

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт иммунологии и физиологии
Уральского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

УДК: 616.155.34 - 097

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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Зурочка А.В., доктор медицинских наук
профессор;

Гриценко В.А., доктор медицинских
наук, профессор

Екатеринбург – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

	С.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1 – Различные биологические свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF)	11
1.1 – Характеристика и структура GM-CSF	11
1.2 – Клеточные мишени и основные механизмы действия для GM-CSF	12
1.3 – Характеристика рецептора GM-CSF	13
1.4 – Лиганд-рецепторные взаимодействия GM-CSF/GM-CSFR	14
1.5 – Передача сигналов GM-CSF	15
1.6 – Механизмы воспаления и GM-CSF	16
1.7 – Активация и регулирование иммунной системы и GM-CSF	16
1.8 – Синтетические пептиды активного центра GM-CSF и их иммунобиологические свойства	20
ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	29
2.1 – Синтез пептида	29
2.2 – Методы оценки цитокиновой активности бактерий, нейтрофилов и влияния на них синтетического пептида ZP2	30
2.2.1 – Методы выделения клеток	30
2.2.2 – Метод оценки секреции цитокинов нейтрофилами in vitro	31
2.2.3 – Методы оценки цитокиновой активности бактерий	32
2.3 – Статистические методы исследования	32
ГЛАВА 3 – ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ И ИХ ПРОДУКТОВ НА ЦИТОКИНОВУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ	34
3.1 – Влияние синтетического пептида ZP2 на	34

продукцию цитокинов нейтрофилами <i>in vitro</i>	
ГЛАВА 4 – ЦИТОКИНОПОДОБНАЯ ПРОДУКЦИЯ БАКТЕРИЙ	49
ГЛАВА 5 - ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ZP2 НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ НЕЙТРОФИЛАМИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ БАКТЕРИЙ <i>IN VITRO</i>	68
5.1 – Влияние синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокинов нейтрофилами при воздействии стафилококков <i>in vitro</i>	68
5.2 – Влияние синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокинов нейтрофилами при воздействии энтеробактерий <i>in vitro</i>	74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
ВЫВОДЫ	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработки

Развитие, течение и исход инфекционно-воспалительного процесса, в значительной степени, связаны с функционированием иммунной системы [39, 62, 65, 66, 67]. 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 [3, 7, 8, 9, 15, 19, 21, 22, 28, 37, 41, 55, 56]. 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 [32, 52, 53]. Одним из таких кандидатов является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), широко применяющийся в клинической практике [32, 50, 53, 92, 97]. В конце 90-х годов прошлого века были получены синтетические пептидные аналоги активного центра данного цитокина, обладавшие иммуностимулирующей активностью, идентичной таковой цельной молекуле ГМ-КСФ [18, 27, 54], 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 [3, 7, 8, 9, 15, 19, 21, 22, 28, 37, 41, 55, 56, 64], 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 [63]. 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.

Задачи исследования:

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.

Методология и методы исследований

Работа была выполнена на базе лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН (г. Екатеринбург). Биохимические, иммунологические исследования следующие: были проведены эксперименты на 138 штаммах грамотрицательных и грамположительных культур бактерий (как музейных

штаммах, так и изолятов от больных пациентов). Для получения и исследования клеток крови была использована кровь 60 доноров. Работа была выполнена в рамках плана научно-исследовательской деятельности ИИФ УрО РАН (г. Екатеринбург) (№ Гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, дата регистрации 06.02.2018). Все исследования выполнялись согласно Хельсинкской Декларации ВМА, 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине, 1999 г. Критерием отбора доноров являлось отсутствие хронических, аутоиммунных, аллергических заболеваний, отсутствие приема гормональных, иммуностропных и анаболических препаратов и наличие информированного согласия на использование биологического материала в научных целях. В соответствии с поставленной целью были исследованы цитокиноподобная активность бактерий различных видов, про- и антицитокиновая активность грамположительных и грамотрицательных бактерий и проанализировано влияние синтетического пептида ZP2 на цитокиновую активность нейтрофилов периферической крови в условиях взаимодействия нейтрофилы-бактерии/экзометаболиты бактерий-пептид.

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.

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 исследованы 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 вариабельность 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 исследуемых 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 репарационной 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 лабораторных и инструментальных исследований, достаточным объемом выборки.

Достоверность результатов подтверждена актом проверки достоверности первичной документации, проведенной экспертами ИИФ УрО РАН, от 15 июня 2019 года.

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 участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, цели и задачи, определение методологии и общей

концепции диссертационного исследования проводились совместно с научными руководителями: д.м.н., профессором Зурочкой Александром Владимировичем и д.м.н., профессором Гриценко Виктором Александровичем. Часть экспериментов проводилась совместно с сотрудниками лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН (д.м.н., с.н.с. В.А. Зурочка, к.б.н., с.н.с., Зуева Е.Б., м.н.с. М.А. Добрынина), лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН (аспирант Тяпаева Я.В., аспирант Белозерцева Ю.П.), НИИ Особо чистых препаратов ФМБА России (д.б.н. Колобов А.А.).

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

Статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях осуществлялись соискателем лично.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе: в изданиях, рецензируемых ВАК – 12 публикаций (из них, статьи 2 – Scopus, РИНЦ, 11 – РИНЦ).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН, лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов 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), 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, обзора 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.

ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1 – Различные биологические свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF)

1.1 – Характеристика и структура GM-CSF

ГМ-КСФ (GM-CSF) известен достаточно давно, но относительно хорошо изучен с 80-х годов 20в. Это полипептидный цитокин – один из основных факторов роста и дифференцировки гемопоэтических клеток гранулоцитарной и макрофагальной линий. Являясь по своей структуре гликопротеином, белковая часть которого представлена последовательностью из 127 аминокислотных остатков, он имеет молекулярную массу 22 кД. Ген GM-CSF у человека расположен в группе связанных генов в хромосомном участке 5q31, кодирующей кроме того IL-4, IL-5, IL-13. Продукентами GM-CSF являются Th-лимфоциты (Th1, 2, 17); мезенхимальные и стромальные мультипотентные стволовые клетки; фибробласты, эндотелиальные клетки, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки, нейтрофилы, эозинофилы и др. Под воздействием IL-1, IL-4, IL-6, а также TNF - α клетки-продукенты усиливают выработку GM-CSF [11, 32, 50, 53, 73, 74, 113]. Этот ростковый фактор был выделен из культур клеток сначала мышей, потом крыс и человека, а позднее, после клонирования гена GM-CSF, удалось добиться его активной экспрессии в культурах клеток млекопитающих и получить рекомбинантный фактор, неотличимый по строению от человеческого [109].

Итак, остановимся более подробно на GM-CSF и синтетическом пептиде его активного центра, которые являются предметом нашего повышенного интереса. Известно, что удаление гена 5q приводит к развитию острой миелоидной лейкемии (AML), но, также известно, что не всегда AML удаётся воспроизвести удалением этого гена. Этот ген расположен в одном

хромосомном участке с группой генов, кодирующих структуру ряда цитокинов с выявленной гемопоэтической активностью: IL-4, IL-5 и IL-13, фактор стволовой клетки (SCF), лейкемия запрещающий фактор (LIF) лиганд Flt3 (Flt3L), эритропоэтин (EPO), тромбопоэтин (TPO) и IL-3, и IL-11 [73, 74, 117].

До момента расшифровки в 1985 г. строения человеческого GM-CSF функциональное различие между GM-CSF и IL-3 было неясно. В 1986 г. было показано, что основным человеческим фактором пролиферации и дифференцировки гранулоцитов является G-CSF. Был клонирован его ген, а использующийся с тех пор рекомбинантный G-CSF является наиболее часто применяемым в лечебных целях гемопоэтическим фактором, но, надо сказать, и GM-CSF в клинической практике применяется довольно широко. Экспериментально установлено, что удаление генов, кодирующих EPO, G-CSF, TPO или M-CSF приводит к значительному снижению количества клеток-мишеней, для каждого из этих цитокинов. Наоборот, удаление гена GM-CSF приводит лишь к снижению функциональной активности нейтрофилов практически без значительного воздействия на их количество [73, 74, 101, 117].

1.2 – Клеточные мишени и основные механизмы действия для GM-CSF

Каковы же механизмы действия GM-CSF на клеточном и молекулярном уровнях. Под воздействием GM-CSF активируется дифференцировка мультипотентных клеток-предшественников, предшественников нейтрофилов. Наряду с этим, имеет место и стимуляция к пролиферации зрелых клеток: Т-лимфоцитов, НК-клеток, дендритных клеток, моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов. При активации продукции этого цитокина реализация большей части механизмов его действия происходит в очаге воспаления. Основными клетками-мишенями для GM-

CSF являются гранулоциты (активация и дифференцировка, торможение апоптоза), дендритные клетки (созревание и дифференцировка), моноциты (дифференцировка моноцитов в тканевые макрофаги, альвеолярные макрофаги и купферовские клетки печени), NKT и NK клетки и ряд других клеток. Таким образом, GM-CSF является ростковым и дифференцировочным фактором очень большого количества клеток иммунной системы. Установлено так же, что лимфоциты и эндотелиальные клетки несут на своей мембране рецепторы к GM-CSF (GM-CSFR), делающие их восприимчивыми к стимуляции цитокином, хотя последствия такой стимуляции пока не выяснены [11, 88, 80, 91, 96, 102, 104].

1.3 – Характеристика рецептора GM-CSF

GM-CSFR экспрессируется на гранулоцитах и клетках – предшественниках макрофагов, зрелых клетках, таких как моноциты, дендритные клетки, мегакариоциты, нейтрофилы, плазматические клетки, T-лимфоциты, клетки сосудистого эндотелия, фетальные клетки, эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта, астроциты, олигодендроциты и клетках микроглии [86, 104, 114]. GM-CSFR – это мембранный белок-гетеродимер, образованный двумя субъединицами: α (GM-CSFR α или CD116; 60-80 kDa) и β с (GM-CSFR β или CD131; 120—140 kDa). Эти субъединицы также входят в комплексы рецепторов IL-3 и IL-5. При этом α -субъединица содержит сайты связывания GM-CSF, а β -субъединица принимает участие в преобразовании и передаче сигнала [100]. Обе субъединицы представляют собой трансмембранный гликопротеин I типа, и структурно характеризуются присутствием модулей соответствия рецептора цитокина, состоящих из двух областей каркасных белков (фибронектин тип III) [78, 121]. У GM-CSFR α описано 8 конформационных разновидностей, но только 2 изомера (α -1 и α -2 изоформы) биологически важны для его трансдукционного эффекта. GM-CSFR α связывается со своим

лигандом с низкой аффинностью ($KD = 0.2-100$ пмоль). Хотя β -субъединица GM-CSFR (GM-CSFR β c) сама не связывает GM-CSF, но при ассоциации с GM-CSFR α она образует рецептор с высоким сродством ($KD = 100$ пмоль) [78, 121]. Значимость α -субъединицы GM-CSFR подтверждается фактом, что полное удаление цитоплазматического домена рецептора приводит к отсутствию роста клеток и их дифференцировки. β -субъединица называется общей β -цепью (β c), так как помимо GM-CSFR, она является общей для рецепторов интерлейкина-3 (IL3) и интерлейкина-5 (IL5) [120].

1.4 – Лиганд-рецепторные взаимодействия GM-CSF/GM-CSFR

GM-CSF в состоянии связаться с GM-CSFR β c в отсутствие GM-CSFR α , но гетеродимеризация субъединиц требуется для внутриклеточной трансдукции сигнала. В результате активации GM-CSFR происходит димеризация его субъединиц и трансфосфорилирование остатков тирозина цитоплазматического участка рецептора. GM-CSFR не имеет собственной активной тирозинкиназы. Вместо этого требуется ассоциация GM-CSFR β c с янус-киназой Jak-2 для трансфосфорилирования GM-CSFR β c [78, 114, 118, 121].

Была описана уникальная третичная структура комплекса GM-CSF/GM-CSFR, соответствующая скоординированной додекаэдрной конструкции, которая необходима для активации рецептора. Ассоциация между GM-CSF и GM-CSFR включает три места взаимодействия. Первое взаимодействие между GM-CSF и GM-CSFR α , второе между GM-CSF и двумя областями двух различных молекул GM-CSFR β c, и третье – стабилизирующее место, сформированное между GM-CSFR α и GM-CSFR β c. Эти три комбинации способствуют формированию более сложного додекаэдр-комплекса, составленного из двух гексамерных. Додекаэдрная сложная структура сближает две GM-CSFR β c на расстоянии 10\AA , что делает

возможным их трансфосфорилирование и активацию последующих сигнальных путей [78, 121].

1.5 – Передача сигналов GM-CSF

Как было указано выше [78, 121], механизм активации рецептора GM-CSF связан с димеризацией его субъединиц. Связывание GM-CSF с его рецептором индуцирует ассоциацию α - и β -субъединиц и активирует фосфорилирование тирозиновых остатков GM-CSFR β с белками семейства янус-киназ (Jak). Последующий запуск каскада активации регуляторных молекул приводит, в конечном итоге, к связыванию с этими фосфорилированными тирозинами белков-активаторов транскрипции STAT5, участвующих в цитозольной передаче сигналов в опосредовании экспрессии специфических генов. Связанный STAT5, в свою очередь, так же фосфорилируется киназой, фосфорилирование приводит к диссоциации STAT5 от рецептора. Наконец, фосфорилированный STAT5 образует либо гомодимеры STAT5-STAT5, либо гетеродимеры STAT5-STATX с другими белками STAT. Димеризованный STAT5 представляет собой активную форму белка, которая готова к транслокации в ядро и связыванию определенных элементов ДНК, направляющих транскрипцию генов, активирующих уже клеточную дифференцировку (Рисунок 1).

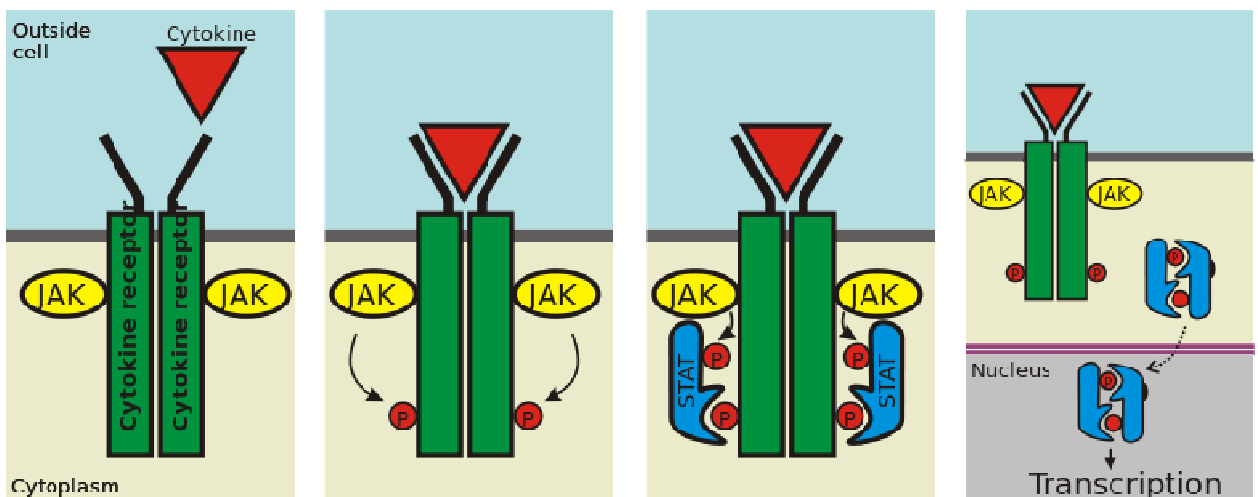


Рисунок 1 – Активация рецептора GM-CSF

1.6 – Механизмы воспаления и GM-CSF

При исследовании вклада GM-CSF в воспалении *in vitro* было обнаружено, что GM-CSF повышает жизнеспособность моноцитов, макрофагов и нейтрофилов; увеличивает уровень про-воспалительных цитокинов, выделяемых этими клетками, и способствует уничтожению болезнетворных микроорганизмов и клеток опухолей [81, 82]. Стимуляция макрофагов LP и IFN- γ более эффективна, но эти цитокины в данном случае являются вторичными стимуляторами, секреция которых первоначально увеличивается под воздействием GM-CSF. Внутривентриальное введение GM-CSF приводило к усиленной миграции макрофагов, про-воспалительный ответ которых усиливался в случае стимуляции GM-CSF, а затем повторной стимуляции [105, 119].

Интересная особенность наблюдалась у пациентов с синдромом Фелти (ревматоидный артрит, спленомегалия и нейтропения), получающих rhGM-CSF. У таких пациентов имело место обострение проявлений ревматоидного артрита [77]. Пациенты с изолированным ревматоидным артритом (РА), получавшие rhGM-CSF после химиотерапии, также отмечали усиление признаков артрита [89]. Обострение течения РА после введения GM-CSF было воспроизведено в экспериментальных моделях [85, 95]. Введение человеческих моноклональных антител к GM-CSFR α даёт быстрый и выраженный эффект, проявляющийся в снижении активности РА [83].

1.7 – Активация и регулирование иммунной системы и GM-CSF

GM-CSF является мощным хемотаксическим и хемокинетиическим агентом для человеческих нейтрофилов. Опытным путём доказано, что вызванный им хемотаксис не зависит от времени; специфические антитела к GM-CSF или его рецептору блокируют этот процесс. Средняя действующая концентрация GM-CSF (EC₅₀) составляет 0,9 пмоль; максимальный эффект вызывает доза 7 пмоль. Воздействие цитокина также приводит к быстрому

увеличению степени полимеризации F-актина и к образованию местных колец контакта в нейтрофилах, предшествующее хемотаксису [96].

Если рассматривать действие GM-CSF на клеточном уровне, то главной его функцией является стимуляция пролиферации и дифференцировки гемопоэтических предшественников [11, 69, 116]. Основополагающая роль именно этого цитокина экспериментально подтверждается блокадой развития гемопоэтических предшественников (*in vitro*) антителами к GM-CSF [11].

Ряд исследований показал также, что GM-CSF совместно с INF- α инициируют трансформацию моноцитов периферической крови в дендритные клетки [79], стимулируя, тем самым, развитие протективного иммунитета, в частности противоракового [94]. Участие GM-CSF в противоопухолевом иммунитете реализуется и посредством стимуляции NK-клеток, способных к лизису опухолевых клеток [11].

Следует отметить, что, главным образом, при инфекционных и иных воспалительных процессах активирующее влияние GM-CSF на гемопоэз и, соответственно, иммунитет, проявляется наиболее явно [11, 69, 70, 116]. В процесс вовлекаются NK-клетки, имеющие рецепторы к GM-CSF на своей мембране, и, в свою очередь, тоже способные к выработке этого цитокина. Также при микробной инвазии протективная роль GM-CSF выражается в усилении бактерицидности нейтрофилов.

Действие GM-CSF как провоспалительного цитокина, в частности, при формировании противоинфекционного иммунного ответа, реализуется посредством увеличения экспрессии ключевых молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) – трансактиватора HbA класса II, CD86 и CD40 [116].

GM-CSF стимулирует активацию молекул адгезии, IgGFcR и рецепторов на нейтрофилах, увеличивая их ответ на хемотаксические факторы, фагоцитоз, синтез лейкотриена B₄, арахидоновой кислоты и активацию выброса супероксид аниона. Кроме того, GM-CSF увеличивает

выживание нейтрофилов и усиливает экспрессию МНС-II, позволяющую им активировать ответ клеток Т на суперантигены [71, 87].

Альвеолярные макрофаги под воздействием GM-CSF активируют структурные и функциональные процессы репарации паренхимы, которые важны для гомеостаза [103]. Различные внеклеточные сигналы могут объединяться, чтобы развивать легочные фенотипы макрофагов во время воспаления легких. Так ФНО- α , секретируемый активированными альвеолярными макрофагами, вызывает увеличение продукции GM-CSF эпителиальными клетками, в результате чего начинается активное ускорение увеличения числа альвеолярных клеток, что быстрее восстанавливает альвеолярную барьерную функцию [111]. Тип II пневмоциты имеют значительное количество рецепторов (GM-CSFR α (м.б. GM-CSFR α) и GM-CSFR β c) (м.б. GM-CSFR β c). Это означает, что тип II пневмоциты, активируясь GM-CSF, способны уходить в трансдифференцировку в тип I пневмоциты, происходящую в ответ на острое повреждение [103, 111].

