализов и аналитической ОФ ВЭЖХ. Аминокислотный состав полученных соединений и их молекулярный вес соответствовали теоретическим, чистота по данным аналитической ОФ ВЭЖХ была не менее 95 %. Был синтезирован пептид - ZP2 –THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO см.м. 1397 дальтон.

Методы оценки цитокиновой активности нейтрофилов и влияния на нее синтетического пептида ZP 2

Выделение лейкоцитов крови. Все процедуры осуществляются в силиконированной или пластиковой посуде. Венозная кровь взята в вакуумные пробирки с литий-гепарином (Хайдуков и соавт., 2014; L. Wong, R.D. Wilson, 1975), Нейтрофилы получали на двойном градиенте фиколл-верографина плотность нижнего градиента 1,093-1,095, верхнего – 1,075-1,077, объем – по 1,5 мл. Плазма с градиентами центрифугируется при 1500 оборотах в минуту в течение 40 минут.

Между градиентами располагается клеточное кольцо на 98-100 % состоящее из нейтрофилов. По окончании отмывания подсчитывается концентрация клеток в камере Горяева и доводится питательной средой 199 до 5×10^6 кл/мл нейтрофилов.

Метод оценки секреции цитокинов нейтрофилами *in vitro*. Нейтрофилы, выделенные на двойном градиенте фиколл-верографина (метод выделения описан нами ранее), довели после промывки до концентрации 5×10^6 клеток/мл, и инкубировали в среде RPNI-1640 в течение одного часа при 37°C в термостате. В опытных образцах добавляли синтетический пептид ZP2, бактерии в соотношении 1:20 к нейтрофилам (в концентрации 10^8 бактерий /мл) и супернатанты суточных культур бактерий в соотношении 1:10 (0,1 мл супернатанта на 1 мл клеточной взвеси нейтрофилов).

Влияние данного пептида (в дозе 20 мкг/мл), бактерий и их продуктов на секрецию цитокинов определяли на приборе MAGPIX-100 (USA), с использованием иммунофлюоресцентных мультиплексных тест-систем компании БиоРад (США) для определения 17 цитокинов (IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β) в супернатантах клеток после 1 часа инкубации с нейтрофилами. Дополнительными контролями служили среда RPMI-1640, и среда RPMI-1640 с добавлением пептида в той же концентрации. Полученные результаты округляли до 0,1- 0,9 пг/мл.

Методы оценки цитокиноподобной активности бактерий. В экспериментах использовали 138 музейных и клинических изолятов *S.aureus* (n=70), *S.epidermidis* (n=20), *S.haemolyticus* (n=10), *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* (n=8), *Ps.aeruginosa* (n=8), энтеробактерий – *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli* (n=22), выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы, из пустул у новорожденных детей с пиодермией, из влагиалища у женщин с миомой матки. 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 цитокиноподобных веществ (ЦПВ) определяли на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием тест-системы Multiplex (Luminex, США) для определения 15 цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , MCP-1, MIP-1 β , TGF- α); контролем служил МПБ без бактерий.

Статистические методы исследования. Результаты исследований обрабатывались на ПК под управлением операционной системы WindowsXP с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.02 (Лакин Г.Ф., 1990; Медик В.А. и соавт., 2000.)

Статистическая обработка результатов исследований проводилась стандартными методами с определением средней арифметической вариационного ряда (M) и ошибки средней арифметической (m). Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены в виде $M \pm m$, где M -

средняя арифметическая, m - стандартная ошибка средней. Статистически значимые различия оценивались по U - критерию Mann-Whitney. Статистически значимыми считались изменения при $p < 0,05$. (Лакин Г.Ф., 1990; Медик В.А. и соавт., 2000.)

Результаты и обсуждения. Изучение новых механизмов действия активных центров цитокинов является одной из актуальных проблем современной иммунологии.

Любые повреждения тканей макроорганизма, в том числе вызванные инфекционными агентами, в частности, стафилококками и энтеробактериями, сопровождаются воспалением и секрецией клетками иммунной системы различных цитокинов, регулирующих различные функции тканей организма (Р.М. Хаитов и соавт., 2013). Одними из первых в инфекционно-воспалительный процесс вовлекаются фагоцитарные клетки и, прежде всего, нейтрофилы. Эти клетки являются удобной моделью для оценки цитокинопродукции фагоцитами, в том числе при изучении влияния различных веществ на активацию у них секреции различных цитокинов. Эта клеточная модель также может быть успешно использована для определения особенностей реакции нейтрофилов при их контакте с живыми микроорганизмами, принадлежащими к разным таксонам и обладающими оппозитной патогенностью/вирулентностью.

Учитывая, что золотистый стафилококк (*S.aureus*) относится к приоритетным возбудителям многих эндогенных бактериальных инфекций, в том числе внутрибольничной локализацией, а коагулазоотрицательные стафилококки – КОС (*S.epidermidis* и др.) и *E.coli* принадлежат к индигенной (комменсальной, потенциально патогенной) микрофлоре макроорганизма (Гриценко В.А., Иванов Ю.Б., 2009; Гриценко В.А. и соавт., 2012), важным представлялось оценить межвидовую и внутриродовую вариабельность влияния стафилококков и кишечных палочек на продукцию цитокинов нейтрофилами в условиях *in vitro* – при взаимодействии фагоцитов с клиническими штаммами этих микроорганизмов.

В этой связи одной из задач настоящего исследования было провести анализ характера влияния клинических изолятов *S.aureus*, *S.epidermidis* и *E.coli* на секрецию широкого спектра цитокинов нейтрофилами человека *in vitro*.

Объектами исследования были нейтрофилы периферической крови 10 доноров, полученных путем центрифугирования плазмы крови на двойном градиенте фиколл-верографин плотностью 1,093-1,075. По окончании отмывания количество клеток подсчитывали в камере Горяева и концентрацию нейтрофилов довели питательной средой 199 до 5×10^6 кл/мл.

