

УДК 616.24-002:579.861.2

Л.О. Фомина¹, В.А. Гриценко², А.И. Файзуллина¹**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОКИНОВ
В СУПЕРНАТАНТАХ НЕЙТРОФИЛОВ, СТИМУЛИРОВАННЫХ
СУПЕРНАТАНТАМИ *S. AUREUS*,
ИМЕЮЩИМИ И НЕ ИМЕЮЩИМИ ГЕН *SPA***

- ¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;
- ² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук,
г. Оренбург, Российская Федерация

Резюме. В работе представлены результаты определения цитокинов методом мультиплексного анализа в супернатантах нейтрофилов крови доноров, стимулированных супернатантами *Staphylococcus aureus*, в зависимости от наличия или отсутствия у бактерий гена стафилококкового белка А (*spa*). Индикация цитокинов осуществлялась методом мультиплексного анализа с помощью наборов компании БиоРад (США) для определения 17 цитокинов человека (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A) после 1 часа инкубации супернатантов стафилококка с нейтрофилами.

Показано, что *S. aureus*, у которых имелся ген стафилококкового белка А (*spa*), значительно стимулировали секрецию нейтрофилами G-CSF (ростовой фактор), IL-12p70, IL-17A, IFN- γ , IL-13, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, TNF- α (провоспалительные цитокины), MCP-1 (хемокин), но при этом существенно снижали секрецию IL-10 (противовоспалительный цитокин), IL-8, MIP-1 β (хемокины). Практически идентично действовали и супернатанты *S. aureus*, у которых не было *SPA*, IFN- γ под их действием повышался менее значительно, а IL-1 β , наоборот, более значительно по сравнению с супернатантами *S. aureus*, имеющими ген стафилококкового белка А. Установлено, что супернатанты всех изученных клинических изолятов *S. aureus*, обладающих выраженной способностью продуцировать цитокиноподобные вещества, вне зависимости от наличия/отсутствия у них гена *spa* влияют на способность нейтрофилов секретировать цитокины.

Таким образом, наличие у *S. aureus* цитокиноподобной активности отражается на ответной реакции нейтрофилов секретировать пул цитокинов, в частности, провоспалительных интерлейкинов, некоторых хемокинов и ростовых факторов, при контакте фагоцитарных клеток с супернатантами стафилококков. Это указывает на то, что взаимодействие нейтрофилов с внеклеточными цитокиноподобными продуктами *S. aureus* может существенно модулировать воспалительный процесс.

Ключевые слова: нейтрофилы, цитокины, *Staphylococcus aureus*, ген *SPA*, цитокиноподобные вещества, мультиплексный анализ

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Фомина Людмила Олеговна

fomina454@yandex.ru

Дата поступления 23.05.2022 г.

Образец цитирования:

Фомина Л.О., Гриценко В.А., Файзуллина А.И. Сравнительный анализ определения цитокинов в супернатантах нейтрофилов, стимулированных супернатантами *S. aureus*, имеющими и не имеющими ген *SPA*. Вестник уральской медицинской академической науки. 2022, Том 19, №3, с. 273–

Введение

Известно, что нейтрофилы являются важными эффекторными клетками врожденного иммунитета и обеспечивают необходимую первичную защиту от бактериальных патогенов, в том числе *Staphylococcus aureus* [18, 20], который до сих пор является одним из основных возбудителей инфекционно-воспалительной патологии во всем мире [17, 20]. Нейтрофилы одними из первых рекрутируются в инфицированные очаги, где запускают механизмы уничтожения микробных агентов как за счет хемотаксических факторов, продуцируемых самими бактериями, так и за счет медиаторов воспаления, образующихся в месте инфекции. Попав в очаг воспаления, нейтрофилы осуществляют фагоцитоз и уничтожение бактерий посредством образования активных форм кислорода и высвобождения из лизосомальных гранул литических ферментов [18, 20]. В свою очередь бактериальные патогены выработали стратегии противодействия защитным механизмам макроорганизма. В частности, золотистые стафилококки, обладая широким арсеналом факторов патогенности, способны секретировать вещества, которые воздействуют на нейтрофилы и ингибируют их антибактериальные функции, синтезировать протеазы, разрушающие компоненты системы комплемента, а также инициировать в клетках макроорганизма синтез и секрецию биологически активных молекул и медиаторов, в том числе и провоспалительных цитокинов [17, 19, 20]. В то же время нейтрофилы сами являются клетками, секретирующими цитокины, и относятся к активным участникам регуляции воспаления [9, 10].