GM-CSF регулирует активацию пути транскрипционного фактора киназы-STAT5 Jak, вызывая стимуляцию интерферонового регуляторного фактора 5 (IRF5). Высокое увеличение IRF5 GM-CSF или IFN- γ приводит к активации макрофагов M1M0. Воздействие IRF5 совместно с RelA (белок NF κ B) ведет к стимулированию экспрессии гена ФНО- α , при этом IRF5 запрещает транскрипцию IL-10 и стимулируют продукцию IFN- γ [108]. Напротив, когда M-CSF преобладает, IRF4 вызывает активацию макрофагов с фенотипом M2M0. Несколько типов клеток, включая фибробласты, эндотелиальные клетки, стромальные клетки и остеобласты, конститутивно производят M-CSF. Есть данные, установившие, что активация M-CSF разворачивает M0 к формированию фенотипа M2 IRF4, вероятно, уравновешивая провоспалительный эффект, связанный с увеличением продукции IL-12, IL-6 и IL-23, которые активируются в ответ на воздействие GM-CSF-стимуляции M0 [103, 108].

У GM-CSF есть важная роль в активации дендритных клеток (DC). При стимуляции GM-CSF DC, последние приобретают выраженную способность к антигенной презентации, представляя решающее хранилище профессиональных представляющих антиген клеток (APC). В типе 1 дифференцирования DC, стимулирование и активация STAT5 постепенно увеличиваются при активации GM-CSF во время ранней стадии развития DC. Параллельно рSTAT деятельность этих клеток приводит к накоплению цитоплазматического цитокина в индуцибельной SH2-области (CISH), на более поздней стадии дифференцировки DC [76]. Когда пороговая концентрация CISH достигнута, CISH запрещает фосфорилирование GM-CSF-медиаторов STAT5, вызывая его дифференцировку по сильному типу 1 DC, усиливая выраженность экспрессии молекул класса I MHC. Таким образом, CISH может действовать как молекулярный выключатель от стадии прародителя DC до незрелого DC и контрольного пункта для цитостатической активации T-лимфоцитов [76].

GM-CSF – цитокин DC-активации, вызывающий выраженную дифференцировку клеток типа TH1. GM-CSF увеличивает окислительный метаболизм, цитотоксичность и зависимый от антител фагоцитоз [72, 104]. Человеческие моноциты и макрофаги – предшественники DC относятся к клеткам, которые при воздействии GM-CSF увеличивают экспрессию MHC-II, CD80, CD86 и CD40, тем самым увеличивая иммунную реакцию против антибактериальных антигенов [112, 116]. С другой стороны, GM-CSF вызывает усиление толерантности матери к плоду во время беременности на ранних ее сроках [93], GM-CSF направляет DC от центральной нервной системы (CNS) в сторону запрещающему фенотипическую активацию. Напротив, у DC, активированной GM-CSF, при попадании с периферии в ткань ЦНС, есть фенотип, который был связан с патогенезом аутоиммунного энцефаломиелита [106].

1.8 – Синтетические пептиды активного центра GM-CSF и их иммунобиологические свойства

В 1990-х годах коллективом авторов [17, 18, 27, 54, 60] из активного центра GM-CSF были получены пептиды, обладающие активностью, идентичной цельной молекуле GM-CSF. Все это позволило создать основу для дальнейшего исследования иммунобиологических свойств синтетических пептидов активного центра GM-CSF.

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) относится к так называемым "ранним" цитокинам, эффективно применяемым в настоящее время, большей частью, в онкологии и инфектологии. Существенным недостатком природного GM-CSF является сложность технологии выделения и очистки, опасность контаминации нативного сырья вирусами, дороговизна производства. Цельная молекула гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора не обладает достаточной селективностью действия: помимо специфических рецепторов, отвечающих за пролиферацию клеток, она вовлекает в активацию и другие рецепторы, способные модифицировать ответ полипотентных клеток в сторону снижения или увеличения колониобразования. Получение синтетической низкомолекулярной молекулы белка, являющейся фрагментом GM-CSF, процесс значительно менее дорогостоящий, чем получение нативного GM-CSF из стимулированных фитогемагглютинином лейкоцитов костного мозга. В то же время чистота получаемого целевого продукта неизмеримо выше по сравнению с рекомбинантным GM-CSF, что определяется технологией получения синтетического пептида. Следует отметить, что синтезированные пептиды и нативный GM-CSF оказывают аналогичное действие в эквимоллярных количествах. Однако весового количества пептидов требуется на порядок меньше – молекулярная масса GM-КСФ 15000 дальтон, предлагаемых пептидов ~ 1100-1500 дальтон.

Авторами была определена структура и затем синтезирован пептид, воспроизводящий часть последовательности природного белка GM-CSF. Точнее, была синтезирована группа пептидов, однако лишь препарат с определённой последовательностью оказался активным. В соответствии с патентом РФ № 2061699 предложено использовать для культивирования предшественников гранулоцитов и макрофагов низкомолекулярные синтетические пептиды с молекулярной массой ~1100-1500 дальтон следующей структуры: LYS GLY PRO LEY THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO или THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO [54].

Синтезированные пептиды воспроизводят фрагменты структуры природного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Их использование позволяет стимулировать дифференцировку клеток через специфические рецепторы к GM-CSF, не затрагивая другие рецепторы поверхности клеток, что связано с минимальной величиной молекулярной массы пептида. Следовательно, пептиды GM-CSF обладают повышенной избирательностью действия по сравнению с полной молекулой GM-CSF.

Как показали проведённые исследования, пептиды оказывают на культивируемые клетки действие, аналогичное действию цельной молекулы ГМ-КСФ, что и позволило предложить их в качестве средства для культивирования предшественников гранулоцитов и макрофагов [60].

Дальнейшие исследования данного пептида выявили у него ряд новых свойств [1, 2, 3, 7, 8, 9, 15, 19, 20, 21, 22, 28, 29, 30, 37, 48, 41, 46, 47, 55, 56, 57, 64]. Авторами было показано, что пептид ZP2 обладает иммуотропными (усиливает пролиферацию лимфоцитов, хемотаксис и хемокинез фагоцитов, стимулирует секрецию регуляторных молекул нейтрофилов), антимикробными (снижает рост и размножение грамположительных и грамотрицательных бактерий, их биопленкообразование) и репарационными свойствами (ускоряет заживление ран и повреждений слизистых оболочек в

эксперименте и клинике). В то же время остается ряд вопросов, например, как влияет данный пептид на систему взаимодействия бактерии-фагоциты и цитокиновую продукцию клеток. В последние годы стали появляться данные о том, что бактерии способны влиять на цитокиновую активность клеток макроорганизма. Так, было показано, что экзотоксины грамотрицательных бактерий способны значительно снижать синтез ряда цитокинов макрофагов мышей [38].

В ряде исследований показано, что микроорганизмам, чтобы состояться в качестве возбудителя, необходимо обладать определенным набором свойств, приоритетное место в котором по своей патогенетической значимости, безусловно, занимают факторы персистенции (импедины; от лат. *Impede* – мешать, препятствовать, задерживать), обеспечивающие "иммунорезистентность" бактерий и их выживание при контакте с гуморальными и клеточными эффекторами антибактериальной защиты хозяина. К ним относятся свойства и механизмы бактерий, которые определяют их способность инактивировать факторы противоинфекционной резистентности макроорганизма (в том числе лизоцим, систему комплемента, катионные антимикробные пептиды, иммуноглобулины) и/или детерминируют повышенную устойчивость к ним (в частности серорезистентность и выживаемость в фагоцитах). В настоящее время у потенциально патогенных микроорганизмов – возбудителей многих неспецифических инфекционно-воспалительных заболеваний выявлен большой арсенал импединов, включающий серорезистентность, антилизоцимный, антикомплементарный, антилактоферриновый, антиинтерцидный, антитромбодефенсиновый, антииммуноглобулиновый и ряд других признаков [40].

При участии различных видов цитокинов осуществляется, в том числе, и регуляция иммунного ответа макроорганизма. Экспрессия генов цитокинов начинается в ответ на проникновение в организм патогенов, антигенное раздражение или повреждение тканей. Одними из наиболее сильных

индукторов синтеза провоспалительных цитокинов служат патоген-ассоциированные молекулярные структуры, активирующие продукцию клетками-мишенями цитокинов, определяющих направленность иммунного ответа по клеточному или гуморальному типу [53]. Чтобы ослабить действие иммунной системы патогенные микроорганизмы могут модифицировать образование определенного вида цитокинов за счет стимуляции/супрессии их синтеза и использования некоторых цитокинов в качестве ростовых факторов. Известно, что некоторые патогенные и условно патогенные бактерии секретируют ферменты, позволяющие микроорганизмам расщеплять практически все виды органических макромолекул, включая такие цитокины, как IL-2, IFN- α . Инактивация цитокинов, являющихся продуктом активированных Т-лимфоцитов, макрофагов, дендритных клеток, может привести к значительным нарушениям механизмов врожденного и адаптивного иммунитета [5].

Серьёзной проблемой клинической практики является широкое распространение устойчивых форм микроорганизмов, снижающее эффективность применения антибактериальных препаратов. Особенную трудность представляет повышенная лекарственная устойчивость бактерий в биоплёнках. Внутрибольничные инфекции во всём мире являются одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения. Несмотря на противоэпидемические мероприятия и значительные достижения в области лечебно-диагностических технологий, частота их возникновения, летальность и стоимость терапии продолжают возрастать, придавая проблеме ещё большую медицинскую и социальную значимость. [33].

В настоящее время наблюдается переход от традиционного представления о бактериях – строго одноклеточных организмах к представлению о микробных сообществах, как целостных структурах, регулирующих свои поведенческие реакции в зависимости от изменения условий обитания. В 1994 году было предложено понятие «ощущение кворума» (Quorum Sensing) [90, 99]. Оно означает восприятие клетками

изменений среды, которые наступают при достижении бактериальной культурой некоторой пороговой численности, и реакцию на эти изменения.

Для синтеза факторов вирулентности, антибиотиков и формирования биоплёнок бактерии часто используют реакции кворум-сенсинга. Поэтому изучение механизмов таких реакций открывает новые возможности для предупреждения и лечения болезней, вызванных микробными агентами, а также позволяет по-иному взглянуть на сложный комплекс межвидовых бактериальных взаимодействий в природных местах обитания микроорганизмов. Способность бактерий образовывать биоплёнки интересна ввиду того, что представители патогенных для человека и животных возбудителей проявляют устойчивость к действию антимикробных веществ при их росте в биоплёнках. [35]. Биоплёнки – высокоупорядоченные бактериальные сообщества, которые позволяют бактериям жить в прикрепленном состоянии. Биоплёнки могут состоять из одного или нескольких видов бактерий. Их пронизывает сеть водных каналов, обеспечивающих доставку питательных веществ членам сообщества и удаляющих продукты метаболизма. В одной биоплёнке можно наблюдать различные образцы генной экспрессии, что говорит о том, что индивидуальные члены сообщества имеют «специфические обязанности», которые, комбинируясь с другими, усиливают жизнеспособность всего консорциума. Биоплёнки формируются в лёгких патогенным микроорганизмом *Ps.aeruginosa*. Толщина такой биоплёнки составляет несколько сотен микрометров. Микроколонии в зрелой биоплёнке расположены во внеклеточном полисахаридном матриксе. Внутри биоплёнки обнаруживается неоднородность: в ней существует кислородный градиент - уменьшение концентрации кислорода от периферии вглубь. Предполагается, что сходные градиенты будут обнаружены для pH и питательных веществ. Эти градиенты обеспечивают физиологическую вариабельность среди индивидуальных клеток биоплёнки: так, в глубине клетки растут гораздо медленнее, чем на периферии. Бактерия в такой зрелой биоплёнке

фенотипически устойчива к бактерицидным агентам. Таким образом, биоплёнки вызывают различные типы хронических бактериальных инфекций. Формирование биоплёнки у *Ps.aeruginosa* находится под контролем реакций кворум-сенсинга. Мутации гена *LasI* нарушают созревание биоплёнки, так как белок *LasI* не синтезирует 3-оксо-C12-HSL, и после стадии микроколонии формирование микроплёнки не продолжается. Роль C4-HSL в процессах формирования остаётся неизвестной. Биоплёнки, образуемые мутантами по *LasI*-белку, восприимчивы к детергентам, в то время как нормальные биоплёнки устойчивы. Это дает повод думать, что терапия, нацеленная на нарушение регуляции механизма кворум-сенсинга у *Ps.aeruginosa*, может привести к остановке формирования биоплёнки, что повысит чувствительность этой бактерии к антимикробным агентам [13].

Обнаружено, что прокариотические микроорганизмы синтезируют вещества, похожие на гормоны позвоночных (включая стероиды и полипептидные гормоны, такие, как инсулин). Увеличивается количество данных, подчеркивающих важность химически опосредованных межклеточных взаимодействий в бактериальных культурах [61, 98, 110]. Известно, что микроорганизмы способны гибко адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды (в частности, к недостатку питательных компонентов). При этом некоторые из них обладают генетически закреплённой специфической организацией метаболизма, позволяющей существовать при очень низких концентрациях питательных веществ (олиготрофы). Клетки другой категории (копиотрофы) при истощении среды обитания способны включать специальные программы переживания неблагоприятных условий. Часть из них образуют специализированные структуры (споры и цисты), которые чрезвычайно устойчивы к различным стрессам, неспорулирующие же бактерии способны переживать неблагоприятные условия, оставаясь вегетативными клетками с пониженной метаболической активностью, т.е. переходя в особое VBNC (viable but nonculturable – жизнеспособные, но некультивируемые) состояние.

Естественно, что некультивируемые бактерии остаются за рамками общепринятых методов исследований (высевы на плотные или жидкие среды не позволяют их обнаруживать). Например, возбудители таких опасных заболеваний, как холера и кампилобактериоз, склонны образовывать некультивируемые формы. При микроскопическом исследовании образцов, выделенных из окружающей среды (почва, речные и морские воды и т.д.), обнаружено множество клеток, которые, обладая метаболической активностью, не могут образовывать полноценную культуру (т.е. некультивируемые). В настоящее время известно всего несколько примеров превращения таких бактерий в нормальные культивируемые клетки.

Некультивируемые формы патогенных бактерий обнаружены не только в окружающей среде, но и в тканях, органах человека и животных. Чаще всего они сильно отличаются морфологически и биохимически. Например, возбудитель туберкулёза в тканях образует нетипичные кокковидные формы. Возможно, такие клетки являются особыми переживающими формами, способными к активации и размножению. Существование таких покоящихся форм может объяснить периодически возникающие рецидивы болезни у, казалось бы, излеченных больных. Показано, что клетки *Mycobacterium tuberculosis* могут переходить в нереплицируемое кокковидное состояние в микроаэрофильных условиях *in vitro*, которые часто возникают *in vivo* (например, в гранулемах). Кокковидные формы также обнаружены для *Campylobacter jejuni* и *Helicobacter pylori*. Предполагается, что они образуются в тканях в ответ на воздействие лекарств и, возможно, являются покоящимися клетками, устойчивыми к действию антибиотиков. Однако данные о культивировании таких форм весьма противоречивы. Возможно, такие бактерии могут быть активированы какими-то специфическими ростовыми факторами, роль которых, вероятно, исполняют цитокины хозяина. [51]. Например, рост туберкулёзных бацилл внутри моноцитов существенно стимулировался трансформирующим ростовым фактором (TGF-1), тогда как рост клеток *M.tuberculosis* и *M.avium* внутри макрофагов

значительно ускорился в присутствии эпидермального ростового фактора. Очевидно, цитокиновые факторы хозяина могут играть важную роль и в активации покоящихся бактерий, и в размножении активных возбудителей [43].

На основании вышеизложенного, мы можем подытожить, что колонии практически многих видов бактерий демонстрируют способность к клеточной дифференцировке и многоклеточной организации. И способность эта наиболее очевидно проявляется при росте бактерий в их природных местах обитания, где они формируют различные многоклеточные структуры: биоплёнки, бактериальные маты, и др. Эволюционно развитие многоклеточных организмов обусловило формирование системы регуляции межклеточных взаимодействий. Логично было бы предположить, что подобно эукариотическим клеткам в составе тканей многоклеточного организма, прокариоты формируют внутриклеточные межклеточные контакты и способны к генерации и распространению определённых сигналов в популяции, а, соответственно, нуждаются в неких медиаторах межклеточных взаимодействий, коими у высших организмов выступают цитокины. Однако в литературе исчерпывающие систематизированные сведения на этот счёт практически отсутствуют [44, 68, 107]. На основании вышеизложенного, принимая во внимание проблему антибиотикорезистентности микроорганизмов, сложно переоценить важность отыскания и изучения сигнальных молекул, необходимых для роста и жизнедеятельности патогенных бактерий, которые могут стать потенциальной мишенью для воздействия принципиально новых антибактериальных препаратов.

Учитывая, что для синтетического пептида ZP2 были найдены свойства связанные с его влиянием как на рост и размножение бактерий, так и на их биопленкообразование, очень важным остается вопрос о его влиянии на секрецию сигнальных молекул грамположительных и грамотрицательных бактерий [1, 2, 3, 7, 8, 9, 15, 19, 20, 21, 22, 28, 30, 37, 41, 46, 47, 48, 55, 56, 57,

64]. Одними из таких молекул могут являться цитокины (цитокиноподобные молекулы) бактерий. Сами бактерии и их продукты секреции также могут влиять на цитокиновую продукцию клеток иммунной системы, и, в первую очередь, фагоцитов (нейтрофилов). В то же время пептид ГМ-КСФ способен стимулировать цитокинопродукцию клеток иммунной системы. Остается неясным, как изменяется его стимулирующая активность в условиях воздействия на нейтрофилы различных бактерий. Всем этим сложным вопросам влияния синтетического пептида ZP2 на цитокинопродукцию бактерий, нейтрофилов, систему взаимодействия бактерии-нейтрофилы и посвящено дальнейшее исследование.

ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящей главе нами представлены основные лабораторные и вспомогательные методы исследования для оценки иммуотропных и антибактериальных действий синтетического пептида ZP2. Были 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. Все исследования выполнялись согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. критерием отбора доноров являлось отсутствие хронических, аутоиммунных, аллергических заболеваний, отсутствие приема гормональных, иммуотропных и анаболических препаратов и наличие информированного согласия на использование биологического материала в научных целях.

2.1 – Синтез пептида

Нами была применена стандартная методика синтеза пептидных последовательностей активного центра GM-CSF.

Синтез пептида ZP2 проводился твердофазным способом на синтезаторе «Applied Biosystems 430A» по методу *in situ* с использованием N α -Boc-защищенных производных аминокислот. Для блокирования боковых цепей трифункциональных аминокислотных остатков использованы защитные группы бензильного и уретанового типов. Присоединение аминокислотных остатков проводили методом 1-гидроксибензотриазоловых эфиров, используя 5 кратные избытки реагентов. По завершении сборки полипептидной цепи пептидил полимер обрабатывали жидким фтористым водородом по Sn1/Sn2 механизмам в присутствии скавенджеров. Продукт осаждали диэтиловым эфиром и очищали методом препаративной

обращенно-фазовой хроматографии до гомогенного состояния. 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 ZP 2 –THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO с м.м. 1397 дальтон.

2.2 – Методы оценки цитокиновой активности бактерий, нейтрофилов и влияния на них синтетического пептида ZP2

2.2.1 – Методы выделения клеток

Приготовление градиента плотности фиколл-верографина. Для приготовления градиентов плотности берут 76 % раствор верографина и готовят из него 36,17 % раствор на дистиллированной воде (плотность должна составлять 1,200). Для этого к 20 мл 76 % раствора приливают 20,02 мл дистиллированной воды. Фиколл-400 растворяют в теплой дистиллированной воде и готовят 9 % раствор (плотностью 1,025). Для этого берут 9 г фиколла и 91 мл дистиллированной воды. Соединяют растворы фиколла и верографина. Смеси должны иметь плотность 1,077 и 1,093 г/мл. При необходимости получения стерильной смеси ее фильтруют через бактериальный фильтр.