В экспериментах использовали 30 клинических изолятов *S.aureus* ($n=10$), *S.epidermidis* ($n=10$) и *E.coli* ($n=10$). Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне в течение 24 часов, трижды отмывали физиологическим раствором и бактериальную суспензию довели до концентрации 10^8 бактерий/мл.

Влияние стафилококков и кишечных палочек на секрецию цитокинов нейтрофилами определяли на приборе MAGPIX-100 (USA) с использованием тест-

системы мультиплексного анализа Bio-Plex компании Bio-Rad (USA) для определения 17 цитокинов в супернатантах клеток после 1 часа инкубации нейтрофилов с живыми бактериями в соотношении 1:20; контролями 1 и 2 соответственно служили среда RPMI-1640 и супернатант нейтрофилов, инкубированных в среде RPMI-1640 без бактерий.

Использованная в опытах *in vitro* тест-система для выявления 17 цитокинов эффективно выявляла изменение содержания этих соединений в среде, в частности, при их выделении неактивированными нейтрофилами (контроль 2 против контроля 1), что относилось, прежде всего, к IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IL-17A и GM-CSF, содержание которых в супернатанте нейтрофилов превышало контрольный уровень (среда RPMI-1640) в 1,2-7,0 раз ($p < 0,05-0,001$), а так же к хемокинам, таким как IL-8 и MIP-1 β , кратность увеличения, концентрации которых относительно контроля 1 составила 23,9 и 36,7 раза, соответственно (таблица 1).

Эти результаты, очевидно, указывают на то, что процедуры выделения, подготовки и инкубации в питательной среде нейтрофилов периферической крови человека способны частично активироваться.

Принимая во внимание вышеописанные обстоятельства, наиболее адекватным контролем при оценке влияния бактерий на продукцию/секрецию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека (опыт) следует считать контроль 2 (супернатант клеток).

Часовая инкубация нейтрофилов с бактериями приводила к изменению в супернатанте клеток (опыт 1 и 2) содержания ряда изученных цитокинов, что указывает на способность бактерий существенно влиять на «секретируемый цитокиновый профиль» нейтрофилов (таблица 1).

Выявленные эффекты повышения/снижения концентрации цитокинов в супернатанте нейтрофилов при контакте фагоцитов с бактериями имели разную степень выраженности и зависели от того, какие микроорганизмы инкубировались с ними – коагулозоположительные (*S.aureus*), коагулазоотрицательные (*S.epidermidis*) или *E.coli*.

Контакт стафилококков с фагоцитами приводил к изменению содержания в супернатанте нейтрофилов широкого круга цитокинов, однако достоверные отличия в сравнении с контролем 2 (вне зависимости от видовой принадлежности бактерий и характера изменений концентрации цитокинов) регистрировались только в отношении следующего спектра цитокинов: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-8, IL-17A, G-CSF, TNF- α и MIP-1 β .

Следует отметить, что коагулазоположительные стафилококки, преимущественно, стимулировали продукцию нейтрофилами цитокинов. Так, в супернатантах нейтрофилов после их контакта с *S.aureus* концентрация цитокинов IL-2, IL-10, IL-17A, G-CSF и TNF- α достоверно выросла в 1,3-2,1 раза, а содержание IL-1 β , который является одним из ключевых цитокинов при развитии воспалительного процесса, увеличилось в 16,02 раза по сравнению с контролем 2.

Вместе с тем было зафиксировано, что при инкубации нейтрофилов с *S.aureus* в супернатанте достоверно снижалась концентрация IL-6.

Принципиально иной характер влияния на содержание цитокинов в супернатанте нейтрофилов демонстрировали коагулазоотрицательные стафилококки – *S.epidermidis*.

Таблица 1. - Сравнительная характеристика содержания цитокинов в контрольных и опытных пробах, в том числе при контакте нейтрофилов с бактериями разных видов (M±m), n=10

Цитокины (пг/мл)	Среда RPMI-1640 (контроль 1)	Супернатант нейтрофилов (контроль 2)	Супернатант нейтрофилов + <i>S.aureus</i> (опыт 1)	Супернатант нейтрофилов + <i>S.epidermidis</i> (опыт 2)	Супернатант нейтрофилов + <i>E.coli</i> (опыт 3)
G-CSF	16,2±1,5	19,3±1,6	40,5±2,2 p ₁ , p ₂ <0,05	17,0±2,7	22,0±1,5 p ₁ <0,05
GM-CSF	210,2±6,2	250,3±5,6 p ₁ <0,05	252,8±3,4 p ₁ <0,05	234,5±7,3 p ₁ <0,05	251,3±6,6 p ₁ <0,05
IL-10	32,2±2,6	35,4±3,4	46,1±4,4 p ₁ , p ₂ <0,05	35,3±4,0	37,3±0,9
IL-12p70	13,3±1,7	23,5±1,6 p ₁ <0,05	28,3±3,1 p ₁ <0,05	20,5±1,5 p ₁ <0,05	34,0±1,2 p ₁ <0,05
INF-γ	13,2±1,3	13,5±1,5	14,2±0,7	12,5±1,7	15,3±0,9
IL-13	10,1±1,1	11,4±1,3	11,5±0,5	10,6±1,8	12,0±0,6
IL-17A	29,5±2,6	62,5±5,6 p ₁ <0,05	117,2±9,8 p ₁ , p ₂ <0,05	46,8±5,3 p ₁ , p ₂ <0,05	145,7±14,7 p ₁ , p ₂ <0,05
IL-1β	13,4±1,5	42,3±3,4 p ₁ <0,05	677,8±89,9 p ₁ , p ₂ <0,05	40,5±4,2 p ₁ <0,05	147,0±10,5 p ₁ и p ₂ <0,05
IL-2	35,5±3,5	38,4±4,5	53,3±5,3 p ₁ , p ₂ <0,05	33,2±2,8	40,7±1,5
IL-4	17,3±1,8	23,5±2,4 p ₁ <0,05	24,5±1,9 p ₁ <0,05	21,5±1,9 p ₁ <0,05	35,2±2,0 p ₁ , p ₂ <0,05
IL-5	9,1±1,1	9,5±1,3	9,6±0,9	9,7±2,3	10,0±0,6
IL-6	17,6±1,8	122,5±9,7 p ₁ <0,05	81,5±7,8 p ₁ , p ₂ <0,05	39,6±3,8 p ₁ , p ₂ <0,05	658,0±185,0 p ₁ , p ₂ <0,05
IL-7	10,3±1,2	12,5±1,6	11,8±1,3	10,5±1,2	14,7±0,7
TNF-α	15,3±1,8	16,2±1,9	22,3±1,4 p ₁ , p ₂ <0,05	16,1±1,7	37,7±1,2 p ₁ , p ₂ <0,05
IL-8	13,4±2,3	320,9±14,5 p ₁ <0,001	305,1±15,4 p ₁ <0,01	59,7±2,4 p ₁ и p ₂ <0,001	1244,8±229,4 p ₁ , p ₂ <0,001
MCP-1,	12,7±1,8	12,4±1,9	13,4±1,2	12,4±1,7	13,7±0,7
MIP-1β	40,7±4,8	1492,8±72,7 p ₁ <0,001	1319,5±71,7 p ₁ <0,01	564,2±88,9 p ₁ , p ₂ <0,001	5466,5±384,5 p ₁ , p ₂ <0,001