Ранее в наших исследованиях была продемонстрирована способность продукции стафилококками цитокиноподобных веществ (ЦПВ), выраженность которой зависела от видовой и штаммовой принадлежности бактерий [5–7]. При этом ЦПВ в супернатантах культур стафилококков выявлялись методами иммуоферментного и мультиплексного анализа с использованием разных официальных наборов для определения человеческих и мышиных цитокинов [13, 14].

Сравнительно недавно было установлено непосредственное взаимодействие такого фактора вирулентности *S. aureus*, как стафилококковый белок А, с рецептором фактора некроза опухоли альфа в эпителии дыхательных путей, при котором наблюдалась идентичность биологических эффектов данного бактериального белка и указанного цитокина [15]. Следует отметить, что в ряде исследований показана корреляция результатов такого рецептор-зависимого взаимодействия с наличием у *S. aureus* генов стафилококкового белка А (*spa*) [8, 12, 16]. В то же время имеются данные по стафилококкам, которые не имели этого гена, но демонстрировали выраженную способность продуцировать ЦПВ в культуральную среду (супернатанты) [4, 14]. При этом охарактеризовано влияние золотистых стафилококков и их супернатантов на индуцированную продукцию цитокинов нейтрофилами [2, 4]. Однако зависимость такой реакции нейтрофилов на супернатанты стафилококков от наличия/отсутствия у них гена *spa* ранее не анализировалась. Кроме того, не изучено влияние супернатантов *S. aureus* с выраженной продукцией ЦПВ, но оппозитных по *spa*-статусу, на цитокиносекрецию нейтрофилов.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния супернатантов клинических штаммов *S. aureus*, оппозитных по гену *spa*, на продукцию цитокинов нейтрофилами.

Материалы и методы

Исследования проведены на лабораторных базах Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург) и Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (ИКВС УрО РАН) Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН (г. Оренбург).

В экспериментах использовали 20 супернатантов клинических изолятов *S. aureus*, из них 10 — несущих ген *spa* и 10 — не имеющих гена *spa*, с выраженной способностью секретировать ЦПВ. Штаммы золотистого стафилококка, хранящиеся в коллекции ИКВС УрО РАН, ранее были выделены от больных с разной патологией из разных биотопов (раны у пациентов с синдромом диабетической стопы, отделяемое влагалища у женщин с миомой матки, пустулы у новорожденных с пиодермией). Супернатанты стафилококков получали путем выращивания бактерий на мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 часов, центрифугирования суточных бульонных культур при 3000 об/

мин в течение 30 минут и отбора надосадочной жидкости. Супернатанты штаммов *S. aureus* разделяли на две группы в зависимости от *spa*-статуса, установленного нами ранее с помощью ПЦР [1].

Нейтрофилы доноров, выделенные на двойном градиенте фиколл-верографина по стандартной методике, доводили после промывки до концентрации 5×10^6 клеток/мл и инкубировали в среде RPNI-1640 в течение 1 часа при 37°C в термостате с супернатантами бактерий (опыт) или без них (контроль) в соотношении: 0,9 мл взвеси клеток и 0,1 мл супернатантов бактерий.

Влияние супернатантов стафилококков на секрецию нейтрофилами цитокинов определяли на приборе Macrix-100 (USA), с использованием иммунофлюоресцентных мультиплексных наборов компании БиоРад (США) для детекции 17 цитокинов человека (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, TNF- α , MCP-1, MIP-1beta) после 1 часа совместной инкубации фагоцитов с бактериальными супернатантами. Контролем выступил супернатант неактивированных нейтрофилов. Полученные результаты округляли до 0,1 пкг/мл.

Систематизация и анализ экспериментальных данных, а также визуализация полученных результатов осуществлялись в программе Microsoft Office Excel 2013. Полученные данные описывались при помощи среднеарифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (m). Достоверность отличий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни; различия считали достоверными при $p < 0,05$ для независимых совокупностей, используя программу IBM SPSS Statistics версия 23.0 [11].

Результаты и обсуждение

Как показали наши исследования при соинкубации нейтрофилов и супернатантов *S. aureus* наблюдалось изменение способности фагоцитов секретировать цитокины, которая существенно не зависела от наличия у использованных в опытах штаммов золотистого стафилококка гена *spa*.