Выделение лейкоцитов крови. Все процедуры осуществляются в силиконированной или пластиковой посуде. Венозная кровь, взятая в вакуумные пробирки с литий-гепарином [59, 122], смешивается с 6 % раствором декстрана Т-500 (на изотоническом растворе хлорида натрия) в соотношении 10:1. Далее кровь отстаивается при температуре 37°C в течение 40 минут. Плазма с лейкоцитами осторожно наслаивается на двойной градиент плотности фиколл-верографина. Плотность нижнего градиента

1,093-1,095; верхнего — 1,075-1,077; объем — по 1,5 мл. Недопустимо перемешивание плазмы с градиентами и градиентов между собой. Плазма с градиентами центрифугируется при 1500 оборотах в минуту в течение 40 минут. По окончании центрифугирования на интерфазе между плазмой и верхним градиентом располагается клеточное кольцо, содержащее 15-20 % моноцитов, 10-15 % гранулоцитов и 65-75 % лимфоцитов. Между градиентами располагается клеточное кольцо на 98-100% состоящее из нейтрофилов. Нижнее кольцо осторожно снимается пастеровской пипеткой, шприцем с катетером для внутривенных инфузий или дозатором и переносится в другую пробирку. Клеточная взвесь отмывается от примеси градиентов питательной средой 199. Для этого в пробирку с клетками добавляют 2,0 мл питательной среды 199 и центрифугируют при 1500 оборотах в минуту в течение 10 минут, после чего надосадочную жидкость сливают. Отмывку повторяют трижды. По окончании отмывания подсчитывается концентрация клеток в камере Горяева и доводится питательной средой 199 до 5×10^6 клеток/мл нейтрофилов.

2.2.2 – Метод оценки секреции цитокинов нейтрофилами *in vitro*

Нейтрофилы, выделенные на двойном градиенте фиколл-верографина (метод выделения описан нами выше), довели после промывки до концентрации 5×10^6 клеток/мл и инкубировали в среде RPMI-1640 в течение одного часа при 37°C в термостате. В опытных образцах добавляли синтетический пептид ZP2 (химическая формула – THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO), 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 супернатантов 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 (США), с

использованием иммунофлюоресцентных мультиплексных наборов компании BioRad (США) для определения 17 цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, 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.

2.2.3 – Методы оценки цитокиновой 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), *Pseudomonas aeruginosa* (n=8), энтеробактерий – *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli* (n=22), выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы, из влагалища у женщин с миомой матки, из пустул у новорожденных с пиодермией. Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин и отбирали надосадочную жидкость (супернатант).

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

2.3 – Статистические методы исследования

Результаты исследований обрабатывались на ПК под управлением операционной системы Windows XP с использованием пакета прикладных программ "StatisticaforWindows 6.0" [34, 36].

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. Объем выборок был недостаточен для применения любого из параметрических способов анализа, поэтому мы воспользовались непараметрическим аналогом. Согласно литературным данным [34, 36] при применении непараметрических критериев при нормальном распределении их чувствительность составляет примерно 95 % от чувствительности их параметрических аналогов, и непараметрические критерии дают больше шансов выявить реально существующие различия. Достоверность отличия оценивалась по U-критерию Mann-Whitney. Статистически значимыми считались изменения при $p < 0,05$.

Корреляционный анализ был выполнен в рамках программы «STATISTICA for Windows 6.0.» с использованием модуля «Nonparametrics Correlations Spearman» («Непараметрические Корреляции Спирмена»). Для выделения значимых коэффициентов корреляции был выбран уровень значимости, принятый для медико-биологических исследований ($p < 0,05$).

Представленные цифровые данные в подавляющем большинстве были округлены до первого или второго десятичного знака.

ГЛАВА 3 – ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ И ИХ ПРОДУКТОВ НА ЦИТОКИНОВУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

3.1 – Влияние синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокинов нейтрофилами *in vitro*

Учитывая, что синтетический пептид ZP2 вызывал усиление дифференцировки кроветворных стволовых клеток в гранулоциты и наличие хемотаксических рецепторов к нему на гранулоцитах [21], было важно определить, обладает ли он свойствами, характерными для основного цитокина GM-CSF, – усиливать секрецию различных цитокинов клетками, в том числе и периферической крови, и, в первую очередь, нейтрофилами. Учитывая, что зрелые нейтрофилы относятся к короткоживущим клеткам (максимальный срок жизни от нескольких дней до 14 суток), важно было разработать методику оценки секреции нейтрофилами цитокинов при короткой инкубации в питательной среде и оценить возможность исследования продукции цитокинов при кратковременной инкубации с биологически активными веществами. С этой целью исследовали уровень спонтанной и индуцированной синтетическим пептидом ZP2 продукции 17 цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β) 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 (таблица 1).

При этом важно отметить, что тест-система на выявление GM-CSF показывает увеличение концентрации GM-CSF 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, ввиду незначительного размера пептида.

Таблица 1 – Исследование влияния синтетического пептида активного центра GM-CSF на секрецию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека (n=10)

Цитокины (пг/мл)	Стат. показатели	Среда RPMI-1640	Среда RPMI-1640 + пептид	Супернатант нейтрофилов	Супернатант нейтрофилов + пептид
G-CSF	M±m p ₁ p ₂	16,2±1,5	17,1±1,3	19,3±1,6	34,6±2,7 <0,05 <0,05
GM-CSF	M±m p ₁ p ₂	210,2±6,2	251,3±7,3 <0,05	250,3±5,6 <0,05	277,6±7,3 <0,05 <0,05
IL-10	M±m	32,2±2,6	38,1±3,2	35,4±3,4	42,3±4,3
IL-12p70	M±m p ₁ p ₂	13,3±1,7	17,2±1,9	23,5±1,6	60,5±4,2 <0,05 <0,05
INF-γ	M±m p ₁ p ₂	13,2±1,3	13,1±1,4	13,5±1,5	23,6±2,7 <0,05 <0,05
IL-13	M±m	10,1±1,1	10,3±1,4	11,4±1,3	18,6±3,8
IL-17A	M±m p ₁ p ₂	29,5±2,6	29,4±3,4	62,5±5,6 <0,05	337,8±11,8 <0,001 <0,01
IL-1β	M±m p ₁ p ₂	13,4±1,5	14,1±1,6	42,3±3,4 <0,05	287,5±16,8 <0,01 <0,01
IL-2	M±m	35,5±3,5	35,3±3,8	38,4±4,5	49,2±6,8
IL-4	M±m p ₁ p ₂	17,3±1,8	18,1±2,1	23,5±2,4	53,5±5,9 <0,05 <0,05
IL-5	M±m	9,1±1,1	9,4±1,5	9,5±1,3	12,7±2,3
IL-6	M±m p ₁ p ₂	17,6±1,8	18,4±2,1	122,5±9,7 <0,05	1574,6±76,8 <0,001 <0,001
IL-7	M±m p ₁ p ₂	10,3±1,2	10,3±1,5	12,5±1,6	18,6±2,2 <0,05 <0,05
TNF-α	M±m p ₁ p ₂	15,3±1,8	15,4±1,6	16,2±1,9	67,7±6,7 <0,05 <0,05
IL-8	M±m p ₁ p ₂	13,4±2,3	14,4±2,2	320,9±14,5 <0,01	3541,7±211,4 <0,001 <0,001
MCP-1	M±m p ₁	12,7±1,8	12,6±1,6	12,4±1,9	19,4±3,7
MIP-1β	M±m p ₁ p ₂	40,7±4,8	40,2±4,9	1492,8±72,7<0,05	12538,2±768,9<0,05 <0,001

Примечание: p₁ - достоверность различий по отношению к среде RPMI-1640, p₂ - достоверность различий по отношению к супернатантам нейтрофилов.

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 ZP2, с одной стороны, вызывает достоверное увеличение спектра секретируемых клетками цитокинов, а, с другой стороны, резко увеличивает уровень продукции некоторых из них. 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 5 цитокинов - IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 β .

Таким образом, разработанная модель оценки секреции цитокинов нейтрофилами после 1 часовой инкубации показала ее несомненную эффективность. Выявлено, что в течение 1 часа нейтрофилы способны секретировать цитокины в достаточно широком спектре. Предложенная модель позволяет не только оценивать секрецию различных цитокинов нейтрофилами, но и исследовать возможные механизмы регуляции цитокиновой продукции этими клетками в условиях инкубирования с биологически активными веществами, в том числе и синтетических пептидов активных центров цитокинов. При этом выявлено, что синтетический пептид ZP2 значительно усиливает секрецию нейтрофилами различных 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). Наиболее выраженное усиление секреции в ответ на воздействие пептида было выявлено для 5 цитокинов – IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 β . При этом надо отметить тот факт, что синтетический пептид ГМ-ГСФ усиливает секрецию как ростковых факторов (G-CSF, GM-CSF), так и провоспалительных (INF- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-17A, TNF- α), противовоспалительных (IL-12p70) цитокинов и хемокинов (IL-8, MIP-1 β). Полученные данные свидетельствуют о том, что синтетический пептид ZP2, помимо иммуностимулирующего, антибактериального и репарационного

действия, обладает способностью активировать регуляторные механизмы клеток периферической крови и, в частности, нейтрофилов, что расширяет возможности применения лекарственных препаратов на его основе для коррекции состояний с нарушенной функцией секреции цитокинов. В то же время способность данного препарата усиливать провоспалительную цитокинопродукцию должна учитываться в тех ситуациях, где активация данных механизмов является противопоказанием для назначения препаратов со сходным механизмом действия или там, где при развитии патологического процесса имеется выраженная секреция таких цитокинов как IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 β .

Любые повреждения тканей макроорганизма, в том числе вызванные инфекционными агентами, в частности, стафилококками и энтеробактериями, сопровождаются воспалительной реакцией с выработкой клетками иммунной системы различных цитокинов, выполняющих регуляторную функцию [62].

Одними из первых в инфекционно-воспалительный процесс вовлекаются фагоцитарные клетки и, прежде всего, нейтрофилы. Ранее нами было показано, что эти клетки являются удобной моделью для оценки цитокинопродукции фагоцитами, в том числе при исследовании влияния различных веществ на активацию секреции различных цитокинов нейтрофилами.

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.

Учитывая, что золотистый стафилококк (*S.aureus*) относится к приоритетным возбудителям многих эндогенных бактериальных инфекций, в том числе с внутрибольничной локализацией, а коагулазоотрицательные стафилококки – КОС (*S.epidermidis* и др.) и *E.coli* принадлежат к индигенной (комменсальной, потенциально патогенной) микрофлоре макроорганизма

[12, 40], 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 целью настоящего исследования явился 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 градиентного 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 доводили 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), выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы и из влагалища у женщин с миомой матки. Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне в течение 24 часов, трижды отмывали физиологическим раствором и бактериальную суспензию доводили до концентрации 10^8 бактерий/мл.

Влияние стафилококков и кишечных палочек на секрецию цитокинов нейтрофилами определяли на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием системы мультиплексного анализа Bio-Plex компании Bio-Rad (США) для определения 17 цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β) 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. Полученные результаты округляли до 0,1 пг/мл.

Как видно из таблицы 2, использованная в опытах *in vitro* тест-система для выявления 17 цитокинов успешно работала по всей «цитокиновой линейке», позволяя эффективно обнаруживать 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, GM-CSF, IL-12p70 и IL-17A, содержание которых в супернатанте нейтрофилов превышало контрольный уровень (среда RPMI-1640) в 1,2 -7,0 раз ($p < 0,05-0,001$), а главное – к таким цитокинам-лидерам, как IL-8 и MIP-1 β , кратность увеличения концентрации которых относительно контроля 1 составила 23,9 и 36,7 раза, соответственно.

Эти результаты, очевидно, указывают на то, что процедуры выделения, подготовки и хранения нейтрофилов периферической крови человека способны их активировать еще на этапе пробоподготовки и инкубации в среде культивирования.

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 исследованных цитокинов (таблица 2), что указывает на способность бактерий существенно влиять на «секретируемый цитокиновый профиль» нейтрофилов.

Необходимо отметить, что 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*.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика содержания цитокинов в контрольных и опытных пробах, в том числе при контакте нейтрофилов со стафилококками разных видов ($M \pm m$), $n=10$

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-1 β	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-1 β	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: p_1 – достоверность различий по отношению к среде RPMI-1640 (контроль 1); p_2 – достоверность различий по отношению к супернатантам нейтрофилов (контроль 2).

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-8, IL-10, IL-17A, G-CSF, TNF- α и MIP-1 β (таблица 2).

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 выросла в 1,3-2,1 раза ($p < 0,05$), а содержание IL-1 β , который является одним из ключевых цитокинов при развитии воспалительного процесса [53], увеличилось в 16,02 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем 2 (таблица 3). Вместе с тем, было зафиксировано, что при инкубации нейтрофилов с *S.aureus* в супернатанте достоверно снижалась концентрация IL-6 ($81,5 \pm 7,8$ против $122,5 \pm 9,7$ пг/мл в контроле 2; $p < 0,05$).

Таблица 3 – Кратность изменения содержания цитокинов в супернатанте нейтрофилов при контакте с *S.aureus* (M \pm m)

Цитокины (пг/мл)	Супернатант нейтрофилов (контроль 2)	Супернатант Нейтрофилов + <i>S. aureus</i> (опыт 1)	Кратность изменения уровня (опыт 1 / контроль 2)
G-CSF	19,3 \pm 1,6	40,5 \pm 2,2, $p < 0,05$	2,10
IL-10	35,4 \pm 3,4	46,1 \pm 4,4, $p < 0,05$	1,30
IL-17A	62,5 \pm 5,6	117,2 \pm 9,8, $p < 0,05$	1,88
IL-1 β	42,3 \pm 3,4	677,8 \pm 89,9, $p < 0,001$	16,02
IL-2	38,4 \pm 4,5	53,3 \pm 5,3, $p < 0,05$	1,39
TNF- α	16,2 \pm 1,9	22,3 \pm 1,4, $p < 0,05$	1,38
IL-6	122,5 \pm 9,7	81,5 \pm 7,8, $p < 0,05$	0,67

Примечание: p – достоверность различий по отношению к контролю 2.

Принципиально иной характер влияния на содержание цитокинов в супернатанте нейтрофилов демонстрировали коагулазоотрицательные стафилококки – *S.epidermidis* (таблица 4).

Таблица 4 – Кратность уменьшения содержания цитокинов в супернатанте нейтрофилов при контакте с *S.epidermidis* (M±m)

Цитокины (пг/мл)	Супернатант нейтрофилов (контроль 2)	Супернатант нейтрофилов + <i>S. epidermidis</i> (опыт 2)	Кратность снижения уровня (контроль 2 / опыт 2)
IL-17A	62,5±5,6	46,8±5,3, p<0,05	1,34
IL-6	122,5±9,7	39,6±3,8, p<0,05	3,09
IL-8	320,9±14,5	59,7±2,4, p<0,001	5,38
MIP-1β	1492,8±72,7	564,2±88,9, p<0,001	2,65

Примечание: p – достоверность различий по отношению к контролю 2.

В отличие от золотистого стафилококка исследованные 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.

Таблица 5 – Кратность увеличения содержания цитокинов в супернатанте нейтрофилов при контакте с *E.coli* (M±m)

Цитокины (пг/мл)	Супернатант нейтрофилов (контроль 2)	Супернатант нейтрофилов + <i>E.coli</i> (опыт 3)	Кратность повышения уровня (контроль 2 / опыт 3)
IL-17A	62,5±5,6	145,7±14,7, p<0,05	2,34
IL-1β	42,3±3,4	147,0±10,5, p<0,05	3,47
IL-4	23,5±2,4	35,2±2,0, p<0,05	1,49
IL-6	122,5±9,7	658,0±185,0, p<0,05	5,39
TNF-α	16,2±1,9	37,7±1,2, p<0,05	2,37
IL-8	320,9±14,5	1244,8±229,4, p<0,001	3,88
MIP-1β	1492,8±72,7	5466,5±384,5, p<0,001	3,66

Примечание: p – достоверность различий по отношению к контролю 2.

При исследовании влияния *E.coli* на содержание цитокинов в супернатанте нейтрофилов получены результаты во многом похожие на

действие *S.aureus*, но имеющие свои особенности (таблица 5). Так *E.coli* стимулировали продукцию/секрецию следующих цитокинов, таких как IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-17A 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 IL-1 β , IL-6, IL-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 (таблица 6).

Так в супернатантах нейтрофилов, инкубированных с *S.aureus*, определялись значительно более высокие (в 1,31-16,73 раза) концентрации G-CSF, IL-10, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , IL-8 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.

Таблица 6 – Достоверные отличия влияния *S.aureus* и *S.epidermidis* на содержание цитокинов в супернатантах нейтрофилов периферической крови человека (M \pm m)

Цитокины (пг/мл)	Супернатант нейтрофилов + <i>S. aureus</i> (опыт 1)	Супернатант нейтрофилов + <i>S. epidermidis</i> (опыт 2)	Кратность отличия уровней (опыт 1 / опыт 2)
G-CSF	40,5 \pm 2,2	17,0 \pm 2,7 *	2,38
IL-10	46,1 \pm 4,4	35,3 \pm 4,0 *	1,31
IL-17A	117,2 \pm 9,8	46,8 \pm 5,3 *	2,50
IL-1 β	677,8 \pm 89,9	40,5 \pm 4,2 **	16,73
IL-2	53,3 \pm 5,3	33,2 \pm 2,8 *	1,61
IL-6	81,5 \pm 7,8	39,6 \pm 3,8 *	2,06
TNF- α	22,3 \pm 1,4	16,1 \pm 1,7 *	1,39
IL-8	305,1 \pm 15,4	59,7 \pm 2,4 **	5,11
MIP-1 β	1319,5 \pm 71,7	564,2 \pm 88,9 **	2,34

Примечание: *- достоверные отличия между опытами 1 и 2 (p<0,05);
**- достоверные отличия между опытами 1 и 2 (p<0,01).

Суммируя полученные данные, необходимо подчеркнуть несколько ключевых моментов.

Во-первых, предложенная нами модель оценки продукции цитокинов нейтрофилами в процессе часовой их инкубации с синтетическим пептидом ZP2 показала достаточно высокую эффективность не только при анализе влияния на фагоциты активных субстанций, но и при определении их реакции на живые микроорганизмы, в частности, стафилококки и кишечные палочки. При этом наиболее точным контролем для оценки влияния бактерий на продукцию фагоцитами цитокинов служит контроль 2 (супернатант нейтрофилов, инкубированных без бактерий). Использование этой модели позволило обнаружить, что часовой контакт нейтрофилов со стафилококками приводит к существенному изменению содержания широкого спектра цитокинов во внеклеточной среде – супернатанте.

Во-вторых, экспериментально установлено, что контакт фагоцитов с *S. aureus* достоверно стимулировал продукцию нейтрофилами цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-17A, G-CSF и TNF- α , но ингибировал секрецию IL-6, тогда как взаимодействие клеток с *S. epidermidis* сопровождалось снижением содержания цитокинов IL-6, IL-8, IL-17A и MIP-1 β в супернатанте нейтрофилов, а инкубация клеток с *E. coli* стимулировали продукцию/секрецию IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, TNF- α и MIP-1 β . С одной стороны, это указывает на зависимость цитокинопродукции нейтрофилов от таксономической принадлежности стафилококков и кишечных палочек (что требует исследования реакции фагоцитов на представителей иных различных видов бактерий); с другой стороны, эти результаты свидетельствуют о потенциальной возможности стафилококков и кишечных палочек влиять на регуляцию патологического процесса в очаге воспаления, изменяя содержание цитокинов во внеклеточной среде.

В-третьих, выявленные особенности реакции нейтрофилов на коагулазопозитивные (патогенные), коагулазонегативные (комменсальные)

стафилококки и кишечные палочки могут отражать изменения цитокинового статуса макроорганизма при развитии инфекционно-воспалительных заболеваний стафилококковой и энтеробактериальной этиологии, а также при формировании резидентного стафилококкового или энтеробактериального бактерионосительства, когда комменсальная флора находится в депрессивном состоянии. Очевидно, эти обстоятельства необходимо учитывать при терапии и санации лиц с указанной патологией, в том числе с использованием цитокинов и препаратов, которые могут оказывать влияние на их продукцию клетками макроорганизма. К сожалению, пока такие подходы не разработаны.

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 IL-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 IL-4, IL-8 и IFN- γ [63]. И наоборот, выявленная стимуляция цитокинов *E.coli* (а они стимулируют, в первую очередь, провоспалительные цитокины начального иммунного ответа, а также хемокины, привлекающие в очаг воспаления нейтрофилы и макрофаги/дендритные клетки), возможно, связаны с их важнейшей ролью формирования физиологического воспаления в кишечнике и поддержанием

колониционной резистентности [12].