Примечание: p₁ - достоверность различий по отношению к среде RPMI-1640 (контроль 1); p₂ - достоверность различий по отношению к супернатантам нейтрофилов (контроль 2).

В отличие от золотистого стафилококка, изученные клинические штаммы *S.epidermidis* вызывали существенное (в 1,34-5,38 раза) снижение концентрации в супернатанте нейтрофилов таких цитокинов, как IL-6, IL-8, IL-17A и MIP-1β.

При изучении влияния *E.coli* на содержание цитокинов в супернатанте нейтрофилов получены результаты, во многом похожие на действие *S.aureus*, но

имеющие свои особенности. Так, *E.coli* стимулировали продукцию/секрецию следующих цитокинов, таких как ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17А, TNF- α и MIP-1 β . При этом надо отметить, что концентрация цитокинов в супернатанте нейтрофилов, фагоцитировавших кишечные палочки, возрастала в среднем в 1,5-5,4 раза, а наиболее выраженный рост концентрации был выявлен у ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и MIP-1 β .

При сравнении влияния стафилококков разных видов на содержание цитокинов в супернатантах нейтрофилов зафиксированы достоверные межвидовые особенности цитокинового ответа фагоцитов после их контакта с бактериями. Так, в супернатантах нейтрофилов, инкубированных с *S.aureus*, определялись значительно (в 1,31-16,73 раза) более высокие концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17А, TNF- α , G-CSF и MIP-1 β , чем в опыте 2 с *S.epidermidis*, что, очевидно, отражает более выраженную продукцию цитокинов нейтрофилами в ответ на контакт фагоцитов с патогенными бактериями в сравнении с комменсальными микроорганизмами, к которым относятся коагулазонегативные стафилококки.

Следует отметить, что представленные данные актуализируют вопрос о расшифровке механизмов влияния бактерий с оппозитной патогенностью (и, следовательно, симбиотической ролью: паразит – комменсал – мутуалист) на профессиональные и непрофессиональные фагоциты макроорганизма (нейтрофилы, макрофаги и др.) и секрецию ими регуляторных молекул – цитокинов. В этом аспекте снижение содержания ряда цитокинов (в частности, хемокинов ИЛ-8 и MIP-1 β) в супернатантах нейтрофилов при их контакте с *S.epidermidis* допустимо рассматривать как с точки зрения супрессии их продукции фагоцитами, так и с позиций возможной инактивации указанных цитокинов бактериями или их сорбции на поверхности микроорганизмов, поскольку недавно у грамположительных кокков (в частности, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* и др., выделенных из кишечника при эубиозе и патологического материала при инфекционно-воспалительных заболеваниях) охарактеризована антицитокиновая активность в отношении ИЛ-4, ИЛ-8 и ИФН- γ (Сычева М.В. и соавт., 2015). И, наоборот, выявленная стимуляция цитокинов *E.coli*, а они стимулируют, в первую очередь, провоспалительные цитокины начального иммунного ответа и хемокины, привлекающие в очаг воспаления нейтрофилы и макрофаги/дендритные клетки, возможно, связаны с их важнейшей ролью формирования физиологического воспаления в кишечнике и поддержанием колонизационной резистентности (Гриценко В.А., Иванов Ю.Б., 2009).

В тоже время остается неясным вопрос – а способны ли сами бактерии секретировать в среду инкубации цитокины или цитокиноподобные вещества (ЦПВ). Поэтому мы оценили способность различных грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов секретировать цитокиноподобные вещества. Задачей данного этапа исследований явился поиск ЦПВ в супернатантах суточных бульонных культур грамположительных и грамотрицательных бактерий.

В экспериментах использовали 61 клинический изолят *S.aureus* (n=23),

S.haemolyticus(n=10), *Enteroc. faecalis* и *Enteroc. faecium*(n=8), *Ps.aeruginosa*(n=8), энтеробактерий – *Klebs. pneumoniae* и *E.coli* (n=12), выделенные из влагалища у женщин с миомой матки, из ран у больных с синдромом диабетической стопы, из пустул у новорожденных с пиодермией. Бактерии также выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение суток, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин и отбирали надосадочную жидкость (супернатант).