Как видно из Таблицы 1, супернатанты *S. aureus*, у которых имелся ген стафилококкового белка A, значительно стимулировали секрецию нейтрофилами G-CSF (фактор роста), IL-12p70, IL-17A, IFN- γ , IL-13, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-7, TNF- α (провоспалительные цитокины), MCP-1 (хемокин), но подавляли секрецию IL-10 (противовоспалительный цитокин), IL-8, MIP-1beta (хемокины). Супернатанты штаммов *S. aureus* без гена *spa* оказывали на нейтрофилы практически идентичное действие: они существенно усиливали секрецию фагоцитами таких цитокинов, как G-CSF (ростовой фактор), IL-12p70, IL-17A, IFN- γ , IL-13, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-7, TNF- α (провоспалительные цитокины), MCP-1 (хемокин), но ингибировали у них продукцию IL-10 (противовоспалительный цитокин) и IL-8, MIP-1beta (хемокины). Следует отметить, что при воздействии на нейтрофилы этих супернатантов уровень IFN- γ повышался менее значительно, а IL-1b, наоборот, более существенно в сравнении с супернатантами изолятов *S. aureus*, несущих ген стафилококкового белка A.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствовали, что супернатанты бульонных культур *S. aureus* при соинкубации с нейтрофилами модифицируют у них способность секретировать цитокины. Причем характер (сила и направленность) такого влияния бактериальных супернатантов на цитокинопродукцию нейтрофилов не зависит от генетического *spa*-статуса изученных штаммов *S. aureus*, поскольку ответная реакция нейтрофилов на контакт с супернатантами бактерий была практически идентична вне зависимости от наличия или отсутствия у *S. aureus* гена стафилококкового белка A.

Полученные данные представляют большой интерес, учитывая, что на эффективность фагоцитоза оказывает влияние локальное микроокружение, в том числе цитокины, которые регулируют количественный и качественный состав лейкоцитов в очаге воспаления и реализуют прайминг фагоцитов [20]. Из результатов наших исследований следует, что нейтрофилы могут откликаться изменением своей цитокинопродукции не только на наличие *S. aureus* в очаге воспаления [9], но и на присутствие в нем внеклеточных соединений, синтезируемых указанными бактериями, в частности цитокиноподобных веществ. В этой связи требуют дальнейшего изучения особенности взаимодействия фагоцитов (нейтрофилы, макрофаги) с *S. aureus* и бактериями другой видовой принадлежности, а также внеклеточными продуктами их синтеза в условиях как *in vitro*, так и *in vivo*, в том числе при изолированном и сочетанном соинкубировании микроорганизмов и их внеклеточных продуктов с иммунокомпетентными клетками, выполняющими фагоцитарную функцию. С другой стороны, при исследовании материала из очага воспаления на наличие в нем цитокинов и их уро-

вень следует учитывать возможный вклад цитокиноподобных веществ бактерий (синтезируемых, например, *S. aureus* и др. [5-9]) в «цитокиновый репертуар» (спектр цитокинов) и «цитокиновый баланс» (уровни отдельных цитокинов), которые характерны для инфицированной и пораженной ткани.

Таблица 1

Сравнительная характеристика содержания цитокинов в супернатантах нейтрофилов после их 1-часовой инкубации с супернатантами *S. aureus*, оппозитных по гену *spa*.

Table 1

Comparative characteristics of the cytokine content in the neutrophil supernatant after 1-hour incubation with *S. aureus* supernatants opposite in the *spa* gene.