В целом, изложенный материал открывает широкие перспективы для дальнейшего научного поиска новых механизмов взаимодействия бактерий и клеток иммунной системы, результаты которого будут способствовать разработке более эффективных методов диагностики и терапии инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе эндогенной природы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В 3 ГЛАВЕ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемых в электронной международной базе данных Scopus:

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. 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).

3. 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).

4. 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 – 0,389, PubMed).

5. 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).

6. 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 – 0,389, PubMed).

Публикации в других изданиях:

8. 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).

9. 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).

ГЛАВА 4 – ЦИТОКИНОПОДОБНАЯ ПРОДУКЦИЯ БАКТЕРИЙ

Воспаление, как процесс, развивается в результате повреждения тканей

организма, в том числе и различными микроорганизмами, а в его регуляцию вовлекаются различные цитокины, вырабатываемые иммунокомпетентными клетками [62]. Как мы показали в обзоре литературы (глава 2), бактерии и их продукты способны изменять продукцию цитокинов и снижать их концентрацию в исследуемых субстратах. В то же время остается неясным вопрос – а способны ли сами бактерии секретировать в среду инкубации цитокины или цитокиноподобные вещества (ЦПВ). Поэтому, прежде чем исследовать влияние бактерий на механизмы цитокиновой продукции нейтрофилов, 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), *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=8), энтеробактерий – *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli* (n=12), выделенный из ран у больных с синдромом диабетической стопы, из влагалища у женщин с миомой матки, из пустул у новорожденных с пиодермией. Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин и отбирали надосадочную жидкость (супернатант).

Наличие в супернатантах бактерий цитокинов (ЦПВ) определяли на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием тест-системы Multiplex (Luminex, США) для определения 15 цитокинов (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. Опыты проводили в двух повторах; результаты измерений округляли до 0,1 пг/мл; при регистрации в супернатантах цитокинов в концентрации меньше 3 пг/мл считали, что в образце ЦПВ отсутствуют.

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*. Поэтому на их оценке мы остановимся более подробно.

Как видно из представленных в таблице 7 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 пг/мл), а их концентрация варьировала широким 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, определялись 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 корреспондировали с большой 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.

Таблица 7 - Характеристика продукции цитокиноподобных веществ (ЦПВ) клиническими изолятами *S. aureus* (n=23) в супернатанты

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

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 (INF-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: IL-1 β , IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , MIP-1 β), *Enterococcus* spp, (4 – G-CSF, INF- γ , IL-12p70, IL-17A), (таблицы 8-9), *K. pneumoniae*, *E. coli* и *Ps. aeruginosa* (1 – G-CSF) (таблицы 8-11). 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 (IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ) тестировались в супернатантах у ряда изолятов *S.aureus*, *S.haemolyticus* и *Enterococcus faecalis* в относительно высоких концентрациях (>20 пг/мл), другие ЦПВ в исследуемых образцах либо не обнаруживались, либо их уровень был ниже указанного порога.

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

Хотелось бы отметить и 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 это различие связано 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, что все цитокиноподобные продукты относятся или к ростковым факторам, или к провоспалительным, обладающими выраженными плейотропными эффектами, и, возможно, служат дополнительным фактором выживания и персистенции бактерий внутри организма.

Таблица 8 – Характеристика цитокинопродукции *S.haemolyticus* n=10

Цитокины	Средний уровень ЦПВ во всей выборке штаммов (M±m, пг/мл)	Диапазон (min-max) концентраций ЦПВ во всей выборке штаммов (пг/мл)	Доля штаммов-продуцентов ЦПВ (%)
G-CSF	4,81±2,1	0-15,3	57,1
GM-CSF	4,43±4,39	0-30,8	14,3
INF-γ	4,99±4,28	0-30,6	14,3
IL-12p70	14,57±14,26	0-100,1	14,3
IL-17A	1,01±0,24	0-4,7	14,3
IL-1β	1,24±0,75	0-5,7	14,3
MIP-1β	1,84±1,84	0-12,9	14,3

Таблица 9 – Характеристика цитокинопродукции *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* n=8

Цитокины	Средний уровень ЦПВ во всей выборке штаммов (M±m, пг/мл)	Диапазон (min-max) концентраций ЦПВ во всей выборке штаммов (пг/мл)	Доля штаммов-продуцентов ЦПВ (%)
G-CSF	8,03±2,96	4,3-16,8	100
INF-γ	16,21±5,48	6,3-31,2	100
IL-12p70	1,99±0,24	0,1-4,2	25
IL-17A	4,39±1,38	2.1-4,8	75

Таблица 10 – Характеристика цитокинопродукции *K.pneumoniae*, *E.coli* n=12

Цитокины	Средний	Диапазон (min-max)	Доля
----------	---------	--------------------	------

	уровень ЦПВ во всей выборке штаммов (M±m, пг/мл)	концентраций ЦПВ во всей выборке штаммов (пг/мл)	штаммов-продуцентов ЦПВ (%)
G-CSF	5,55±1,8	0-11,3	83,4

Таблица 11 – Характеристика цитокинопродукции *Ps.aeruginosa* n=8

Цитокины	Средний уровень ЦПВ во всей выборке штаммов (M±m, пг/мл)	Диапазон (min-max) концентраций ЦПВ во всей выборке штаммов (пг/мл)	Доля штаммов-продуцентов ЦПВ (%)
G-CSF	1,03±0,77	0-3,3	12,5

Учитывая, что бактерии способны продуцировать множество соединений идентичных продуктам секреции клеток организма человека и животных (лизоцим, катехоламины, гормоны, различные ферменты) [14, 55], выявление феномена секреции цитокиноподобных веществ, относящихся к регуляторным факторам, может открыть совершенно новое направление исследований связанных 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. Остается во многом неясным ряд вопросов, а именно, что это за вещества, насколько они идентичны цитокинам эукариотов, каков спектр их биологической активности, в чем биологический смысл их наличия у бактерий, их происхождение (изначальное наличие, или приобретение в процессах коэволюции при персистенции в многоклеточных организмах), генетическая маркировка этих субстанций в нуклеотиде или плаزمиде бактерий и т.д.? Возможно, на часть этих вопросов смогут ответить генетические исследования штаммов продуцентов цитокиноподобных веществ и

палеогенетика микроорганизмов – изучающая генетические особенности предков современных бактерий, и дальнейшие исследования биологических аспектов выявленного феномена.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что тест-система для мультиплексного анализа Luminex (США) позволяет выявлять в супернатантах суточных бульонных культур микроорганизмов наличие цитокиноподобных веществ (ЦПВ). При этом продукция (наличие и уровень) ЦПВ исследуемыми грамположительными и грамотрицательными бактериями зависит от их таксономической принадлежности и характеризуется внутривидовой вариабельностью. Наиболее активными продуцентами ЦПВ являются стафилококки (*S.aureus* и *S.haemolyticus*), которые способны синтезировать 7-13 цитокинов, причем, 5 из них (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-12p70, IL-17A) в относительно высоких концентрациях (>20 пг/мл). Учитывая принадлежность указанных цитокинов к провоспалительным и ростовым факторам, нельзя исключить их причастность к развитию начальных этапов воспалительной реакции при инфицировании тканей макроорганизма цитокин-продуцирующими бактериями, в частности, путем ранней активации иммунокомпетентных клеток, что требует дальнейшего исследования данного феномена. С другой стороны, необходимо выяснить структурно-молекулярное сходство/различие ЦПВ бактерий с цитокинами макроорганизма, определить их генетическое детерминирование, эволюционное происхождение и роль в биологии прокариотов и эукариотов, а также их участие в формировании патогенного потенциала микроорганизмов.

Золотистый стафилококк (*S.aureus*) является одним из приоритетных возбудителей многих эндогенных инфекционно-воспалительных заболеваний человека [84]. При этом у части людей наблюдается транзитное или резидентное бактерионосительство данных микроорганизмов в различных биотопах (кожа, носоглотка, кишечник, урогенитальный тракт) [6, 115]. 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 золотистого стафилококка, либо в иммунокомпromетированных органах, куда бактерии мигрируют по лимфатическим сосудам или гематогенно [12, 75]. В регуляции инфекционно-воспалительного процесса существенную роль играют цитокины, секретируемые иммунокомпетентными клетками, в том числе гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) [6, 12, 25, 75, 84, 115].

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 исследованию его биологических эффектов.

Поэтому 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 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 «STAPHYtest» («Erba Lachema s.r.o.», European Union) [16].

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

Для исследования влияния синтетического пептида ZP2 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.

На первом этапе работы была исследована 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 пг/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-1 β – 5,7; IL-2 – 5,9; IL-4 – 10,2; MCP-1 – 10,2; MIP-1 β – 3,8 пг/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 пг/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 (>20,0 пг/мл): G-CSF – 58,1; GM-CSF – 29,6; IFN- γ – 166,9; IL-12(p70) – 105,9 и IL-17A – 51,4 пг/мл, тогда как уровень других ЦПВ был ниже принятой градации (>3,0, но <20,0 пг/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 пг/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 варьировалась 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-10, IL-5, IL-6 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.

Полученные данные свидетельствуют о том, что музейный штамм стафилококка, так же как клинические изоляты (см. главу 3), обладал широким диапазоном секретируемых ЦПВ.

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 (супернатант) широкий спектр ЦПВ, причем, данные микроорганизмы характеризовались внутривидовой (межштаммовой) вариабельностью по наличию и выраженности указанного признака. Поскольку в очаге воспаления наблюдается выброс иммунокомпетентными клетками цитокинов, в том числе GM-CSF [25, 32, 50], важно было определить влияние синтетического пептида ZP2 на продукцию золотистыми стафилококками ЦПВ.

По результатам экспериментов *in vitro* была 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 (рисунки 2 и 3, таблица 12).

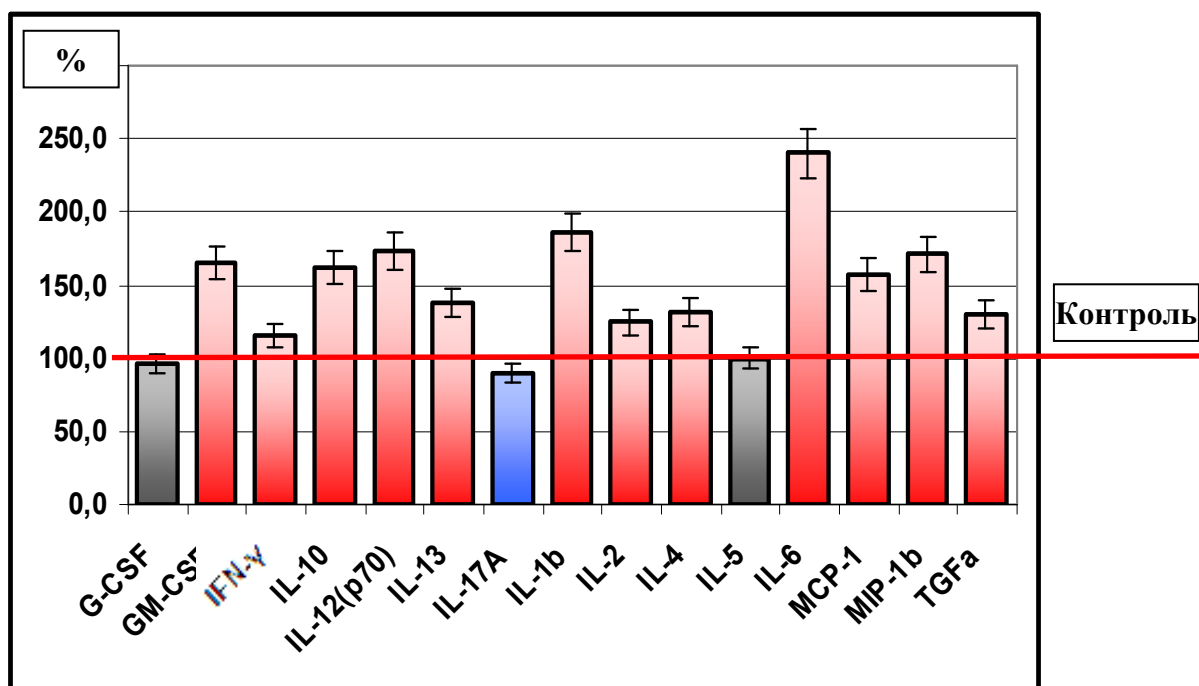


Рисунок 2 – Влияние синтетического пептида ZP2 на продукцию ЦПВ эталонным штаммом *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P)

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

Как видно из рисунка 2, синтетический пептид ZP2 в той или иной степени (на 15,0-139,9 %) стимулировал продукцию эталонным штаммом *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P) большинство ЦПВ (12 из 15 исследованных, 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 пг/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 пг/мл соответственно, которые превышали принятый порог – 3 пг/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 $51,4 \pm 0,3$ 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 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 3, 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).

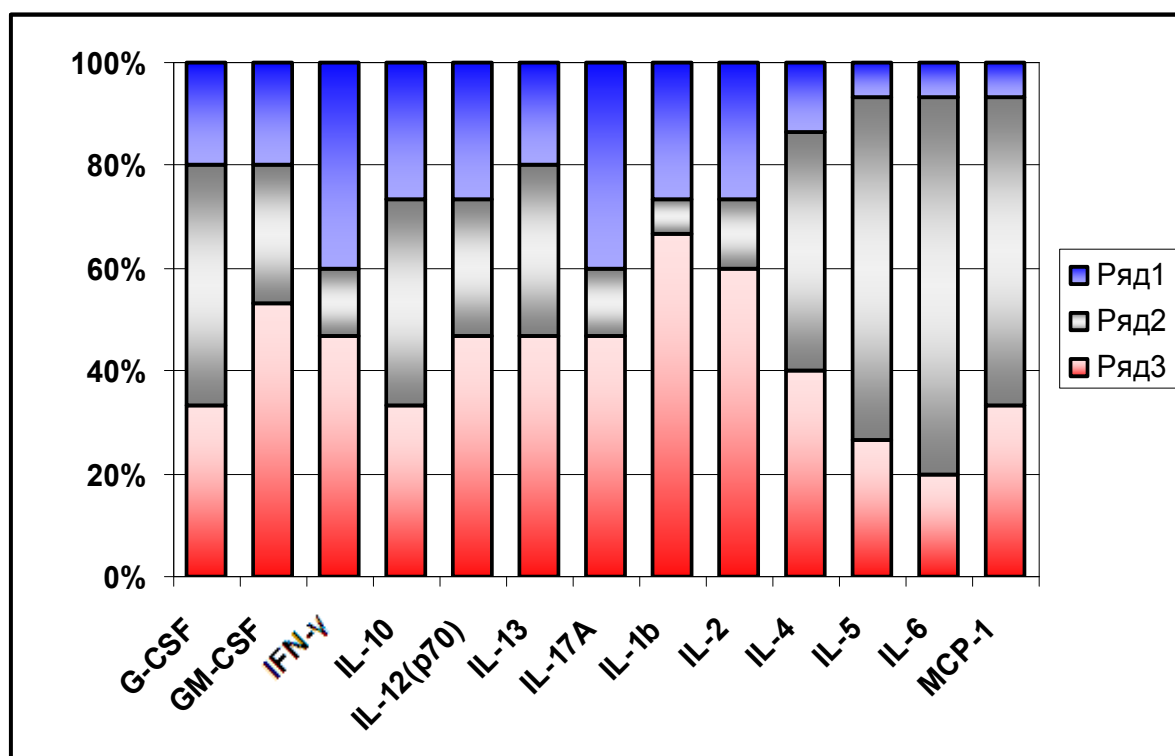


Рисунок 3 – Структура штаммов *S. aureus* с учетом эффектов воздействия синтетического пептида ZP2 на продукцию бактериями цитокиноподобных веществ (ЦПВ)

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).

Кроме того, вариабельность ответной реакции клинических штаммов золотистого стафилококка проявлялась и в степени выраженности изменения продукции ЦПВ под действием синтетического пептида ZP2, что отражено в таблице 12.

Из представленных в таблице 12 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 исследуемых ЦПВ колебалась в диапазоне 12,0-65,8 % (амплитуда колебаний степени ингибирования продукции конкретных ЦПВ также была значительной).

Таблица 12 – Влияние синтетического пептида ZP2 на продукцию *S.aureus* (n=15) цитокиноподобных веществ (ЦПВ)

Цитокины	Эффекты и параметры влияния синтетического пептида ZP2 на продукцию <i>S.aureus</i> ЦПВ				
	Ингибирование		Индифферентность	Стимулирование	
	Доля штаммов (%)	Степень ингибирования (min...max M±m, %)	Доля штаммов без изменения (%)	Доля штаммов (%)	Степень стимулирования (min-max M±m, %)
G-CSF	20,0	<u>18,1-40,2</u> 30,4±4,1	46,7	33,3	<u>40,1-421,6</u> +134,3±48,7
GM-CSF	20,0	<u>10,1-50,0</u> 27,4±7,5	26,7	53,3	<u>16,9-573,3</u> +198,4±43,7
INF-γ	40,0	<u>10,4-78,8</u> 37,5±8,9	13,3	46,7	<u>15,2-366,7</u> +102,4±32,3
IL-10	26,7	<u>47,0-73,8</u> 58,7±3,9	40,0	33,3	<u>55,8-741,7</u> +283,9±79,0
IL-12p70	26,7	<u>25,5-35,5</u> 30,7±1,7	26,7	46,7	<u>17,3-2869,0</u> +482,7±150,4
IL-13	20,0	<u>27,2-75,7</u> 48,9±9,0	33,3	46,7	<u>38,5-611,1</u> +158,3±52,3
IL-17A	40,0	<u>10,7-29,2</u> 22,1±2,0	13,3	46,7	<u>18,4-125,9</u> +57,2±9,4
IL-1β	26,7	<u>19,1-38,3</u> 27,0±3,1	6,7	66,7	<u>36,2-179,4</u> +110,1±9,4
IL-2	26,7	<u>26,1-54,7</u> 39,9±4,0	13,3	60,0	<u>18,6-113,9</u> +65,4±8,7
IL-4	13,3	<u>23,1-37,8</u> 30,5±4,3	46,7	40,0	<u>31,6-546,9</u> +155,3±54,1
IL-5	6,7	<u>11,0-13,1</u> 12,0±1,1	66,7	26,7	<u>13,6-31,6</u> +22,4±2,6
IL-6	6,7	<u>65,1-67,9</u> 65,8±1,6	73,3	20,0	<u>139,9-242,6</u> +200,5±19,6
MCP-1	6,7	<u>48,8-56,2</u> 51,4±2,8	60,0	33,3	<u>57,5-176,6</u> +112,6±15,7
MIP-1β	13,3	<u>26,1-57,8</u> 42,0±9,2	46,7	40,0	<u>51,5-191,1</u> +115,5±14,2
TGF-α	6,7	<u>50,8-64,2</u> 54,9±2,4	60,0	33,3	<u>20,0-200,0</u> +72,2±21,3

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 *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 ($+283,9 \pm 79,0$ %) 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 исследованной выборки клинических изолятов *S.aureus* по их ответной реакции на присутствие в питательной среде синтетического пептида 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.

Представленные данные интересны в нескольких аспектах.

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

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 (IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ) выявлялись в относительно высоких концентрациях (>20 пг/мл), сопоставимых с уровнем этих цитокинов в супернатантах активированных нейтрофилов [21].

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 исследования.

В прикладном аспекте полученные данные указывают на подверженность продукции бактериями ЦПВ регуляции экзогенными факторами, в частности, синтетическим пептидом ZP2, который является

основным компонентом новых косметических средств – АЦЕГРАМ-спрей и АЦЕГРАМ-гель [21].

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 вышеизложенного возникает серия логичных вопросов (на которые пока трудно дать внятные ответы). Действительно ли регистрируемые тест-системой Luminex (США) в супернатантах бактерий отдельные ЦПВ являются структурными и функциональными аналогами истинных цитокинов, синтезируемых иммунокомпетентными клетками макроорганизма? Какова генетическая детерминация (нуклеотидная, 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 эукариот? Являются ли ЦПВ бактерий эволюционно более древним приобретением, чем цитокины макроорганизма, или они «заимствованы» у последних 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 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.

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 (IL-12p70, IL-17A, G-CSF, INF- γ) 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) цитокины не были выявлены.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В 4 ГЛАВЕ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемых в электронной международной базе данных Scopus:

1. 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).