Наличие в супернатантах бактерий цитокиноподобных веществ (ЦПВ) определяли на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием тест-системы Multiplex (Luminex, США) для определения 15 цитокинов; контролем служил МПБ без бактерий.

Установлено, что в супернатантах бульонных культур бактерий обнаруживаются те или иные ЦПВ, наличие и концентрация которых зависели от видовой/родовой и штаммовой принадлежности микроорганизмов. Наиболее активными продуцентами ЦПВ оказались штаммы *S.aureus* (см. таблица 2).

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 пг/мл), а их концентрация варьировала широком диапазоне значений.

Таблица 2 – Характеристика продукции цитокиноподобных веществ (ЦПВ) клиническими изолятами *S. aureus* (n=23) в супернатанты

Цитокины	Диапазон (min-max) концентраций ЦПВ во всей выборке штаммов (пг/мл)	Средний уровень ЦПВ во всей выборке штаммов (M \pm m, пг/мл)	Доля штаммов-продуцентов ЦПВ (%)	Диапазон (min-max) концентраций ЦПВ у штаммов-продуцентов (пг/мл)	Средний уровень ЦПВ у штаммов-продуцентов (M \pm m, пг/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	-	-

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*.

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 большей долей в выборке *S.aureus* штаммов-продуцентов; в частности, это относилось к G-CSF, IFN- 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 пг/мл, соответственно.

Таким образом, клинические изоляты золотистого стафилококка оказались способными спонтанно синтезировать и продуцировать в культуральную среду (супернатант) 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 пг/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*.

Бактерии остальных таксонов в порядке убывания числа продуцируемых ЦПВ распределились в ряд: *S.haemolyticus* (7 цитокинов – G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-12p70, IL-17A, IL-1 β , MIP-1 β), *Enterococcus spp.* (4 – G-CSF, INF- γ , IL-12p70, IL-17A), *K.pneumonia*, *E.coli* и *Ps.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 пг/мл. При этом максимальные (штаммовые и средние) значения концентраций ЦПВ регистрировались у изолятов *S.aureus* и *S.haemolyticus*. Следует отметить, что 5 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-12p70, IL-17A) тестировались в супернатантах у ряда изолятов *S.aureus*, *S.haemolyticus* и *Enterococcus faecalis* в относительно высоких концентрациях (>20 пг/мл), другие ЦПВ в изученных образцах либо не обнаруживались, либо их уровень был ниже указанного порога.

Хотелось бы отметить тот факт, что, в целом, как по разнообразию цитокиноподобных веществ, так и по уровню их секреции грамположительные бактерии значительно превосходят грамотрицательные бактерии.

Не исключено, что эта особенность связана не только с различиями в строении бактерий, но и с возможностями генома бактерий захватывать генетический материал организма-«хозяина» и использовать его в условиях инвазии при развитии воспаления, для облегчения прохождения защитных систем организма. Обращает на себя внимание тот факт, что все цитокиноподобные продукты относятся или к ростовым факторам, или к провоспалительным цитокинам, обладающим выраженными плейотропными эффектами и, возможно, служат дополнительным фактором выживания и персистенции бактерий внутри организма.

Учитывая, что бактерии способны продуцировать множество соединений идентичных продуктам секреции клеток организма человека и животных (лизоцим, катехоламины, гормоны, различные ферменты) (Олескин А.В., 2009, Цавкелова Е.А., и соавт., 2000), выявление феномена секреции цитокиноподобных веществ, относящихся к регуляторным факторам, может открыть совершенно новое направление исследований, связанное с эволюцией бактерий в условиях их взаимодействия с многоклеточными организмами. При оценке влияния бактерий и, особенно, их супернатантов на продукцию/секрецию цитокинов иммунокомпетентными клетками и, в частности, фагоцитами необходимо учитывать воздействие на клетки цитокиноподобных субстанций, способных влиять на цитокиновый потенциал эукариотических клеток.

В дальнейшем мы провели оценку влияния синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокиноподобных веществ бактериями и, в первую очередь, стафилококков.

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 влагиалища у женщин с миомой матки и содержимого пустул у новорожденных с пиодермией (коллекция ИКВС УрО РАН).

Наличие в супернатантах бактерий цитокиноподобных веществ (ЦПВ) фиксировали на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием тест-системы Multiplex (Luminex, США) для определения 15 цитокинов; отрицательным контролем служил МПБ без бактерий.

Для изучения влияния синтетического пептида ZP2 на продукцию ЦПВ 16 штаммами *S.aureus* пептид ZP2 добавляли в МПБ в конечной концентрации 10 мкг/мл, куда вносили взвеси бактерий (опыт); контролем служили культуры без добавления в МПБ синтетического пептида ZP2. Получение супернатантов и определение в них ЦПВ осуществляли вышеописанными способами.

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) ЦПВ 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). Установлено, что эталонный штамм *S.aureus* 209P (ATCC 6538-P) обладает способностью секретировать в культуральную среду большой набор ЦПВ (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-12(p70), IL-13, IL-17A,G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β), причем, их

концентрация варьировала в достаточно широком диапазоне – от 3,5 до 166,9 пг/мл. Условно можно считать, что данный штамм *S.aureus* не являлся продуцентом ЦПВ, «сходным» с IL-5, IL-6, IL-10 и TGF- α , так как их концентрации в супернатантах были ниже установленного порога (3 пг/мл), сопоставимого с ошибкой метода: 2,8; 1,1; 2,2 и 1,9 пг/мл соответственно.

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 (рисунок 1 и 2).

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 пг/мл; $p < 0,05$).

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

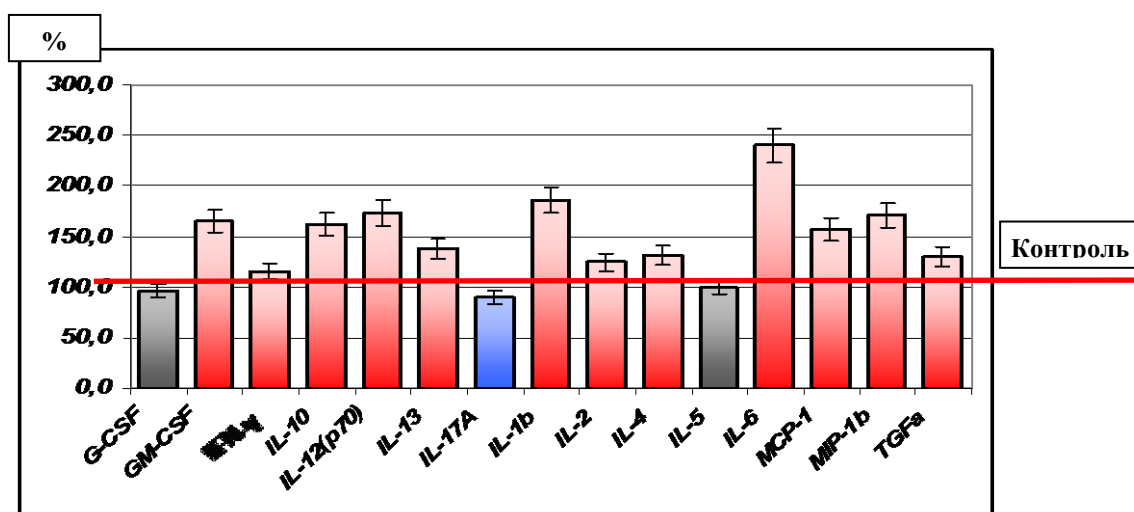


Рисунок 1 - Влияние синтетического пептида ZP2 на продукцию ЦПВ эталонным штаммом *S.aureus* 209P (ATCC 6538-P)

Примечание: ось ординат – уровень соответствующих ЦПВ в опыте относительно контроля (%); красная линия – уровень ЦПВ в контроле, принятый за 100 %.

Эти результаты были учтены при анализе влияния синтетического пептида ZP2 на продукцию ЦПВ 15 клиническими изолятами *S.aureus* (Рис. 2).

Добавление в питательную среду (МПБ) синтетического пептида 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).

Кроме того, вариабельность ответной реакции клинических штаммов золотистого

стафилококка проявлялась и в степени выраженности изменения продукции ЦПВ под действием синтетического пептида ZP2.

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 и 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).

В то же время у определенной части (20,0-66,7%) клинических изолятов 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 IL-1 β и IL-2, GM-CSF, 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.

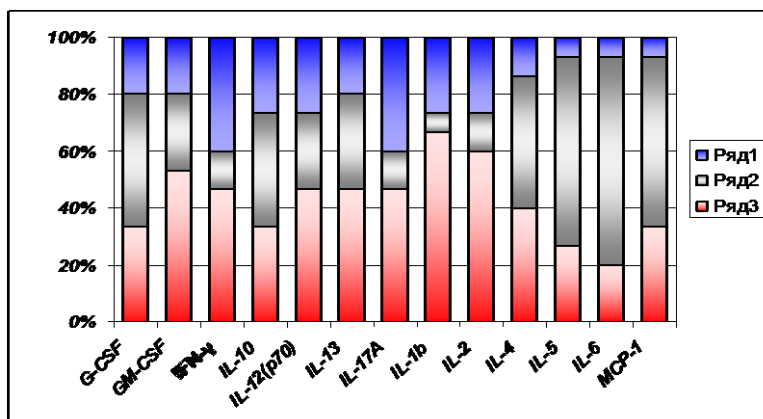


Рисунок 2 - Структура штаммов *S.aureus* с учетом эффектов воздействия синтетического пептида ZP2 на продукцию бактериями цитокиноподобных веществ (ЦПВ)

Примечание: ось ординат – доля штаммов с соответствующей реакцией на синтетический пептид ZP2 (%); Ряд 1 - ингибирование продукции ЦПВ; ряд 2 – индифферентное влияние; ряд 3 – стимулирование продукции ЦПВ (n=15).

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 ($+283,9 \pm 79,0$ %) 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 ZP2.

В теоретическом ключе полученные результаты, во-первых, отражают способность

золотистых стафилококков спонтанно (конститутивно) продуцировать 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 пг/мл), сопоставимых с уровнем этих цитокинов в супернатантах активированных нейтрофилов (Зурочка В.А., 2016).

При оценке других видов бактерий была получена во многом похожая картина, но степень вариабельности была значительно ниже, что, возможно, связано, с одной стороны, как с низкой цитокиноподобной активностью, а с другой стороны, с меньшим количеством выявляемых цитокинов. Так, при наличии в среде данного пептида у всех культур энтерококков регистрировалось снижение в супернатантах уровня продуцируемых ими ЦПВ (G-CSF, INF- γ , IL-12p70, IL-17A) на 58,5-98,3 %, тогда как у энтеробактерий (*K.pneumoniae* и *E. coli*) уменьшение концентрации G-CSF наблюдалось только у 33,3 % культур, а у остальных изолятов фиксировалось повышение уровня G-CSF в 2,2-2,5 раза. В контроле (МПБ) ЦВП не были выявлены.

Полученные ранее данные свидетельствуют о том, что синтетический пептид ZP2 вызывал ускорение дифференцировки стволовых кроветворных клеток в нейтрофилы и наличие хемотаксических рецепторов к нему на них (Зурочка В.А., 2016), было важно определить, обладает ли он свойствами, характерными для основного цитокина ГМ-КСФ, – усиливать секрецию различных цитокинов клетками, в том числе и нейтрофилами периферической крови. Учитывая это, необходимо было разработать методику оценки секреции нейтрофилами цитокинов при короткой инкубации в питательной среде и оценить возможность исследования секреции цитокинов при кратковременной инкубации с биологически активными веществами.