2. 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 – N/A, РИНЦ – 0,797).

3. Оценка уровней цитокиноподобных веществ 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 – N/A, РИНЦ – 0,457).

4. 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).

Публикации в других изданиях:

5. *Staphylococcus aureus*: спонтанная продукция цитокиноподобных

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>). doi 10.24411/2304-9081-2017-00016 (РИНЦ – 0,366).

ГЛАВА 5 – ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ZP2 НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ НЕЙТРОФИЛАМИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ БАКТЕРИЙ *IN VITRO*

5.1 – Влияние синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокинов нейтрофилами при воздействии стафилококков *in vitro*

На первом этапе исследований мы сравнили воздействие синтетического пептида активного центра ГМ-ГСФ (ZP2) на активность цитокинопродукции нейтрофилов при комбинированном воздействии стафилококков различных видов на клетки.

Как видно из таблицы 13 *S.epidermidis* при совместном культивировании с пептидом блокирует активацию продукции цитокинов нейтрофилами (15 из 17 исследованных). Несколько иначе себя ведут *S.aureus*. Они блокируют активацию цитокинопродукции 11 цитокинов, но достоверно стимулируют продукцию 3 цитокинов (IL-1 β , IL-2, G-CSF).

Возможно, такие различия как-то связаны с цитоконоподобными веществами, секретируемыми самими бактериями, поэтому следующим этапом наших исследований явилось исследование влияния супернатантов этих бактерий на продукцию цитокинов нейтрофилов при воздействии на них синтетического пептида ZP2.

Таблица 13 – Сравнительная характеристика содержания цитокинов в супернатанте клеток при контакте нейтрофилов со стафилококками разных видов и пептидом ZP2 ($M \pm m$), $n=10$

Цитокины (пг/мл)	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	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	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	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	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	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	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	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-1 β	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	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	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	9,5±1,3	12,7±2,3	10,3±0,5	10,0±1,0
IL-6	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	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	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	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	12,4±1,9	19,4±3,7	13,8±0,5	12,5±1,5
MIP-1 β	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: p_1 – достоверность различий по отношению к супернатантам нейтрофилов; p_2 - по отношению к супернатантам нейтрофилов, активированных синтетическим пептидом ZP2

Таблица 14 - Сравнительная характеристика содержания цитокинов в супернатанте клеток при контакте нейтрофилов с продуктами секреции стафилококков разных видов и пептидом ZP2 ($M \pm m$), $n=10$

Цитокины (пг/мл)	Супернатант нейтрофилов (контроль 1)	Супернатант нейтрофилов + ZP2 (контроль 2)	Супернатант нейтрофилов + супернатант <i>S.aureus</i> + ZP2 (опыт 1)	Супернатант нейтрофилов + супернатант <i>S.epidermidis</i> + ZP2 (опыт 2)
G-CSF	19,3±1,6	34,6±2,7 $p_1, p_2 < 0,05$	22,5±1,6 $p_2 < 0,05$	24, ±4,0 $p_2 < 0,05$
GM-CSF	250,3±5,6	277,6±7,3 $p_1 < 0,05$	259,1±2,8 $p_2 < 0,05$	263,5±5,5 $p_2 < 0,05$
IL-10	35,4±3,4	42,3±4,3 $p_1 < 0,05$	40,3±0,5	39,0±1,0
IL-12p70	23,5±1,6	60,5±4,2 $p_1 < 0,05$	35,5±3,3 $p_2 < 0,05$	31,5±4,5 $p_2 < 0,05$
INF- γ	13,5±1,5	23,6±2,7 $p_1 < 0,05$	16,5±1,2 $p_2 < 0,05$	17,0±2,0 $p_2 < 0,05$
IL-13	11,4±1,3	18,6±3,8 $p_1 < 0,05$	13,3±0,9 $p_2 < 0,05$	12,0±1,0 $p_2 < 0,05$
IL-17A	62,5±5,6	337,8±11,8 $p_1 < 0,001$	157,8±33,3 $p_2 < 0,01$	149,8±59,8 $p_2 < 0,01$
IL-1 β	42,3±3,4	287,5±16,8 $p_1 < 0,01$	261,5±118,3	160,5±52,5 $p_2 < 0,01$
IL-2	38,4±4,5	49,2±6,8	40,8±1,5	43,0±5,0
IL-4	23,5±2,4	53,5±5,9 $p_1 < 0,05$	33,3±3,8 $p_2 < 0,05$	36,3±6,3 $p_2 < 0,05$
IL-5	9,5±1,3	12,7±2,3	10,3±0,5	10,5±0,5
IL-6	122,5±9,7	1574,6±76,8 $p_1 < 0,001$	706,8±206,4 $p_2 < 0,001$	1456,0±638,0
IL-7	12,5±1,6	18,6±2,2 $p_1 < 0,05$	15,8±1,3	14,5±2,5
TNF- α	16,2±1,9	67,7±6,7 $p_1 < 0,05$	26,8±3,4 $p_2 < 0,05$	31,5±10,5 $p_2 < 0,05$
IL-8	320,9±14,5	3541,7±211,4 p_1 и $p_2 < 0,001$	1042,1±266,4 $p_2 < 0,001$	2265,3±321,3 $p_2 < 0,001$
MCP-1	12,4±1,9	19,4±3,7	14,8±0,6	15,0±1,0
MIP-1 β	1492,8±72,7	12538,2±768,9 $p_1 < 0,001$	5697,3±140,4 $p_2 < 0,001$	5196,0±199,0 $p_2 < 0,001$

Примечание: p_1 – достоверность различий по отношению к супернатантам нейтрофилов; p_2 - по отношению к супернатантам нейтрофилов, активированных пептидом ZP2

Как видно из таблицы 14, супернатанты бактерий практически повторяют механизм воздействия на цитокинопродукцию активированных пептидом нейтрофилов. Так, супернатанты *S.epidermidis* снижали секрецию чуть меньше цитокинов – 11 из 17 исследованных (сами бактерии 15 из 17). Несколько иначе вели себя супернатанты *S.aureus* по сравнению с живыми бактериями. Так, 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 синтетическим пептидом ZP2 (7 из 17 исследованных 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 их продуктов метаболизма на цитокинопродукцию нейтрофилов с- и без- активации синтетическим пептидом ZP2 (таблицы 15-16).

Таблица 15 – Сравнительная характеристика содержания цитокинов в супернатанте клеток при контакте нейтрофилов со стафилококками разных видов и синтетическим пептидом ZP2 ($M \pm m$), $n=10$

Цитокины (пг/мл)	Супернатант нейтрофилов + <i>S.aureus</i>	Супернатант нейтрофилов + <i>S.aureus</i> + ZP2	Супернатант нейтрофилов + <i>S.epidermidis</i>	Супернатант нейтрофилов + <i>S.epidermidis</i> + ZP2
G-CSF	40,5±2,2	55,8±3,8 $p_1 < 0,05$	17,0±2,7	18,5±1,5
GM-CSF	252,8±3,4	249,1±6,2	234,5±7,3	238,5±8,5
IL-10	46,1±4,4	52,0±4,3	35,3±4,0	35,5±2,5
IL-12p70	28,3±3,1	34,8±10,5	20,5±1,5 $p_1 < 0,05$	20,5±3,5
INF- γ	14,2±0,7	14,6±0,9	12,5±1,7	12,5±0,5
IL-13	11,5±0,5	12,0±0,6	10,6±1,8	11,0±1,0
IL-17A	117,2±9,8	152,3±8,4 $p_2 < 0,05$	46,8±5,3	46,0±11,0
IL-1 β	677,8±89,9	930,5±38,9 $p_1 < 0,01$	40,5±4,2	50,0±6,0
IL-2	53,3±5,3	73,8±7,4 $p_2 < 0,05$	33,2±2,8	34,0±2,0
IL-4	24,5±1,9	25,3±1,3	21,5±1,9	21,8±2,3
IL-5	9,6±0,9	10,3±0,5	9,7±2,3	10,0±1,0
IL-6	81,5±7,8	132,6±22,8 $p_1 < 0,05$	39,6±3,8	48,5±25,5
IL-7	11,8±1,3	12,8±0,8	10,5±1,2	11,0±1,0
TNF- α	22,3±1,4	21,5±1,9	16,1±1,7	16,5±0,5
IL-8	305,1±15,4	374,5±76,6	59,7±2,4	167,0±29,0 $p_2 < 0,05$
MCP-1	13,4±1,2	13,8±0,5	12,4±1,7	12,5±1,5
MIP-1 β	1319,5±71,7	1438,1±305,1	564,2±88,9	741,3±156,8

Примечание: p_1 – достоверность различий по отношению к супернатантам нейтрофилов активированных *S.aureus*; p_2 - по отношению к супернатантам нейтрофилов, активированных *S.epidermidis*

Как видно из таблицы 15, *S.epidermidis* практически полностью отменяет воздействие на нейтрофилы ZP2 пептидом, за исключением секреции IL-8. В то время как по сравнению со *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 имели только тенденцию к повышению.

Поэтому важно было сравнить активацию цитокинопродукции продуктами секреции бактерий и их комбинации с синтетическим пептидом ZP2 (таблица 16).

Таблица 16 – Сравнительная характеристика содержания цитокинов в супернатанте клеток при контакте нейтрофилов с продуктами секреции стафилококков разных видов и синтетическим пептидом ZP2 (M \pm m), n=10

Цитокины (пг/мл)	Супернатант нейтрофилов + <i>S.aureus</i>	Супернатант нейтрофилов + супернатант <i>S.aureus</i> + ZP2	Супернатант нейтрофилов + <i>S.epidermidis</i>	Супернатант нейтрофилов + супернатант <i>S.epidermidis</i> + ZP2
G-CSF	40,5 \pm 2,2	22,5 \pm 1,6 $p_1 < 0,05$	17,0 \pm 2,7	24, \pm 4,0 $p_2 < 0,05$
GM-CSF	252,8 \pm 3,4	259,1 \pm 2,8	234,5 \pm 7,3	263,5 \pm 5,5
IL-10	46,1 \pm 4,4	40,3 \pm 0,5	35,3 \pm 4,0	39,0 \pm 1,0
IL-12p70	28,3 \pm 3,1	35,5 \pm 3,3	20,5 \pm 1,5	31,5 \pm 4,5 $p_2 < 0,05$
INF- γ	14,2 \pm 0,7	16,5 \pm 1,2	12,5 \pm 1,7	17,0 \pm 2,0 $p_2 < 0,05$
IL-13	11,5 \pm 0,5	13,3 \pm 0,9	10,6 \pm 1,8	12,0 \pm 1,0
IL-17A	117,2 \pm 9,8	157,8 \pm 33,3 $p_1 < 0,05$	46,8 \pm 5,3	149,8 \pm 59,8 $p_2 < 0,05$
IL-1 β	677,8 \pm 89,9	261,5 \pm 118,3 $p_1 < 0,05$	40,5 \pm 4,2	160,5 \pm 52,5 $p_2 < 0,05$
IL-2	53,3 \pm 5,3	40,8 \pm 1,5	33,2 \pm 2,8	43,0 \pm 5,0
IL-4	24,5 \pm 1,9	33,3 \pm 3,8 $p_2 < 0,05$	21,5 \pm 1,9	36,3 \pm 6,3 $p_2 < 0,05$
IL-5	9,6 \pm 0,9	10,3 \pm 0,5	9,7 \pm 2,3	10,5 \pm 0,5
IL-6	81,5 \pm 7,8	706,8 \pm 206,4 $p_1 < 0,05$	39,6 \pm 3,8	1456,0 \pm 638,0 $p_2 < 0,05$
IL-7	11,8 \pm 1,3	15,8 \pm 1,3	10,5 \pm 1,2	14,5 \pm 2,5
TNF- α	22,3 \pm 1,4	26,8 \pm 3,4	16,1 \pm 1,7	31,5 \pm 10,5 $p_2 < 0,05$
IL-8	305,1 \pm 15,4	1042,1 \pm 266,4 $p_1 < 0,05$	59,7 \pm 2,4	2265,3 \pm 321,3 $p_2 < 0,001$
MCP-1	13,4 \pm 1,2	14,8 \pm 0,6	12,4 \pm 1,7	15,0 \pm 1,0
MIP-1 β	1319,5 \pm 71,7	5697,3 \pm 140,4 $p_1 < 0,001$	564,2 \pm 88,9	5196,0 \pm 199,0 $p_2 < 0,001$

Примечание: p_1 – достоверность различий по отношению к супернатантам нейтрофилов активированных продуктами секреции *S.aureus*,
 p_2 – по отношению к супернатантам нейтрофилов, активированных продуктами секреции *S.epidermidis*

Из таблицы 16 видно, что 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 тоже время не подавлял 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.

Таким образом, стафилококки разных видов и их продукты жизнедеятельности оказывают вариабельное влияние на секрецию (продукцию) цитокинов нейтрофилами как неактивированными, так и активированными синтетическим пептидом ZP2. Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях *in vivo*, в том числе при развитии инфекционно-воспалительного процесса с участием стафилококков, в очаге поражения могут складываться сложные взаимоотношения между фагоцитами, возбудителями и продуктами их метаболизма; в реализацию которых неминуемо вовлекаются цитокины, секретируемые нейтрофилами.

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.

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.

5.2 – Влияние синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокинов нейтрофилами при воздействии энтеробактерий *in vitro*

Развитие воспалительного процесса, в том числе вызванного инфекционными агентами, в частности, энтеробактериями, сопровождается воспалительной реакцией с выработкой клетками иммунной системы различных цитокинов, выполняющих регуляторную функцию [25].

Учитывая, что *E.coli* принадлежат к индигенной (комменсальной, потенциально патогенной) микрофлоре макроорганизма [12], важным представлялось оценить влияние кишечных палочек на продукцию цитокинов нейтрофилами в условиях *in vitro* – при взаимодействии фагоцитов с клиническими штаммами этих микроорганизмов. При этом на клетки-фагоциты могут воздействовать как живые микроорганизмы (при фагоцитозе), так и их продукты секреции (метаболиты).

Как мы показали ранее, синтетический пептид ZP2 вызывает значительное повышение секреции широкого спектра цитокинов нейтрофилами периферической крови. Поэтому очень важно было оценить влияние комбинаторного воздействия синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокинов нейтрофилами в условиях фагоцитоза *E.coli* и влияния на фагоциты супернатантов бульонных суточных культур эшерихий.

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ характера влияния синтетического пептида ZP2, клинических изолятов *E.coli* и супернатанты суточных культур *E.coli* и их комбинаций на секрецию широкого спектра цитокинов нейтрофилами человека *in vitro*.

Влияние на секрецию цитокинов нейтрофилами определяли на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием системы мультиплексного анализа Bio-Plex компании Bio-Rad (США) для определения 17 цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, INF- γ , IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, TNF- α , MIP-1 β) в супернатантах клеток после 1 часа

инкубации нейтрофилов с живыми бактериями в соотношении 1:20; супернатантами бактерий, синтетическим пептидом ZP2, контролями 1 и 2 соответственно служили среда RPMI-1640 и супернатант нейтрофилов, инкубированных в среде RPMI-1640 без бактерий, их продуктов секреции и пептида. Полученные результаты округляли до 0,1 пг/мл.

Прежде чем проанализировать влияние синтетического пептида ZP2 на секрецию нейтрофилами цитокинов, мы исследовали влияние *E.coli* и супернатантов суточных культур *E.coli* на секрецию/продукцию цитокинов этими клетками. Как видно из таблицы 17, нейтрофилы секретируют в среду инкубации следующие 7 цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, GM-CSF, MIP-1 β . При фагоцитозе *E.coli* и добавлении супернатантов суточных культур *E.coli* нейтрофилы увеличивают спектр секретируемых цитокинов и в среде инкубации определяются достоверное увеличение уже 10 цитокинов: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , MIP-1 β , при этом надо отметить тот факт, что и сами бактерии, и их метаболиты увеличивают секрецию одних и тех же цитокинов по сравнению со средой RPMI 1640. При сравнении со спонтанной продукцией цитокинов нейтрофилами выявлено (контроль 2), что и бактерии, и их супернатанты суточных культур увеличивали секрецию/продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови таких, как IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, TNF- α , MIP-1 β , то есть стимулировали провоспалительный потенциал фагоцитов.

Учитывая полученные результаты, важно было выявить, как влияют на секрецию цитокинов нейтрофилов комбинации синтетического пептида ГМ-КСФ (ZP2), бактерий и супернатантов суточных культур бактерий.

Таблица 17 – Влияние *E.coli* и супернатантов суточных культур *E.coli* на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови (M±m) n=10

Цитокины (пг/мл)	Среда RPMI-1640 (контроль 1)	Супернатант нейтрофилов (контроль 2)	Супернатант нейтрофилов + <i>E.coli</i> (опыт 1)	Супернатант нейтрофилов + супернатант <i>E.coli</i> (опыт 2)
G-CSF	16,2±1,5	19,3±1,6	22,0±1,5 p ₁ <0,05	21,0±0,6 p ₁ <0,05
GM-CSF	210,2±6,2	250,3±5,6 p ₁ <0,05	251,3±6,6 p ₁ <0,05	250,3±4,5 p ₁ <0,05
IL-10	32,2±2,6	35,4±3,4	37,3±0,9	36,3±1,3
IL-12p70	13,3±1,7	23,5±1,6 p ₁ <0,05	34,0±1,2 p ₁ <0,05	32,2±0,4 p ₁ <0,05
INF-γ	13,2±1,3	13,5±1,5	15,3±0,9	15,7±0,3
IL-13	10,1±1,1	11,4±1,3	12,0±0,6	12,0±0,3
IL-17A	29,5±2,6	62,5±5,6 p ₁ <0,05	145,7±14,7 p ₁ и p ₂ <0,05	113,0±8,0 p ₁ и p ₂ <0,05
IL-1β	13,4±1,5	42,3±3,4 p ₁ <0,05	147,0±10,5 p ₁ и p ₂ <0,05	157,3±26,7 p ₁ и p ₂ <0,05
IL-2	35,5±3,5	38,4±4,5	40,7±1,5	39,0±1,0
IL-4	17,3±1,8	23,5±2,4	35,2±2,0 p ₁ и p ₂ <0,05	31,3±0,9 p ₁ и p ₂ <0,05
IL-5	9,1±1,1	9,5±1,3	10,0±0,6	10,0±0,4
IL-6	17,6±1,8	122,5±9,7 p ₁ <0,05	658,0±185,0 p ₁ и p ₂ <0,05	950,3±137,4 p ₁ и p ₂ <0,05
IL-7	10,3±1,2	12,5±1,6	14,7±0,7	13,7±0,3
TNF-α	15,3±1,8	16,2±1,9	37,7±1,2 p ₁ и p ₂ <0,05	22,5±1,0 p ₁ и p ₂ <0,05
IL-8	13,4±2,3	320,9±14,5 p ₁ <0,01	1244,8±229,4 p ₁ и p ₂ <0,001	1873,2±325,7 p ₁ и p ₂ <0,001
MCP-1	12,7±1,8	12,4±1,9	13,7±0,7	14,0±0,3
MIP-1β	40,7±4,8	1492,8±72,7 p ₁ <0,01	5466,5±384,5 p ₁ и p ₂ <0,001	4370,2±292,9 p ₁ и 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).