С этой целью исследовали уровень спонтанной и индуцированной синтетическим пептидом ZP2 продукции 17 цитокинов в супернатантах нейтрофилов после 1 часовой инкубации при 37°C в среде RPMI-1640 с и без добавления пептида.

Инкубация нейтрофилов с синтетическим пептидом ZP2 оказывала заметное влияние на секрецию значительного количества цитокинов.

При этом важно отметить, что тест-система на выявление ГМ-КСФ показывает увеличение концентрации ГМ-КСФ в среде RPMI-1640 при инкубации с пептидом. Это, возможно, говорит о том, что тест-система в какой-то мере улавливает пептид ZP2, как гомолог самого цитокина, но, скорее всего, степень связывания его не велика из-за незначительного размера пептида.

При спонтанной продукции цитокинов после 1 часовой инкубации в среде RPMI-1640 нейтрофилы способны секретировать в окружающую среду (супернатант) цитокины, такие как IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, GM-CSF, MIP-1 β . Инкубация нейтрофилов с синтетическим пептидом активного центра ГМ-КСФ, с одной стороны, вызывает достоверное увеличение спектра секретлируемых клетками цитокинов, а с

другой стороны, резко увеличивает продукцию ряда цитокинов. Так, синтетический пептид ZP2 стимулировал секрецию цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β , при этом наиболее выраженное усиление секреции было выявлено для IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 β . Учитывая, что в течение 1 часа такое количество цитокинов не могло быть синтезировано, то, скорее всего, в среду инкубации секретируются уже пресинтезированные внутриклеточные цитокины (преформированные).

На следующем этапе исследований мы сравнили воздействие синтетического пептида ZP2 на активность цитокинопродукции нейтрофилов при комбинированном воздействии стафилококков различных видов на клетки (таблица 3).

S.epidermidis при совместном культивировании с пептидом ZP2 блокирует активацию продукции цитокинов нейтрофилами (15 из 17 изученных). Несколько иначе себя ведут *S.aureus*. Они блокируют активацию цитокинопродукции 11 цитокинов, но достоверно стимулируют продукцию 3 цитокинов (G-CSF, IL-1 β , IL-2). Возможно, такие различия как-то связаны с цитокиноподобными веществами, секретируемыми самими бактериями, поэтому следующим этапом наших исследований было проведение оценки влияния супернатантов этих бактерий на продукцию цитокинов нейтрофилами при воздействии на них синтетического пептида ZP2.

Супернатанты бактерий практически повторяют механизм воздействия на цитокинопродукцию активированных пептидом нейтрофилов. Так, супернатанты *S.epidermidis* снижали секрецию чуть меньшего количества цитокинов – 11 из 17 изученных (сами бактерии 15 из 17). Несколько иначе вели себя супернатанты *S. aureus* по сравнению с живыми бактериями. В частности, супернатанты *S.aureus* либо угнетали продукцию цитокинов (10 из 17), либо, в отличие от самих бактерий, достоверно не влияли на их секрецию при комбинации с пептидом ZP2 (7 из 17 изученных цитокинов).

Возможно, что живые бактерии обладают более выраженным арсеналом воздействия на нейтрофилы, по сравнению с продуктами их секреции. Чтобы проверить данное предположение, мы сравнили характер воздействия бактерий и продуктов их метаболизма на цитокинопродукцию нейтрофилов с и без активации пептидом ZP2.

S.epidermidis практически полностью отменяет воздействие на нейтрофилы пептида ZP2, за исключением секреции IL-8. В то время как, по сравнению с *S.aureus*, под действием пептида увеличивается секреция 5 цитокинов (G-CSF, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-6) все остальные либо не изменялись, либо наблюдалась лишь тенденция к их повышению. Поэтому важно было сравнить активацию цитокинопродукции продуктами секреции бактерий и их комбинации с пептидом ZP2.

В отличие от живых бактерий депрессивный потенциал супернатантов значительно ниже. Так при воздействии супернатантов *S.epidermidis* пептид ZP2 стимулировал цитокинопродукцию 10 цитокинов (живые бактерии подавляли практически все). Супернатант *S.aureus* подавлял продукцию G-CSF и IL-1 β при воздействии пептида, но в то же время не ингибировал секрецию IL-17A, IL-4, IL-6, IL-8, MIP-1 β . Все это свидетельствует о том, что у живых бактерий значительно более высокий потенциал блокировки активации цитокинопродукции нейтрофилов, по

сравнению с продуктами их жизнедеятельности.

В то же время, на наш взгляд, эта модель может быть успешно использована для определения особенностей реакции нейтрофилов при их контакте с живыми микроорганизмами, принадлежащими к разным таксонам и обладающими оппозитной патогенностью/вирулентностью.

Таблица 3 - Сравнительная характеристика содержания цитокинов в супернатанте клеток при контакте нейтрофилов со стафилококками разных видов и пептидом ZP2 (M±m), n=10

Цитокины	Супернатант нейтрофилов (контроль 1)	Супернатант нейтрофилов + ZP2 (контроль 2)	Супернатант нейтрофилов + S.aureus + ZP2 (опыт 1)	Супернатант нейтрофилов + S.epidermidis + ZP2 (опыт 2)
G-CSF пг/мл	19,3±1,6	34,6±2,7 p ₁ <0,05	55,8±3,8 p ₂ <0,05	18,5±1,5 p ₂ <0,05
GM-CSF пг/мл	250,3±5,6	277,6±7,3 p ₁ <0,05	249,1±6,2 p ₂ <0,05	238,5±8,5 p ₂ <0,05
IL-10 пг/мл	35,4±3,4	42,3±4,3 p ₁ <0,05	52,0±4,3	35,5±2,5 p ₂ <0,05
IL-12p70 пг/мл	23,5±1,6	60,5±4,2 p ₁ <0,05	34,8±10,5 p ₂ <0,05	20,5±3,5 p ₂ <0,05
INF-γ пг/мл	13,5±1,5	23,6±2,7 p ₁ <0,05	14,6±0,9 p ₂ <0,05	12,5±0,5 p ₂ <0,05
IL-13 пг/мл	11,4±1,3	18,6±3,8 p ₁ <0,05	12,0±0,6 p ₂ <0,05	11,0±1,0 p ₂ <0,05
IL-17A пг/мл	62,5±5,6	337,8±11,8 p ₁ <0,001,	152,3±8,4 p ₂ <0,01	46,0±11,0 p ₂ <0,05
IL-1β пг/мл	42,3±3,4	287,5±16,8 p ₁ <0,01	930,5±38,9 p ₂ <0,01	50,0±6,0 p ₂ <0,01
IL-2 пг/мл	38,4±4,5	49,2±6,8	73,8±7,4 p ₂ <0,05	34,0±2,0 p ₂ <0,05
IL-4 пг/мл	23,5±2,4	53,5±5,9 p ₁ <0,05	25,3±1,3 p ₂ <0,05	21,8±2,3 p ₂ <0,05
IL-5 пг/мл	9,5±1,3	12,7±2,3	10,3±0,5	10,0±1,0
IL-6 пг/мл	122,5±9,7	1574,6±76,8 p ₁ <0,001	132,6±22,8 p ₂ <0,001	48,5±25,5 p ₂ <0,001
IL-7 пг/мл	12,5±1,6	18,6±2,2 p ₁ <0,05	12,8±0,8 p ₂ <0,05	11,0±1,0 p ₂ <0,05
TNF-α пг/мл	16,2±1,9	67,7±6,7 p ₁ <0,05	21,5±1,9 p ₂ <0,05	16,5±0,5 p ₂ <0,05
IL-8 пг/мл	320,9±14,5	3541,7±211,4 p ₁ <0,001	374,5±76,6 p ₂ <0,001	167,0±29,0 p ₂ <0,05
MCP-1 пг/мл	12,4±1,9	19,4±3,7	13,8±0,5	12,5±1,5
MIP-1β пг/мл	1492,8±72,7	12538,2±768,9 p ₁ <0,001	1438,1±305,1 p ₂ <0,001	741,3±156,8 p ₂ <0,05

Примечание: p₁ – достоверность различий по отношению к супернатантам нейтрофилов; p₂ - по отношению к супернатантам нейтрофилов, активированных синтетическим пептидом ZP2

Учитывая, что грамотрицательные микроорганизмы обладают самым низким цитокиноподобным потенциалом, по сравнению с грамположительными микроорганизмами, было важно оценить влияние синтетического пептида ZP2 на

способность нейтрофилов секретировать цитокины в условиях воздействия на них грамотрицательных бактерий и их метаболитов.

Как показали наши исследования, бактерии вида *E.coli* и их метаболиты способны усиливать секрецию нейтрофилами широкого спектра провоспалительных цитокинов (11 из 17 исследованных цитокинов). Синтетический пептид ZP2 также стимулировал продукцию цитокинов нейтрофилами, при этом спектр и степень активации их выше, чем у бактерий и их метаболитов (14 цитокинов из 17 исследованных). При анализе комбинаторного воздействия бактерий, их метаболитов и синтетического пептида ZP2, было выявлено, что комбинаторные воздействия, в целом, приводят к снижению активности пептида практически по всем провоспалительным цитокинам (11 из 17 изученных).

Разработанная нами модель оценки систем цитокиновой регуляции клеток при различных вариантах воздействия позволяет получить новые данные о механизмах регуляции воспалительного процесса, где нейтрофилы, цитокины, бактерии и их метаболиты играют важную роль.

Поэтому, полученные нами результаты о блокировании/снижении регуляторного потенциала активированных иммуностимулятором клеток должны учитываться для правильной характеристики патогенеза формирования процессов в системе взаимодействия паразит-хозяин в условиях инфекционного воспаления, вызванного, в том числе, условно-патогенными микроорганизмами.

Возможно, такой механизм подавления цитокиновой активности активированных клеток способствует выживанию (персистенции) данных микроорганизмов в организме человека при развитии инфекционного процесса, вызванного как грамположительными, так и грамотрицательными микроорганизмами.

Таким образом, при контакте бактерий и их продуктов с профессиональными фагоцитами могут возникать сложные комбинаторные взаимовлияния, связанные, с одной стороны, с продукцией цитокиноподобных веществ самими бактериями, а с другой стороны, с подавлением бактериями цитокиновой активности нейтрофилов. Синтетический пептид ZP2 может частично преодолевать негативное влияние бактерий. По-видимому, при выраженном гнойном воспалении необходимо применять пептид в более высоких концентрациях и более длительное время.

ВЫВОДЫ

1. Синтетический пептид ZP2 вызывает стимуляцию секреции преформированных цитокинов нейтрофилов (12 из 17 изученных цитокинов), при этом наиболее выраженное усиление секреции было выявлено для 5 цитокинов- IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 β .

2. Бактерии различных видов способны как стимулировать, так и угнетать секрецию цитокинов нейтрофилами, вариабельность стимуляции/ингибирования связана с видом микроорганизмов.

3. Грамположительные и грамотрицательные бактерии обладают цитокиноподобной активностью, при этом штаммы *S.aureus* продуцируют наибольшее количество цитокиноподобных веществ, как по спектру, так и уровню секреции.

4. Выявлено, что синтетический пептид ZP2 изменяет цитокиноподобную

активность бактерий, а стимуляция/ингибирование продукции зависит от вида и штамма микроорганизмов.

5. Грамположительные и грамотрицательные бактерии и их продукты при сравнении с активацией нейтрофилов только синтетическим пептидом ZP2, значительно снижают цитокиновую активность стимулированных фагоцитов.