Таблица 18 – Сравнительная характеристика содержания цитокинов в контрольных и опытных пробах, в том числе при добавлении к нейтрофилам синтетического пептида ZP2, *E.coli*, супернатантов суточных культур *E.coli*. (M±m) n=10

Цитокины (пг/мл)	Среда RPMI-1640 (контроль 1)	Супернатант нейтрофилов (контроль 2)	Супернатант нейтрофилов + ZP2 (опыт 3)	Супернатант нейтрофилов + ZP2+ <i>E.coli</i> (опыт 4)	Супернатант нейтрофилов + ZP2+ супернатант <i>E.coli</i> (опыт 5)
G-CSF	16,2±1,5	19,3±1,6	34,6±2,7 p ₁ , p ₂ <0,05	23,0±1,0 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	24,7±0,9 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
GM-CSF	210,2±6,2	250,3±5,6 p ₁ <0,05	277,6±7,3 p ₁ , p ₂ <0,05	263,0±4,6 p ₁ , p ₂ <0,05	259,2±5,4 p ₁ , p ₃ <0,05
IL-10	32,2±2,6	35,4±3,4	42,3±4,3 p ₁ , p ₂ <0,05	41,7,0±0,9 p ₁ <0,05	38,2±1,0 p ₁ <0,05
IL-12p70	13,3±1,7	23,5±1,6 p ₁ <0,05	60,5±4,2 p ₁ , p ₂ <0,05	33,8±0,2 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	41,3±2,4 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
INF-γ	13,2±1,3	13,5±1,5	23,6±2,7 p ₁ , p ₂ <0,05	16,3±0,7 p ₃ <0,05	18,0±1,2 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
IL-13	10,1±1,1	11,4±1,3	18,6±3,8 p ₁ , p ₂ <0,05	12,3±0,3 p ₃ <0,05	13,0±0,6 p ₃ <0,05
IL-17A	29,5±2,6	62,5±5,6 p ₁ <0,05	337,8±11,8 p ₁ <0,001, p ₂ <0,01	139,7±1,7 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	172,8±12,6 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
IL-1β	13,4±1,5	42,3±3,4 p ₁ <0,05	287,5±16,8 p ₁ , p ₂ <0,01	211,7±51,5 p ₁ , p ₂ <0,05	240,8±42,5 p ₁ , p ₂ <0,05
IL-2	35,5±3,5	38,4±4,5	49,2±6,8	39,7±1,5	42,2±1,6
IL-4	17,3±1,8	23,5±2,4	53,5±5,9 p ₁ , p ₂ <0,05	33,7±0,3 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	37,8±2,5 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
IL-5	9,1±1,1	9,5±1,3	12,7±2,3	10,3±0,3	10,7±0,3
IL-6	17,6±1,8	122,5±9,7 p ₁ <0,05	1574,6±76,8 p ₁ , p ₂ <0,001	709,2±106,8 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	1265,7±196,4 p ₁ , p ₂ <0,05
IL-7	10,3±1,2	12,5±1,6	18,6±2,2 p ₁ , p ₂ <0,05	14,3±0,3 p ₁ , p ₃ <0,05	16,3±0,7 p ₁ , p ₂ <0,05
TNF-α	15,3±1,8	16,2±1,9	67,7±6,7 p ₁ , p ₂ <0,05	40,5±1,5 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	35,3±4,8 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
IL-8	13,4±2,3	320,9±14,5 p ₁ <0,01	3541,7±211,4 p ₁ , p ₂ <0,001	1160,3±113,7 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	1789,2±363,9 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
MCP-1	12,7±1,8	12,4±1,9	19,4±3,7	14,7±0,3	14,7±0,9
MIP-1β	40,7±4,8	1492,8±72,7 p ₁ <0,01	12538,2±768,9 p ₁ , p ₂ <0,001	5929,7,1±282,1 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	6988,8±292,4 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05

Примечание: p₁ - достоверность различий по отношению к среде RPMI-1640 (контроль 1); p₂ - достоверность различий по отношению к супернатантам нейтрофилов (контроль 2). p₃ – достоверность по отношению к супернатантам активированных нейтрофилов.

Как показали наши исследования (таблица 18), синтетический пептид ZP2 значительно усиливал продукцию/секрецию практически всех исследованных цитокинов - IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β (14 из 17) как по сравнению с контролем 1 (среда RPMI 1640), так и по сравнению с контролем 2 (супернатант нейтрофилов). При инкубации нейтрофилов в комбинациях ZP2 с живыми бактериями и синтетическим пептидом ZP2 с их метаболитами, были получены немного иные данные. Так, по сравнению с контролем 1 (среда инкубации) при комбинаторном воздействии бактерий и ZP2 также увеличивалась секреция/продукция практически тех же цитокинов, что и на синтетический пептид ZP2 без бактерий IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , MIP-1 β , за исключением INF- γ , IL-13 (12 из 17), а по сравнению с контролем 2 (супернатант нейтрофилов без добавления бактерий и пептида) – IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , MIP-1 β , за исключением INF- γ , IL-10, IL-13 (11 из 17). При оценке действия метаболитов суточных культур бактерий в комбинации с синтетическим пептидом ZP2 наблюдалась очень похожая картина, так, по сравнению с контролем 1 - IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β , за исключением 1 цитокина IL-13 (13 из 17), а по сравнению с контролем 2 -, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β , за исключением 3 цитокинов – GM-CSF, IL-10, IL-13 (11 из 17).

При этом обращает на себя внимание, что основной пул цитокинов остается повышенным при данных комбинациях синтетического пептида ZP2 с бактериями и их метаболитами. При сравнении влияния самого пептида (опыт 3) с комбинацией пептида с бактериями и их метаболитами (опыт 4 и 5), была выявлена несколько иная картина. Во-первых, все варианты комбинаций либо снижали, либо вообще отменяли действие пептида на цитокиновую продукцию нейтрофилов периферической крови. Так, бактерии

снижали цитокиновую активированных синтетическим пептидом ZP2 нейтрофилов на следующие цитокины: IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β , а их метаболиты на IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β (на 11 цитокинов в том и другом случае, отличия были только в 2 цитокинах IL-6 и GM-CSF для бактерий и их метаболитах соответственно).

Для оценки степени выраженности воздействия комбинаций синтетического пептида ZP2 и бактерий и их метаболитов мы оценили кратность воздействия их на цитокинопродукцию нейтрофилов в сравнении с действием пептида без бактериальных компонентов.

Как показали исследования (таблица 19), степень подавления была более выражена при комбинаторном влиянии бактерий и пептида ZP2 и колебалась в диапазоне от 0,33 до 0,76, в то время как воздействие супернатантов суточных бульонных культур и пептида было несколько менее выраженным от 0,51 до 0,93, при этом такое различие отмечалось для всех достоверно сниженных цитокинов.

Таким образом, бактерии вида *E.coli* и их метаболиты способны усиливать секрецию нейтрофилами широкого спектра провоспалительных цитокинов (11, 12 из 17 исследованных цитокинов). Синтетический пептид ZP2 также стимулирует продукцию цитокинов нейтрофилами, при этом спектр и степень активации их выше, чем у бактерий и их метаболитов (14 цитокинов из 17 исследованных). При исследовании комбинаторного воздействия бактерий, их метаболитов и синтетического пептида ZP 2, выявлено, что комбинаторные воздействия, в целом, приводят к снижению активности пептида практически по всем провоспалительным цитокинам (11 из 17 исследованных).

Таблица 19 – Кратность изменений продукции цитокинов нейтрофилами при комбинации воздействия пептида ZP2 с бактериями *E.coli* и их метаболитами

Цитокины (пг/мл)	Супернатант нейтрофилов + ZP2 (опыт 3)	Супернатант нейтрофилов + ZP2+ <i>E.coli</i> (опыт 4)	Кратность изменения активности цитокинов в супернатанте нейтрофилов + ZP2+ <i>E.coli</i> (опыт 4)	Супернатант нейтрофилов + ZP2+ супернатант <i>E.coli</i> (опыт 5)	Кратность изменения активности цитокинов супернатанте нейтрофилов + ZP2+ <i>E.coli</i> (опыт 5)
G-CSF	34,6±2,7	23,0±1,0 p ₁ <0,05	0,67	24,7±0,9 p ₁ <0,05	0,71
GM-CSF	277,6±7,3	263,0±4,6 p ₁ >0,05	-	259,2±5,4 p ₁ <0,05	0,93
IL-12p70	60,5±4,2	33,8±0,2 p ₁ <0,05	0,55	41,3±2,4 p ₁ <0,05	0,68
INF-γ	23,6±2,7	16,3±0,7 p ₁ <0,05	0,69	18,0±1,2 p ₁ <0,05	0,76
IL-13	18,6±3,8	12,3±0,3 p ₁ <0,05	0,66	13,0±0,6 p ₁ <0,05	0,70
IL-17A	337,8±11,8	139,7±1,7 p ₁ <0,05	0,41	172,8±12,6 p ₁ <0,05	0,51
IL-4	53,5±5,9	33,7±0,3 p ₁ <0,05	0,62	37,8±2,5 p ₁ <0,05	0,71
IL-6	1574,6±76,8	709,2±106,8 p ₁ <0,05	0,45	1265,7±196,4	-
IL-7	18,6±2,2	14,3±0,3 p ₃ <0,05	0,76	16,3±0,7	-
TNF-α	67,7±6,7	40,5±1,5 p ₁ <0,05	0,60	35,3±4,8 p ₁ <0,05	0,52
IL-8	3541,7±211,4	1160,3±113,7 p ₁ <0,05	0,33	1789,2±363,9 p ₁ <0,05	0,51
MIP-1β	12538,2±768,9	5929,7,1±282,1 p ₁ <0,05	0,48	6988,8±292,4 p ₁ <0,05	0,56

Примечание: p₁ – достоверность по отношению к супернатантам нейтрофилов, активированных ZP2

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 правильного 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В 5 ГЛАВЕ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемых в электронной международной базе данных Scopus:

1. 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).

2. 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).

3. 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 – 0,389, PubMed).

Публикации в других изданиях:

4. *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>). doi 10.24411/2304-9081-2017-00016.(РИНЦ – 0,273).

5. 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).

6. 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).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск лекарственных средств на основе цитокинов для защиты при различных заболеваниях, обладающих плеiotропными свойствами, является одной из приоритетных задач современной науки. Как мы показали ранее в обзоре литературы, одними из таких средств могут быть биологически активные синтетические пептидные центры GM-CSF [1, 2, 3, 7, 8, 9, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 28, 29, 30, 37, 41, 48, 46, 47, 55, 56, 57, 60, 64].

Любые повреждения тканей макроорганизма, в том числе вызванные инфекционными агентами, в частности, стафилококками и энтеробактериями, сопровождаются воспалительной реакцией с выработкой клетками иммунной системы различных цитокинов, выполняющих регуляторную функцию [25].

Одними из первых в инфекционно-воспалительный процесс вовлекаются фагоцитарные клетки и, прежде всего, нейтрофилы. Ранее нами было показано, что эти клетки являются удобной моделью для оценки цитокинопродукции фагоцитами, в том числе при исследовании влияния различных веществ на активацию секреции различных цитокинов нейтрофилами

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.

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 [12, 40], важным представлялось оценить межвидовую и внутривидовую

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, целью настоящего исследования явился 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 градиентного 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 доводили 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). выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы и из влагалища у женщин с миомой матки. Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне в течение 24 часов, трижды отмывали физиологическим раствором и бактериальную суспензию доводили до концентрации 10^8 бактерий/мл.

Влияние стафилококков и кишечных палочек на секрецию цитокинов нейтрофилами определяли на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием системы мультиплексного анализа Bio-Plex компании Bio-Rad (США) для определения 17 цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β) 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. Полученные результаты округляли до 0,1 пг/мл.

Использованная в опытах *in vitro* тест-система для выявления 17 цитокинов успешно работала по всей «цитокиновой линейке», позволяя

эффективно обнаруживать 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 превышала контрольный уровень (среда RPMI-1640) в 1,2-7,0 раз ($p < 0,05-0,001$), а главное – к таким цитокинам-лидерам, как IL-8 и MIP-1 β , кратность увеличения концентрации которых относительно контроля 1 составила 23,9 и 36,7 раза, соответственно.

Эти результаты, очевидно, указывают на то, что процедуры выделения, подготовки и хранения нейтрофилов периферической крови человека способны их активировать еще на этапе пробоподготовки и инкубации в среде культивирования.

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 исследованных цитокинов, что указывает на способность бактерий существенно влиять на «секретируемый цитокиновый профиль» нейтрофилов.

Необходимо отметить, что 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-8, IL-10, IL-17A, TNF- α , G-CSF 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 выросла в 1,3-2,1 раза ($p < 0,05$), а содержание IL-1 β , который является одним из ключевых цитокинов при развитии воспалительного процесса, увеличилось в 16,02 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем 2. Вместе с тем было зафиксировано, что при инкубации нейтрофилов с *S.aureus* в супернатанте достоверно снижалась концентрация IL-6 ($81,5 \pm 7,8$ против $122,5 \pm 9,7$ пг/мл в контроле 2; $p < 0,05$).

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

В отличие от золотистого стафилококка исследованные 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-1 β .

При исследовании 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 IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, TNF- α и MIP-1 β . При этом надо отметить, что концентрация цитокинов в супернатанте нейтрофилов при фагоцитозе *E.coli* возрастала, в среднем, в 1,5-5,4 раза, а наиболее выраженный рост концентрации был выявлен у IL-1 β , IL-6, IL-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 IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, G-CSF, TNF- α 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.

Суммируя полученные данные, необходимо подчеркнуть несколько ключевых моментов.

Во-первых, предложенная нами модель оценки продукции цитокинов нейтрофилами в процессе часовой их инкубации с синтетическим пептидом ZP2 показала достаточно высокую эффективность не только при анализе влияния на фагоциты активных субстанций, но и при определении их реакции на живые микроорганизмы, в частности, стафилококки и кишечные палочки. При этом наиболее точным контролем для оценки влияния бактерий на продукцию фагоцитами цитокинов служит контроль 2 (супернатант нейтрофилов, инкубированных без бактерий). Использование этой модели позволило обнаружить, что часовой контакт нейтрофилов со стафилококками приводит к существенному изменению содержания широкого спектра цитокинов во внеклеточной среде – супернатанте. В то же время важно отметить, что в данной модели исследуется секреция уже синтезированных внутриклеточных цитокинов (преформированных), так как в течение 1 часа воздействия не может быть выраженного синтеза вновь образующихся цитокинов.

Во-вторых, экспериментально установлено, что контакт фагоцитов с *S.aureus* достоверно стимулировал продукцию нейтрофилами цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-17A, G-CSF и TNF- α , но ингибировал секрецию IL-6, тогда как взаимодействие клеток с *S.epidermidis* сопровождалось снижением содержания цитокинов IL-6, IL-8, IL-17A и MIP-1 β в супернатанте

нейтрофилов, а инкубация клеток с *E.coli* стимулировали продукцию/секрецию IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, TNF- α и MIP-1 β . С одной стороны, это указывает на зависимость цитокинопродукции нейтрофилов от таксономической принадлежности стафилококков и кишечных палочек (что требует исследования реакции фагоцитов на представителей иных различных видов бактерий); с другой стороны, эти результаты свидетельствуют о потенциальной возможности стафилококков и кишечных палочек влиять на регуляцию патологического процесса в очаге воспаления, изменяя содержание цитокинов во внеклеточной среде.

В-третьих, выявленные особенности реакции нейтрофилов на коагулазопозитивные (патогенные), коагулазонегативные (комменсальные) стафилококки и кишечные палочки могут отражать изменения цитокинового статуса макроорганизма при развитии инфекционно-воспалительных заболеваний стафилококковой и энтеробактериальной этиологии, а также при формировании резидентного стафилококкового или энтеробактериального бактерионосительства, когда комменсальная флора находится в депрессивном состоянии. Очевидно, эти обстоятельства необходимо учитывать при терапии и санации лиц с указанной патологией, в том числе с использованием цитокинов и препаратов, которые могут оказывать влияние на их продукцию клетками макроорганизма. К сожалению, пока такие подходы не разработаны.

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 IL-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 IL-4, IL-8 и IFN- γ [63]. 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 [12].

В целом, изложенный материал открывает широкие перспективы для дальнейшего научного поиска новых механизмов взаимодействия бактерий и клеток иммунной системы, результаты которого будут способствовать разработке более эффективных методов диагностики и терапии инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе эндогенной природы.

На первом этапе исследований мы сравнили воздействие синтетического пептида ZP2 на активность цитокинопродукции нейтрофилов при комбинированном воздействии стафилококков различных видов на клетки.

S.epidermidis при совместном культивировании с пептидом блокирует активацию продукции цитокинов нейтрофилами (15 из 17). 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 цитоконоподобными веществами, секретлируемыми самими бактериями, поэтому следующим этапом наших исследований явилось исследование влияния супернатантов этих бактерий на продукцию цитокинов нейтрофилов 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 меньше цитокинов – 11 из 17 исследованных (сами бактерии 15 из 17). Несколько иначе вели себя супернатанты *S.aureus* по сравнению с живыми бактериями. Так, 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 синтетическим пептидом ZP2 (7 из 17 исследованных 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 их продуктов метаболизма на цитокинопродукцию нейтрофилов с и без активации синтетическим пептидом ZP2.

S.epidermidis практически полностью отменяет воздействие на нейтрофилы ZP2 пептидом, за исключением секреции IL-8. В то время как по сравнению со *S.aureus* под действием пептида увеличивается секреция 5 цитокинов – IL-1 β , IL-2, IL-6, G-CSF, IL-17A, все остальные либо не изменялись, либо имели только тенденцию к повышению.

Поэтому важно было сравнить активацию цитокинопродукции продуктами секреции бактерий и их комбинации с синтетическим пептидом ZP2.

В отличие от живых бактерий депрессивный потенциал супернатантов значительно ниже. Так, при воздействии супернатантов *S.epidermidis* синтетический 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 тоже время не подавлял секрецию IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, 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.

Таким образом, стафилококки разных видов и их продукты жизнедеятельности оказывают переменное влияние на секрецию (продукцию) цитокинов нейтрофилами, в том числе и активированными синтетическим пептидом ZP2. Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях *in vivo*, в том числе при развитии инфекционно-воспалительного процесса с участием стафилококков, в очаге поражения могут складываться сложные взаимоотношения между фагоцитами, возбудителями и продуктами их метаболизма, в реализацию которых неминуемо вовлекаются цитокины, секретлируемые нейтрофилами.

В тоже 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.

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.

Развитие воспалительного процесса, в том числе вызванные инфекционными агентами, в частности энтеробактериями, сопровождаются воспалительной реакцией с выработкой клетками иммунной системы различных цитокинов, выполняющих регуляторную функцию [25].

Учитывая, что *E.coli* принадлежат к индигенной (комменсальной, потенциально патогенной) микрофлоре макроорганизма [12], важным представлялось оценить влияние кишечных палочек на продукцию цитокинов нейтрофилами в условиях *in vitro* – при взаимодействии фагоцитов с клиническими штаммами этих микроорганизмов. При этом на клетки – фагоциты могут воздействовать как живые микроорганизмы (при

фагоцитозе), так и их продукты секреции (метаболиты).

Как мы показали ранее, синтетический пептид ZP2 вызывает значительное повышение секреции широкого спектра цитокинов нейтрофилами периферической крови. Поэтому очень важно было оценить влияние комбинаторного воздействия синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокинов нейтрофилами в условиях фагоцитоза *E.coli* и влияния на фагоциты супернатантов бульонных суточных культур эшерихий.

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ характера влияния синтетического пептида ZP2, клинических изолятов *E.coli*, супернатантов суточных культур *E.coli* и их комбинаций на секрецию широкого спектра цитокинов нейтрофилами человека *in vitro*.

Влияние на секрецию цитокинов нейтрофилами определяли на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием системы мультиплексного анализа Bio-Plex компании Bio-Rad (США) для определения 17 цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β) в супернатантах клеток после 1 часа инкубации нейтрофилов с живыми бактериями в соотношении 1:20; супернатантами бактерий, пептидом ZP2, контролями 1 и 2 соответственно служили среда RPMI-1640 и супернатант нейтрофилов, инкубированных в среде RPMI-1640 без бактерий, их продуктов секреции и пептида. Полученные результаты округляли до 0,1 пг/мл.

Прежде чем исследовать влияние синтетического пептида ZP2 на секрецию нейтрофилами цитокинов, мы исследовали влияние *E.coli* и супернатантов суточных культур *E.coli* на секрецию/продукцию цитокинов этими клетками. Нейтрофилы секретируют в среду инкубации следующие 7 цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, GM-CSF, MIP-1 β . При фагоцитозе *E.coli* и добавлении супернатантов суточных культур *E.coli* нейтрофилы увеличивают спектр секретируемых цитокинов и в среде инкубации определяются достоверное увеличение уже 10 цитокинов: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , MIP-1 β , при этом

надо отметить тот факт, что и сами бактерии, и их метаболиты увеличивают секрецию одних и тех же цитокинов по сравнению со средой RPMI 1640. При сравнении со спонтанной продукцией цитокинов нейтрофилами выявлено (контроль 2), что и бактерии и их супернатанты суточных культур увеличивали секрецию/продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови, таких как IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, TNF- α , MIP-1 β , то есть стимулировали провоспалительный потенциал фагоцитов.