6. Синтетический пептид ZP2, по сравнению с влиянием бактерий и их продуктов жизнедеятельности, частично стимулирует продукцию цитокинов нейтрофилами, при этом ингибирующий эффект живых бактерий значительно выше, чем продуктов их секреции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанную методологию оценки цитокинового статуса нейтрофилов можно использовать для определения влияния различных факторов на продукцию фагоцитами цитокинов.

2. При изучении содержания цитокинов в инфицированных биоматериалах требуется учитывать цитокиноподобную и антицитокиновую активность сопутствующих бактерий.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в научных изданиях, рецензированных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных реферативных базах данных Scopus, PubMed:

1. Спектр иммунобиологической активности и потенциал практического применения синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, **В.В.Дукардт**, О.И. Забков, Е.Б. Зуева, Л.О. Фомина, А.И. Файзуллина, В.А.Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2018. Т.12 (21), № 4. С. 665-669. DOI: 10.31857/S102872210002632-0 (РИНЦ – 0,656, PubMed).

2. Бактерии как продуценты цитокиноподобных веществ / А.В. Зурочка, **В.В. Дукардт**, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, Я.В.Тяпаева, В.А.Гриценко// Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11 (20), № 3. С.374-376 (РИНЦ – 0,512, PubMed).

3. Влияние синтетического пептида активного центра GM-CSF на продукцию бактериями цитокиноподобных веществ в бульонных культурах / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, **В.В. Дукардт**, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, Я.В. Тяпаева, В.А.Гриценко// Медицинская иммунология. 2017. Т. 19, спец. вып. С. 33-34 (Scopus – 0,03, РИНЦ – 0,797).

4. Исследование спектра иммунобиологической активности синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) как основа для расширения возможностей создания косметических средств нового поколения с комбинированными эффектами / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, **В.В.Дукардт**, И.Н. Лаврентьева, Л.П. Сухобаевская, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2017. Т.11 (20), № 3. С. 377-380. (РИНЦ – 0,512, PubMed).

5. Оценка уровней цитокиноподобных веществ в супернатантах культур бактерий / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, **В.В.Дукардт**, Я.В. Тяпаева, В.А. Гриценко // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, С. 32-33 (Scopus – 0,03, РИНЦ – 0,797).

6. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), спектр его иммунобиологической активности и практическое применение / А.В. Зурочка, **В.В.Дукардт**, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, Я.В. Тяпаева, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2017. Т.11 (20), № 2. С.137-140 (РИНЦ – 0,512, PubMed).

7. Стафилококки как продуценты цитокиноподобных веществ / А.В. Зурочка,

В.В. Дукардт, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, Я.В. Тяпаева, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2017. Т.11 (20), №2. С.134-136 (РИНЦ – 0,512, PubMed).

8. Влияние стафилококков на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, **В.В. Дукардт**, Я.В. Тяпаева, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2016. Т.10 (19), № 1. С.73-80 (РИНЦ – 0,389, PubMed).

9. Продукция цитокинов нейтрофилами периферической крови человека при воздействии синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), бактерий и их супернатантов / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, **В.В. Дукардт**, Я.В. Тяпаева, Ю.В. Белозерцева, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2016. Т.10 (19), № 2 (1). С.429-432 (РИНЦ – 0,634, PubMed).

10. 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 / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, **В.В. Дукардт**, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10 (19), № 3. С.269-272 (РИНЦ – 0,634, PubMed).

11. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) как основа для создания лекарств нового поколения с комбинированными свойствами / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, **В.В. Дукардт**, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2016. Т.10 (19), № 2 (1). С.433-435 (РИНЦ – 0,634, PubMed).

12. 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 / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, **В.В. Дукардт**, Ю.П. Белозерцева, П.П. Курлаев, Я.В. Тяпаева, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2016. Т.10 (19), № 4. С.430-433 (РИНЦ – 0,634, PubMed).

Публикации в других изданиях:

13. *Staphylococcus aureus*: спонтанная продукция цитокино-подобных веществ и её регуляция синтетическим аналогом активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) / А.В. Зурочка, **В.В. Дукардт**, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, Ю.В. Белозерцева, Я.В. Тяпаева, В.А. Гриценко // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: [электр. ресурс]. 2017. № 1. С. 1-15 (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-1/Articles/ZAV-2017-1.pdf>). doi10.24411/2304-9081-2017-00016 (РИНЦ – 0,366).

14. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, **В.В. Дукардт**, В.А. Гриценко, Я.В. Тяпаева, В.А. Черешнев // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: [электр. ресурс]. 2016. № 2. С. 1-30. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>) (РИНЦ – 0,330).

15. Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, **В.В. Дукардт**, С.В. Черкасов, В.А. Гриценко // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: [электр. ресурс]. 2015. № 4. С.1-11 (РИНЦ – 0,258).

Список сокращений

ИЛ 1-n –интерлейкины

ЦПВ – цитокиноподобные вещества

INF γ - интерферон γ

TNF- фактор некроза опухоли

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

G-CSF - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ДУКАРДТ ВИКТОР ВЛАДИМИРОВИЧ

**ОСОБЕННОСТИ СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ НЕЙТРОФИЛАМИ ПРИ
ФАГОЦИТОЗЕ БАКТЕРИЙ И ВОЗДЕЙСТВИИСИНТЕТИЧЕСКОГО
ПЕПТИДА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГМ-КСФ)**

14.03.09 -клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Подписано в печать 11.10.2019.

Формат 60 × 84 ¹/₁₆. Усл. печ. л. 1,0.

Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman сур.

Печать лазерная. Тираж 100 экз. Заказ № 2579/19.

Отпечатано в ПЦ «ПРИНТМЕД» (ИП Шарифулин Р. Г.)
454080, г. Челябинск, ул. Энтузиастов, 25а. Тел. +7 351 230-67-37. E-mail: rinmed@mail.ru