Воспаление, как процесс, развивается в результате повреждения тканей организма, в том числе и различными микроорганизмами, а в его регуляцию вовлекаются различные цитокины, вырабатываемые иммунокомпетентными клетками [25]. Как мы показали в обзоре литературы (см. главу 2), бактерии и их продукты способны изменять продукцию цитокинов и снижать их концентрацию в исследуемых субстратах.

В тоже время остается неясным вопрос – а способны ли сами бактерии секретировать в среду инкубации цитокины или цитокиноподобные вещества (ЦПВ)? Поэтому прежде чем исследовать влияние бактерий на механизмы цитокиновой продукции нейтрофилов, 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), *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=8), энтеробактерий – *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli* (n=12), выделенный из ран у больных с синдромом диабетической стопы, из влагалища у женщин с миомой матки, из пустул у новорожденных с пиодермией. Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин и отбирали надосадочную жидкость (супернатант).

Наличие в супернатантах бактерий цитокинов (ЦПВ) определяли на

приборе MAGPIX-100 (США) с использованием тест-системы Multiplex (Luminex, США) для определения 15 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MCP-1, MIP-1 β , TGF- α); контролем служил МПБ без бактерий. Опыты проводили в двух повторах; результаты измерений округляли до 0,1 пг/мл; при регистрации в супернатантах цитокинов в концентрации меньше 3 пг/мл считали, что в образце ЦПВ отсутствуют.

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*. Поэтому на их оценке мы остановимся более подробно.

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 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, INF- 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» IL-2, IL-4, GM-CSF, 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 корреспондировали с большой 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: IL-1 β , IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , MIP-1 β), *Enterococcus* spp, (4 – G-CSF, INF- γ , IL-12p70, IL-17A), *K.pneumoniae*, *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 исследованных образцах либо не обнаруживались, либо их уровень был ниже указанного порога.

Обращает на себя внимание несколько фактов: во-первых, наличие

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

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

Не исключено, что это различие связано 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, что все цитокиноподобные продукты относятся или к ростковым факторам, или к провоспалительным, обладающим выраженными плеiotропными 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) [44], выявление феномена секреции цитокиноподобных веществ, относящихся к регуляторным факторам, может открыть совершенно новое направление исследований связанных 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. Остается во многом неясным ряд вопросов, а именно, что это за вещества, на сколько они идентичны цитокинам эукариотов, каков спектр их биологической активности, в чем биологический смысл их наличия у бактерий, их происхождение (изначальное наличие, или приобретение в процессах коэволюции при персистенции в многоклеточных организмах), генетическая маркировка этих субстанций в нуклеотиде или плаزمиде бактерий и т.д.? Возможно, на часть этих вопросов смогут ответить генетические исследования штаммов продуцентов цитокиноподобных веществ и палеогенетика микроорганизмов – изучающая генетические особенности предков современных бактерий, и дальнейшие исследования в биологических аспектов выявленного феномена.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что тест-система для мультиплексного анализа Luminex (США) позволяет выявлять в супернатантах суточных бульонных культур микроорганизмов наличие цитокиноподобных веществ (ЦПВ). При этом продукция (наличие и уровень) ЦПВ исследованными грамположительными и грамотрицательными бактериями зависит от их таксономической принадлежности и характеризуется внутривидовой вариабельностью. Наиболее активными продуцентами ЦПВ являются стафилококки (*S.aureus* и *S.haemolyticus*), которые способны синтезировать 7-13 цитокинов, причем, 5 из них (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-12p70, IL-17A) в относительно высоких концентрациях (>20 пг/мл). Учитывая принадлежность указанных цитокинов к провоспалительным и ростовым факторам, нельзя исключить их причастность к развитию начальных этапов воспалительной реакции при инфицировании тканей макроорганизма цитокин-продуцирующими бактериями, в частности, путем ранней активации иммунокомпетентных клеток, что требует дальнейшего исследования данного феномена. С другой стороны, необходимо выяснить структурно-молекулярное сходство/различие

ЦПВ бактерий с цитокинами макроорганизма, определить их генетическое детерминирование, эволюционное происхождение и роль в биологии прокариотов и эукариотов, а также их участие в формировании патогенного потенциала микроорганизмов.

Золотистый стафилококк (*S.aureus*) является одним из приоритетных возбудителей многих эндогенных инфекционно-воспалительных заболеваний человека [84]. При этом у части людей наблюдается транзитное или резидентное бактерионосительство данных микроорганизмов в различных биотопах (кожа, носоглотка, кишечник, урогенитальный тракт) [6, 115]. 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 золотистого стафилококка, либо в иммунокомпromетированных органах, куда бактерии транслоцируются (мигрируют) по лимфатическим сосудам или гематогенно [12, 75]. В регуляции инфекционно-воспалительного процесса существенную роль играют цитокины, секретируемые иммунокомпетентными клетками, в том числе гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) [6, 12, 25, 75, 84, 115].

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 исследованию его биологических эффектов.

Поэтому 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 влагалища у женщин с миомой матки и содержимого пустилу 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 «STAPHYtest» («Erba Lachema s.r.o.», EuropeanUnion) [16, 42].

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

Для исследования влияния синтетического пептида ZP2 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 синтетического пептида ZP2. Получение супернатантов и определение в них ЦПВ осуществляли вышеописанными способами.

На первом этапе работы была исследована 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 пг/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 пг/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 пг/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 ($>20,0$ пг/мл): G-CSF – 58,1; GM-CSF – 29,6; IFN- γ – 166,9; IL-12(p70) – 105,9 и IL-17A – 51,4 пг/мл, тогда как уровень других ЦПВ был ниже принятой градации ($>3,0$, но $<20,0$ пг/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 пг/мл.

Таким образом, 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 варьировалась 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-10, IL-5, IL-6 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.

Полученные данные свидетельствуют о том, что музейный штамм стафилококка, так же как клинические изоляты, обладал широким диапазоном секретируемых ЦПВ.

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 (супернатант) широкий спектр ЦПВ, причем, данные микроорганизмы характеризовались внутривидовой (межштаммовой) вариабельностью по наличию и выраженности указанного признака. Поскольку в очаге воспаления наблюдается выброс иммунокомпетентными клетками

цитокинов, в том числе GM-CSF [32, 50, 62], важно было определить влияние синтетического пептида 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.

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 исследованных, 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, «сходную» 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 неоднозначный характер влияния синтетического пептида 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*.

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 IL-17A, при этом средняя степень ингибирования продукции исследованных 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 *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 6 (+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 исследованной выборки клинических изолятов *S.aureus* по их ответной реакции на присутствие в питательной среде синтетического пептида 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.

Представленные данные интересны в нескольких аспектах.

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

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 [21].

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 исследования.

В прикладном аспекте полученные данные указывают на подверженность продукции бактериями ЦПВ регуляции экзогенными факторами, в частности синтетическим пептидом ZP2, который является основным компонентом новых косметических средств – АЦЕГРАМ-спрей и АЦЕГРАМ-гель [21].

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 вышеизложенного возникает серия логичных вопросов (на которые пока трудно дать внятные ответы). Действительно ли регистрируемые тест-системой Luminex (США) в супернатантах бактерий отдельные ЦПВ

являются структурными и функциональными аналогами истинных цитокинов, синтезируемых иммунокомпетентными клетками макроорганизма? Какова генетическая детерминация (нуклеотидная, 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 эукариот? Являются ли ЦПВ бактерий эволюционно более древним приобретением, чем цитокины макроорганизма, или они «заимствованы» у последних 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 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.

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) цитокины не были выявлены.

Учитывая, что синтетический пептид ZP2 вызывал усиление дифференцировки кроветворных стволовых клеток в гранулоциты и наличие хемотаксических рецепторов к нему на гранулоцитах [21], было важно

определить, обладает ли он свойствами, характерными для основного цитокина GM-CSF, – усиливать секрецию различных цитокинов клетками, в том числе и периферической крови, и, в первую очередь, нейтрофилами. Учитывая, что зрелые нейтрофилы относятся к короткоживущим клеткам (максимальный срок жизни от нескольких дней до 14 суток), важно было разработать методику оценки секреции нейтрофилами цитокинов при короткой инкубации в питательной среде и оценить возможность исследования продукции цитокинов при кратковременной инкубации с биологически активными веществами. С этой целью исследовали уровень спонтанной и индуцированной синтетическим пептидом ZP2 продукции 17 цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β) 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 GM-CSF показывает увеличение концентрации GM-CSF в среде RPMI-1640 при инкубации с пептидом. Это, возможно, говорит о том, что тест-система в какой-то мере улавливает синтетический пептид ZP2, как гомолог самого цитокина, но скорее всего степень связывания его невелика, ввиду 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 ZP2, с одной стороны, вызывает достоверное увеличение спектра секретируемых клетками цитокинов, а с другой стороны, резко увеличивает продукцию ряда цитокинов. Так, 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 5 цитокинов- IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 β .

Таким образом, разработанная модель оценки секреции цитокинов нейтрофилами после 1 часовой инкубации показала ее несомненную эффективность. Выявлено, что в течение 1 часа нейтрофилы способны секретировать цитокины в достаточно широком спектре. Предложенная модель позволяет не только оценивать секрецию различных цитокинов нейтрофилами, но и исследовать возможные механизмы регуляции цитокиновой продукции этими клетками в условиях инкубирования с биологически активными веществами, в том числе и синтетических пептидов активных центров цитокинов. При этом выявлено, что синтетический пептид ZP2 значительно усиливает секрецию нейтрофилами различных цитокинов (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, INF- γ , IL-17A, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , MIP-1 β). Наиболее выраженное усиление секреции в ответ на воздействие пептида было выявлено для 5 цитокинов – IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 β . При этом надо отметить тот факт, что синтетический пептид ГМ-ГСФ усиливает секрецию как ростковых факторов (G-CSF, GM-CSF), так провоспалительных (INF- γ , IL-17A, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, TNF- α), противовоспалительных (IL-12p70) цитокинов и хемокинов (IL-8, MIP-1 β). Полученные данные свидетельствуют о том, что синтетический пептид ZP2, помимо иммуностимулирующего, антибактериального и репарационного действия, обладает способностью активировать регуляторные механизмы клеток периферической крови и, в частности, нейтрофилов, что расширяет возможности применения лекарственных препаратов на его основе для коррекции состояний с нарушенной функцией секреции цитокинов. В то же время способность данного препарата усиливать провоспалительную цитокинопродукцию должна учитываться в тех ситуациях, где активация данных механизмов является противопоказанием для назначения препаратов со сходным механизмом действия или там, где при развитии патологического процесса имеется выраженная секреция таких цитокинов, как IL-17A, IL-1 β ,

IL-6, IL-8, MIP-1 β .

Учитывая полученные результаты, важно было выявить, как влияют на секрецию цитокинов нейтрофилов комбинации синтетического пептида ZP2, бактерий и супернатантов суточных культур бактерий.

Как показали наши исследования, синтетический пептид ZP2 значительно усиливал продукцию/секрецию практически всех исследованных цитокинов – IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β (14 из исследованных 17) как по сравнению с контролем 1 (среда RPMI 1640), так и по сравнению с контролем 2 (супернатант нейтрофилов). При инкубации нейтрофилов в комбинациях синтетического пептида ZP2 с живыми бактериями и ZP2 с их метаболитами, были получены немного иные данные. Так, по сравнению с контролем 1 (среда инкубации) при комбинаторном воздействии бактерий и синтетического пептида ZP2 так же увеличивалась секреция/продукция практически тех же цитокинов, что и на ZP2 без бактерий IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, MIP-1 β , за исключением INF- γ , IL-13 (12 из 17), а по сравнению с контролем 2 (супернатант нейтрофилов без добавления бактерий и пептида) – IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-17A, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, MIP-1 β , за исключением IL-10, INF- γ , IL-13 (11 из 17). При оценке действия метаболитов суточных культур бактерий в комбинации с синтетическим пептидом ZP2 наблюдалась очень похожая картина, так, по сравнению с контролем 1 – IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β за исключением 1 цитокина IL-13 (13 из 17), а по сравнению с контролем 2 – IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β , за исключением 3 цитокинов – GM-CSF, IL-10, IL-13 (11 из 17). При этом обращает на себя внимание, что основной пул цитокинов остается повышенным при данных комбинациях синтетического пептида ZP2 с бактериями и их метаболитами. При сравнении влияния самого пептида (опыт 3) с комбинаций пептида с бактериями и их

метаболитами (опыт 4 и 5), выявляется несколько иная картина. Во-первых, все варианты комбинаций либо снижали, либо вообще отменяли действие пептида на цитокиновую продукцию нейтрофилов периферической крови. Так, бактерии снижали цитокиновую активированных пептидом ZP2 нейтрофилов на следующие цитокины: IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, TNF- α , INF- γ , MIP-1 β , а их метаболиты на IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β (на 11 цитокинов в том и другом случае, отличия были только в 2 цитокинах IL-6 и GM-CSF для бактерий и их метаболитах соответственно).

Для оценки степени выраженности воздействия комбинаций синтетического пептида ZP2 и бактерий и их метаболитов, мы оценили кратность воздействия их на цитокинопродукцию нейтрофилов в сравнении с действием пептида без бактериальных компонентов.

Как показали исследования, степень подавления была более выражена при комбинаторном влиянии бактерий и синтетического пептида ZP2 и колебалась в диапазоне от 0,33 до 0,76, в то время как воздействие супернатантов суточных бульонных культур и пептида было несколько менее выраженным от 0,51 до 0,93, при этом такое различие отмечалось для всех достоверно сниженных цитокинов.

Таким образом, бактерии вида *E.coli* и их метаболиты способны усиливать секрецию нейтрофилами широкого спектра провоспалительных цитокинов (11,12 из 17 исследованных цитокинов). Синтетический пептид ZP2 также стимулирует продукцию цитокинов нейтрофилами, при этом спектр и степень активации их выше, чем у бактерий и их метаболитов (14 цитокинов из 17 исследованных). При исследовании сочетанного воздействия бактерий, их метаболитов и синтетического пептида ZP 2, выявлено, что комбинированное воздействие, в целом, приводит к снижению активности пептида практически по всем провоспалительным цитокинам (11 из 17 исследованных).

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 правильного 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 взаимодействия, связанные, с одной стороны, с цитокиноподобной продукцией самих бактерий, а с другой стороны, с подавлением цитокиновой активности нейтрофилов бактериями. Действие же синтетического пептида ZP2 может частично преодолевать негативное влияние бактерий. По-видимому, при гнойном воспалении необходимо применять пептид в более высоких концентрациях и более длительное время.

ВЫВОДЫ

1. Синтетический пептид ZP2 вызывает стимуляцию преформированных цитокинов нейтрофилов (12 из 17 исследованных 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 исследовании содержания цитокинов в инфицированных биоматериалах требуется учитывать цитокиноподобную и антицитокиновую активность сопутствующих бактерий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	антиген
АТ	антитело
АФП	альфа фетопро테인
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЛ 1- n	интерлейкины 1-n
ИФА	иммуноферментный анализ
МКБ	Международная классификация болезней
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
С3а, С5а	фрагменты комплемента С3а, С5а
СА	раковый антиген
ФСБ	фосфатно-солевой буферный раствор
ФЧН	фагоцитарное число нейтрофилов
ЦТЛ	цитотоксические лимфоциты
AML	острый миелоидный лейкоз
АМ0	альвеолярный макрофаг
ВМ	костный мозг
CD	кластер дифференцировки
CISH	цитокин, индуцируемый SH2-домена
DC	дендритные клетки
FITC	флуоресцеинаизотиационат
G-CSF	гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
GM-CSF	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
GRAP	ГМ-КСФ Ra рецептор субъединицы белка ассоциированного с ГМ-КСФ
Ig A, M, G, E	иммуноглобулины А, М, G, E
IкВ	ядерного фактора каппа-света-полипептид ген усилитель В-клеток
ИкК	ИкКкиназы HLA, MHC – главный комплекс гистосовместимости
IL 1- n	интерлейкины 1-n
INF γ	интерферон γ
iNKT	Инвариантный естественный убийца Т LTK4, D4, E2 - лейкотриеныK4, D4, E2
M0	макрофаг

MAPKм	митоген-активируемой киназы-подобный белоNK – натуральные киллеры
NFKB	ядерного фактора каппа-легкой цепи усилитель активированных В-клеток
PE	фикоэритрин
PI3K	фосфатидилинозит3-киназа Th1 - Т-хелперы 1 типа
PC5	фикоэритрин C5
PKC	протеинкиназа C
STAT	сигнальные датчики и активаторы транскрипции
SLAP	SRC-подобный белок адаптер
Th2	Т-хелперы 2 типа
TLR	Толл-подобные рецепторы
TNF	фактор некроза опухоли

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ чувствительности клинических изолятов стафилококков к синтетическому пептиду активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, М.А. Добрынина, и др. // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18), № 3 (1). С. 82-85.
2. Антибактериальная активность косметического средства «Ацеграм» в отношении грамотрицательных бактерий / М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, Я.В. Тяпаева и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2017. № 4. С.1-13: [электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-4/Articles/VAG-2017-4.pdf>).
3. Антибактериальные, иммуностропные и репарационные свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, различных дефенсинов и веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45- клеток предшественников гемопоэза / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Г. Костоломова, и др. // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 6 (14), № 3(1). С.78-79.
4. Антибактериальные свойства синтетических пептидов активного центра GM-CSF / А.В.Зурочка, Ю.Г.Суховой, В.А.Зурочка, и др. // Цитокины и воспаление. 2010. Т.9, № 4. С.32-34.
5. Антицитокиновая активность микроорганизмов / О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова, И.Н. Чайникова, и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2011. № 4. С.56-61.
6. Бухарин, О.В. Биология патогенных кокков. / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвяцов, О.Л. Карташова. Москва : Медицина; Екатеринбург: УрО РАН, 2002. 282 с.
7. Влияние клеток фенотипа CD34+CD45dim и синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ на дифференцировку стволовых клеток in vitro /

В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, Е.Г. Костоломова, и др. // Российский иммунологический журнал. 2012. Т.6 (14), №. 3 (1). С. 80-81.

8. Влияние синтетического активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на продукцию цитокинов клетками НЕР2 в различные сроки их культивирования с вирусом парагриппа / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, и др. // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10 (19), № 4. С. 434-436.

9. Влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP-2 на кинетику развития популяций грамположительных кокков и энтеробактерий в культуре / А.В. Зурочка, В.А. Гриценко, В.А. Зурочка, и др. // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18), № 2 (2). С.30-35.

10. Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на формирование биопленок клиническими изолятами стафилококков / В.А. Гриценко, В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: (электр. ресурс). 2015. № 4. С.1-13.

11. Грачёва, Л.А. Цитокины в онкогематологии / Л.А. Грачёва. Москва: Алтус, 1996. 168с.

12. Гриценко, В.А. Роль персистентных свойств в патогенезе эндогенных инфекций / В.А. Гриценко, Ю.Б. Иванов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009. № 4. С. 66-71.

13. Грузина, В.Д. Коммуникативные сигналы бактерий / В.Д. Грузина // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т.48, № 10. С. 32-39.

14. Детекция нейромедиаторных аминов у микроорганизмов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е.А. Цавкелова, И.Б. Ботвинко, В.С. Кудрин, и др. // Доклады РАН. 2000. Т. 372. С. 840-842.

15. Доза-зависимые эффекты антибактериального действия синтетического пептида активного центра GM-CSF / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, В.А. Зурочка, и др. // Инфекция и иммунитет. 2012. Т.2, № 3. С. 657-660.

16. Донецкая, Э.Г. Клиническая микробиология: руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики / Э.Г. Донецкая. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 480 с.
17. Жемчугов, В.Е. Как мы делали химические вакцины / Записки о современных охотниках за микробами / В.Е. Жемчугов // Москва : Наука, 2004. 349 с.
18. Жемчугов, В.Е. Обоснование принципов создания комплексных препаратов для профилактики и лечения бактериальных и вирусных заболеваний: дис. ... д-ра мед. наук / В.Е. Жемчугов. Москва, 2005. 304 с.
19. Зурочка, А.В. Исследование влияния нового биосинтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на процессы репарации кожной раны в эксперименте / А.В.Зурочка, В.А. Зурочка // Наука в Южно-Уральском государственном медицинском университете: материалы. 65 науч.-практ. конф. Секция: Экономика, управление и право. Челябинск, 2013. С. 28-31.
20. Зурочка, В.А. Влияние клеток фенотипа CD34+CD45dim, различных дефенсинов и синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ на РБТЛ *in vitro* / В.А. Зурочка., А.В. Зурочка, Е.Г. Костоломова // Вестник уральской медицинской академической науки». 2012. № 4 (41). С. 200-201.
21. Зурочка В.А. Иммунобиологические свойства синтетических пептидов активного центра гранулоцитарно-макрофагального колоние стимулирующего фактора (ГМ-КСФ): дис. ... д-ра мед. наук / В.А.Зурочка. Екатеринбург, 2016. 206 с.
22. Изучение влияния синтетического пептидного активного центра ГМ-КСФ на регенерацию эпителия при лечении эрозии шейки матки / А.В. Зурочка, Е.Б Зуева, И.А. Гольцова, и др. // Цитокины и воспаление. 2014. Т. 13, № 1. С. 97.
23. Иммунобиологические свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и их возможный спектр применения / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Ю.Г.Суховой, и др. // Российский иммунологический журнал. 2010. Т. 4 (13), № 4. С. 386.

24. Иммунологические свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, В.А.Зурочка и др. // Цитокины и воспаление. 2010. Т.9, № 3. С. 53.

25. Иммунология: структура и функции иммунной системы / под ред. Р.М. Хаитова. Москва, 2013. 280 с.

26. Иммуотропные и биологические эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, и др. // Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. № 2/2 (35): темат. вып. по аллергологии и иммунологии. С.23-24.

27. Использование пептидного фрагмента наружной цепи ГМ-КСФ в качестве колониестимулирующей активности при клонировании КОЕ-ГМ *in vitro* / А.В. Зурочка, В.Е. Жемчугов, Б.Г. Яровинский, и др. // Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях: тез. докл. XII Рос. науч. конф. Челябинск, 1995. С. 47-48.

28. Исследование антибактериальных свойств синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, различных дефенсинов и веществ, полученных из супернатантов CD34+45- клеток предшественников гемопоэза / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка., Е.Г. Костоломова, и др. // Вестник уральской медицинской академической науки. 2012. № 2 (39). С. 12-13.

29. Исследование влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) в комбинированной терапии инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, О.И. Забков, и др. // Российский иммунологический журнал. 2018. Т. 12 (21), № 4. С. 670-673. DOI: 10.31857/S102872210002633-1.

30. Исследование различной биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и их комбинаций с другими биологически активными веществами / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка,

М.А. Добрынина, и др. // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, спец. вып. С. 266.

31. Исследования антибактериальных свойств синтетического пептида из активного центра ГМ-КСФ / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, и др. // Урогенитальные инфекции и репродуктивное здоровье; клиничко-лабораторная диагностика и терапия: материалы 3-й Всерос. междисциплинар. науч.-практ. конф. Санкт-Петербург, 2010. С. 51-52.

32. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. Санкт-Петербург : Фолиант, 2008. 552 с.

33. Костюшко, А.В. Роль грамотрицательных бактерий в цитокиновом дисбалансе при пневмонии / А.В. Костюшко, Н.М. Кондрашова // Тихоокеанский медицинский журнал. 2011. № 3 (45). С. 36-38.

34. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. Москва: Высш. шк., 1990. 352 с.

35. Мальцев, С.В. Что такое биоплёнка? / С.В. Мальцев, Г.Ш. Мансурова // Практическая медицина. 2011. № 5 (53). С. 7-10.

36. Медик, В.А. Статистика в медицине и биологии. / В.А. Медик, М.С. Токмачев, Б.Б. Фишман // Теоретическая статистика. Москва, 2000. Т. 1. 454 с.

37. Механизмы антибактериального действия пептидов активного центра ГМ-КСФ в комбинации с веществами, полученными из супернатантов CD34+CD45- клеток предшественников гемопоэза / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Г. Костоломова, и др. // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 1-2. С. 270.

38. Молекулярные механизмы взаимодействия между организмом хозяина и патогенными энтеробактериями / М.М. Туйгунов, З.Г. Габидуллин, А.В. Зурочка, и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2003. № 4. С. 23-27.

39. Морфологические и гематологические критерии эффективности лечения экспериментального пиелонефрита комплексом природных цитокинов и антибактериальных пептидов / В.А. Черешнев, П.В. Косарева, Е.И. Самоделкин и др. // Перм. мед.журн. 2008. Т. 25, № 2. С.5-13.

40. Некоторые биологические эффекты иммуномодуляторов естественного и синтетического происхождения *in vitro* как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями / В.А. Гриценко, Д.Л. Аминин, А.В. Зурочка, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2012. 3: 1-17 (URL: <http://elmag.uran.ru/magazine/Numbers/2012-3%20/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf>).

41. Новые подходы к изучению спектра биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, и др. // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 3. С.690-693.

42. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ МЗ СССР от 22.04.1985 г. № 535. Москва, 1985. 120 с.

43. Образование «некультивируемых» клеток *Mycobacterium tuberculosis* и их оживление / М.О. Шлеева, Г.В. Мукамолова, М.В. Телков, и др. // Микробиология. 2003. № 72. С. 76-83.

44. Олескин, А.В. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов / А.В. Олескин, И.В. Ботвинко // Микробиология. 2000. № 69 (3). С. 309-327.

45. Олескин, А.В. Нейрохимия, симбиотическая микрофлора и питание (биополитический подход) / А.В. Олескин // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2009. № 1. С.8-16.

46. Особенности влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на рост грамположительных кокков *in vitro* / В.А. Зурочка,

М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: [электр. ресурс]. 2015. № 1. С.1-10.

47. Оценка влияния различных комбинаций синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и биологически-активных веществ (дефенсинов, лизоцима, интерцида и супернатантов клеток CD34+) на антибактериальные, иммуностропные и репарационные свойства / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, М.А. Добрынина, и др. // Российский иммунологический журнал. 2015 Т. 9 (18), № 2 (1). С.239-240.

48. Оценка влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – ZP2 на рост и биопленкообразование клинических изолятов энтеробактерий *in vitro* / М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, Я.В. Тяпаева, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2018. № 4. 20 с. [электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-4/Articles/MAD-2018-4.pdf>). (DOI: 10.24411/2304-9081-2018-14011).

49. Плейотропные эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, В.А. Зурочка, и др. // Вестник уральской медицинской академической науки. 2010. № 2/1 (29): темат. вып. по аллергологии и иммунологии. С. 35.

50. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: руководство для врачей / В.А. Козлов, А.Г. Борисов, С.В. Смирнова, и др. Новосибирск: Наука, 2009. 274 с.

51. Романова, Ю.М. Цитокины – возможные активаторы роста патогенных бактерий / Ю.М. Романова, А.Л Гинцбург // Вести РАМН. 2000. № 1. С. 13-17.

52. Симбирцев, А.С. Достижения и перспективы использования рекомбинантных цитокинов в клинической практике / А.С. Симбирцев // Медицинский академический журнал. 2013. Т. 13, № 1. С. 7-22.

53. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека / А.С. Симбирцев. Санкт-Петербург: Фолиант, 2018. 512 с.

54. Синтетический полипептид, способ получения и средство для культивирования на его основе / В.Е. Жемчугов, В.А. Майоров, А.В. Зурочка и др. // Патент 2061699 РФ, приоритет от 16.11.1994. Опубликовано 10.06.1996. Бюл. № 16. 12 с.

55. Систематизация подходов к изучению спектра биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, и др. // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 2 (1). С.63-65.

56. Сравнительная характеристика антибактериальных свойств пептидов активного центра ГМ-КСФ и веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45- клеток предшественников гемопоэза / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Г. Костоломова, и др. // Гигиена и санитария. 2012. № 3. С.71-72.

57. Сравнительные эффекты клеток фенотипа CD34+CD45dim и синтетических пептидов активного центра GM-CSF / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, Е.Г. Костоломова, и др. // Цитокины и воспаление. 2012. Т.11. № 4. С. 21-25.

58. Сравнительный анализ влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора-ZP2 на рост музейных культур бактерий родов *Staphylococcus* и *Escherichia in vitro* / М.А. Добрынина, В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: [электр. ресурс]. 2015. №2. С.1-10.

59. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» / С.В. Хайдуков, Л.А. Байдун, А.В., Зурочка, и др. // Российский иммунологический журнал. 2014. Т.8 (17), № 4. С.974-992

60. Стимулятор роста костно-мозговых клеток человека / В.Е. Жемчугов, А.Г. Румянцев, Е.Б. Владимирская, и др. // Патент 2136308 РФ. Приоритет от 16.11.1994. Опубликовано 10.09.99. Бюл. № 25. 10 с.
61. Уголев А.М. Естественные технологии биологических систем / А.М. Уголев. Ленинград: Наука. 1987. С. 143.
62. Хаитов Р.М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин. Москва. 2009. 352 с.
63. Характеристика аницитокиновой активности энтерококков / М.В. Сычева, Т.М. Пашкова, О.Л. Карташова, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: [электр. ресурс]. 2015. № 3. С.1-6.
64. Цитокиновая и антицитокиновая активность *Staphylococcus aureus*: метод. особенности / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, и др. // Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11 (20), № 4. С. 707-709.
65. Черешнев, В.А. Иммунная система и кроветворение / В.А. Черешнев, Б.Г. Юшков // Наука в России. 2005. № 1. С. 20-26.
66. Черешнев, В.А. Иммунология воспаления: Роль цитокинов / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Медицинская иммунология. 2001. Т. 3, № 3. С. 361-368.
67. Ярилин А.А. Иммунология / А.А Ярилин. Москва, 2010. 752 с.
68. A bacterial cytokine/ G. Mukamolova, A. Kapreilyants, D Young, et al. // Proc Nat. AcadSci. USA. 1998. № 95. P. 8916-8921.
69. A recombinant human G-CSF/GM-CSF fusion protein from E. coli showing colony stimulating activity on human bone marrow cells / A.Y. Lee, H.K. Chung, E.K. Bae, et al. // Biotechnol Lett. 2003. V. 25(3). P. 205-211.
70. Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by TNF, GM-CSF, and G-CSF: the role of MAP kinases / H. Kutsuna, K. Suzuki, N. Kamata, et al. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2004. V. 286 (1). P. 55-64.

71. Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid / N.A. Fanger, C. Liu, P.M. Guyre, et al. // *Blood*. 1997. № 89. P.4128–4135.
72. Armitage J.O. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / J.O. Armitage // *Blood*. 1998. № 92. P.4491–4508.
73. Bradley, T.R. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro* / T.R. Bradley, D. Metcalf // *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1966. № 44. P.287–299.
74. Burgess, A.W. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium / A.W. Burgess, J. Camakaris, D. Metcalf // *Journal of Biological Chemistry*. 1977. № 252. P.1998–2003.
75. Can Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Silently Travel From the Gut to the Wound and Cause Postoperative Infection? Modeling the "Trojan Horse Hypothesis" / M.A. Krezalek, S. Hyoju, A. Zaborin, et al. // *Ann Surg*. 2017. Feb 9. doi: 10.1097/SLA.0000000000002173.
76. CISH is induced during DC development and regulates DC-mediated CTL activation / M.A. Miah, C.H. Yoon, J Kim, et al. // *Eur. J. Immunol*. 2012. № 42. P.58–68.
77. Correction of granulocytopenia in Felty's syndrome by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Simultaneous induction of interleukin-6 release and flare-up of the arthritis / B.P. Hazenberg, M.A. Van Leeuwen, M.H. Van Rijswijk, et al. // *Blood*. 1989. № 74. P.2769–2770.
78. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the ternary human GM-CSF receptor complex / G. Hansen, T.R. Hercus, Y. Xu, et al. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct Biol. Cryst. Commun*. 2008. № 64. P. 711–714.
79. Dendritic cells generated in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN- α are potent inducers of HIV-specific CD8 T- cells / C. Carbonneil, A. Aouba, M. Burgard, et al. // *AIDS*. 2003. V.17 (12). P. 1731-1740.

80. Department Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared / D. Vogela, J. E. Glima, A. Stavenuitera, et al. // J. Immunobiology 2014. № 219. P. 695–703.

81. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes / G.W. Takahashi, D.F. Andrews 3rd, M.B. Lilly, et al. // Blood. 1993. № 81. P. 357–364.

82. Effects of macrophage-colony stimulating factor on human monocytes: induction of expression of urokinase-type plasminogen activator, but not of secreted prostaglandin E₂, interleukin-6, interleukin-1, or tumour necrosis factor-alpha / J.A. Hamilton, G.A. Whitty, H. Stanton, et al. // J. Leukoc. Biol. 1993. № 53. P. 707–714.

83. Efficacy and safety of mavrimumab in subjects with rheumatoid arthritis / G.R. Burmester, M.E. Weinblatt, I.B. McInnes, et al. // Ann. Rheum. Dis. 2013. № 72. P. 1445–1452.

84. Evolving Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Bacteremia / Y. Rhee, A. Aroutcheva, B. Hota, et al. // Infect Control Hosp Epidemiol. 2015. V. 36 (12). P. 1417–1422.

85. Exacerbation of acute inflammatory arthritis by the colony-stimulating factors CSF-1 and granulocyte macrophage (GM)-CSF: evidence of macrophage infiltration and local proliferation / R.J. Bischof, D. Zafirooulos, J.A. Hamilton, et al. // Clin Exp Immunol. 2000. № 119. P. 361–367.

86. Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells / M. Sawada, Y. Itoh, A. Suzumura, et al. // Neurosci. Lett. 1993. № 160. P. 131–134.

87. Expression of HLADR (major histocompatibility complex class II) on neutrophils from patients treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for mobilization of stem cells / S.P. Mudzinski, T.P. Christian, T.L. Guo, et al. // Blood. 1995. № 86. P. 2452–2453.

88. Factor beta induces granulocyte macrophage colony stimulating factor independent differentiation of human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells into

dendritic cells with features of Langerhans cells Z.U. / Mollah, S. Aiba, S. Nakagawa, et al. // *J. Invest Dermatol.* 2003. V. 121 (6). P. 401-1397.

89. Flare-up of rheumatoid arthritis during GM-CSF treatment after chemotherapy / E.G. De Vries, P.H. Willemsse, B. Biesma, et al. // *Lancet.* 1991. № 338. P.517–518.

90. Fuqua, W.C. Quorum sensing in bacteria: the Lux R-Lux I family of cell density-responsive transcriptional regulators / W.C. Fuqua, S. Winans, E. Greenberg // *J Bacteriol.* 1994. № 176. P. 269-275.

91. Gene transfer for cytokinefunctional studies in the lung: the multifunctional role of GM-CSF in pulmonary inflammation / Z. Xing, T. Braciak, Y. Ohkawara, et al. // *J. Leukoc. Biol.* 1996. № 59. P.481–488.

92. GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases / A. Van Nieuwenhuijze, M. Koenders, D. Roeleveld, et al. // *Molecular Immunology.* 2013. № 56. P. 675– 682.

93. GM-CSF is an essential regulator of T cell activation competence in uterine dendritic cells during early pregnancy in mice / r L.M. Moldenhau, S.N. Keenihan, J.D. Hayball, et al. // *J. Immunol.* 2010. № 185. P.7085–7096.

94. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-based melanoma cell vaccines immunize syngeneic and allogeneic recipients via host dendritic cells / A. Schneeberger, P. Luhrs, R. Kutil, et al. // *J. Immunol.* 2003. V. 171 (10). P. 5180-5187.

95. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor exacerbates collagen induced arthritis in mice / I.K. Campbell, A. Bendele, D.A. Smith, et al. // *Ann. Rheum. Dis.* 1997. № 56. P.364–368.

96. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway / J. Gomez-Cambronero, J. Horn, C.C. Paul, et al. // *J. Immunol.* 2003. V. 171 (12). P. 846-855.

97. Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor / A.F. Cruz, M. A. Santelises, O. R. Espinosa, et al. // *Med. Oncol.* 2014. № 31. P.774-788.
98. Gray, K.M. Intercellular communication and group behavior in bacteria / K.M. Gray // *Trends Microbiol.* 1997. V. 5, № 5. P.184-188.
99. Greenberg, E. Quorum-sensing by bacteria / E. Greenberg, S. Winans, C. Fuqua // *Ann Rev Microbiol.* 1996. 50. P. 727-751.
100. Groot, R.P. Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family / R.P. Groot, P.J. Coffey, L. Koenderman // *Cell Signal.* 1998. № 10. P.528–619.
101. Hamilton, J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity / J.A. Hamilton // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. № 8. P.533–544.
102. Hamilton, J.A. GM-CSF biology / J.A. Hamilton, G.P. Anderson // *Growth Factors.* 2004. № 22. P.225–231.
103. Herold, S. Acute lung injury. How macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair / S. Herold, K. Mayer, J. Lohmeyer // *Front. Immunol.* 2001. № 2. P.6.
104. Identification of GM-CSF in Paneth cells using single-cell RT-PCR / H. Fukuzawa, M. Sawada, T. Kayahara, et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. № 312. P. 897–902.
105. Immunomodulation of peritoneal macrophages by granulocyte granulocytemacrophage colony-stimulating factor in humans / R. Selgas, M. Fernánde de Castro, C. Jimé'nez, et al. // *Kidney Int.* 1996. № 50. P. 2070–2078.
106. Induction of inhibitory central nervous system-derived and stimulatory blood-derived dendritic cells suggests a dual role for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in central nervous system inflammation / L. Hesske, C. Vincenzetti, M. Heikenwalder, et al. // *Brain.* 2010. V.133 (Pt 6). P. 1637–1654.

107. Intercellular signalling and the multiplication of prokaryotes: bacterial cytokines / A.S. Kaprelyants, G.V. Mukamolova, S.S. Kormer, et al. // Symp Soc Gen Microbiol. 1999. № 57. P. 33-69.
108. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses / J.R. Korzenik, B.K. Dieckgraefe, J.F. Valentine, et al. // Nat. Immunol. 2011. № 12. P.231–238.
109. Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells / F. Lee, T. Yokota, T. Otsuka, et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1985. № 82. P. 4360–4364.
110. Kaprelyants, A.S. Do bacteria need to communicate with each other for growth? / A.S. Kaprelyants, D.B. Kell // Trends Microbiol. 1996. V.4. P.237-241.
111. Macrophage tumor necrosis factor- α induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair / L. Cakarova, L.M. Marsh, J. Wilhelm, et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2009. № 180. P.521–532.
112. Manipulation of dendritic cells for host defence against intracellular infections / S. McCormick, M. Santosuosso, X.Z. Zhang, et al. // Biochem. Soc. Trans. 2006. № 34. P.283–286.
113. Metcalf, D. Hematopoietic cytokines / D. Metcalf // Blood. 2008. № 111. P. 485–491.
114. Molecular assembly of the ternary granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor complex / B.J. McClure, T.R. Hercus, B.A. Cambareri, et al. // Blood. 2003. № 101. P.1308–1315.
115. Nasopharyngeal and Oropharyngeal Colonization by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* and Prognostic Markers in Children with Sickle Cell Disease from the Northeast of Brazil / L.C. Rocha, M.O.S. Carvalho, V.M.L. Nascimento, et al. // Front.Microbiol. 2017. V.8. P 217. doi: 10.3389/fmicb.2017.00217.

116. Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / T.M. Hornell, G.W. Beresford, A. Bushey, et al. // *J. Immunol.* 2003. V. 171 (5). P. 2374-2383.
117. Sheridan, J.W. A low molecular weight factor in lungconditionedmedium stimulating granulocyte and monocyte colony formation in vitro / J.W. Sheridan, D. Metcalf // *J. Cell Physiol.* 1973. № 81. P.11–23.
118. Structure of the complete extracellular domain of the common subunit of the human GMCSF, IL-3, and IL-5 receptors reveals a novel dimer configuration / P.D. Carr, S.E. Gustin, A.P. Church, et al. // *Cell.* 2001. № 104. P.291–300.
119. Synergistic activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma. Increased TNF-alpha but not IL-1 activity / P.H. Hart, G.A. Whitty, D.S. Piccoli et al. // *J. Immunol.* 1988. № 141. P.1516–1521.
120. The cytoplasmic domain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GMCSF) receptor subunit is essential for both GM-CSF-mediated growth and differentiation / T. Matsuguchi Y. Zhao, M. Lilly, et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. № 272. P. 17450–17459.
121. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation / G. Hansen, T.R. Hercus, B.J. McClure, et al. // *Cell.* 2008. № 134. P.496–507.
122. Wong, L. The indentification of Fc and C₃ receptors on human neutrophils / L. Wong, R.D. Wilson // *J. Immunol. Meth.* 1975. Vol. 7. P. 69-76.