Цитокины / Cytokines	Контроль (супернатант неактивированных нейтрофилов) пкг/мл (n=10), M±m / Control (supernatant of inactive neutrophils) pкг/ml (n=10), M±m	Супернатант нейтрофилов после инкубации со <i>S. aureus</i> (<i>spa</i> +) пкг/мл (n=10), M±m / Neutrophil supernatant after incubation with <i>S. aureus</i> (<i>spa</i> +) pкг/ml (n=10), M±m	Супернатант нейтрофилов после инкубации со <i>S. aureus</i> (<i>spa</i> -) пкг/мл (n=10), M±m / Neutrophil supernatant after incubation with <i>S. aureus</i> (<i>spa</i> -) pкг/ml (n=10), M±m
G-CSF	19,3±1,6	25,0±0,6*	27,5±1,3**
GM-CSF	250,3±5,6	249,8±5,5	255,5±1,6
IL-10	35,4±3,4	17,0±0,7*	16,5±0,4*
IL-12p70	23,5±1,6	41,5±0,8*	39,5±0,6**
IFN-gamma	13,5±1,5	42,0±1,8*	32,0±0,2**,***
IL-13	11,4±1,3	18,5±1,3*	15,0±0,2*
IL-17A	62,5±5,6	134,0±8,9*	132,3±4,5**
IL-1b	42,3±3,4	157,5±3,7*	404,8±69,5**,***
IL-2	38,4±4,5	41,5±0,6	43,0±1,0
IL-4	23,5±2,4	36,5±0,60*	32,0±0,2*
IL-5	9,5±1,3	11,3±0,4	10,5±72,8
IL-6	122,5±9,7	793,0±72,8*	820,5±49,0**
IL-7	12,5±1,6	17,5±0,6*	15,5±0,24*
TNF-alfa	16,2±1,9	1596,0±84,6*	1918,5±176,7**
IL-8	320,9±14,5	16,0±0,7*	14,5±0,2**
MCP-1	12,4±1,9	5211,8±302,3*	4779,3±34,5**
MIP-1beta	1492,8±72,7	25,0±1,21*	26,0±0,96**

Примечание: * — достоверность отличий группы штаммов *spa*+ от Контроля, ** — достоверность отличий группы штаммов *spa*- от Контроля, *** — достоверность отличий между группами штаммов *spa*+ и *spa*- (p<0,05).

Note: * — the reliability of the differences group of strains *spa*+ from the Control, ** — the reliability of the differences group of strains *spa*- from the Control, *** — the reliability of the differences between groups of strains *spa*+ and *spa*- (p<0.05).

Подводя общий итог, следует подчеркнуть, что супернатанты всех изученных клинических штаммов *S. aureus*, обладающих выраженной цитокиноподобной активностью, независимо от наличия или отсутствия у них гена *spa* при контакте с нейтрофилами изменяли (модифицировали) их способность секретировать цитокины, стимулируя секрецию фагоцитами G-CSF (ростовой фактор), IL-12p70, IL-17A, IFN-gamma, IL-13, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-7, TNF-alfa (провоспалительные цитокины), MCP-1 (хемокин), но ингибируя секрецию IL-10 (противовоспалительный цитокин), IL-8, MIP-1beta (хемокины). Нельзя исключить, что наличие у данных изолятов *S. aureus* выраженной способности к продукции цитокиноподобных веществ, выявляемых в супернатантах их бульонных культур [6, 7, 14], может отражаться на общем пуле цитокинов в инкубационной среде, который формируется после взаимодействия нейтрофилов с внеклеточными продуктами жизнедеятельно-

сти этих бактерий и обусловлен, с одной стороны, цитокинами, выделяемыми стимулированными фагоцитами, с другой — их бактериальными цитокиноподобными «гомологами». Обращает на себя внимание тот факт, что под действием супернатантов этих бактерий десятикратно усиливается секреция нейтрофилами таких цитокинов, как IL-1b, IL-6, TNF-alfa, являющихся ключевыми иммуномедиаторами цитокинового шторма при сепсисе [3]. Обнаружение таких цитокинпродуцирующих штаммов *S. aureus* у больных с инфекционно-воспалительной патологией, возможно, повышает риск развития у них сепсиса, для профилактики которого необходимо проводить своевременную персонафицирующую антимикробную терапию с целью элиминации указанных возбудителей.

Выводы

1. Супернатанты клинических штаммов *S. aureus* вне зависимости от наличия у них гена стафилококкового белка А (*spa*) значительно стимулировали секрецию нейтрофилами G-CSF (ростовой фактор), IL-12p70, IL-17A, IFN-gamma, IL-13, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-7, TNF-alfa (провоспалительные цитокины), MCP-1 (хемокин), но ингибировали у них продукцию IL-10 (противовоспалительный) цитокин, IL-8, MIP-1beta (хемокины).

2. Отсутствие у изолятов *S. aureus* гена *spa* сопровождалось тем, что их супернатанты при контакте с нейтрофилами обеспечивали менее выраженную секрецию фагоцитами IFN-gamma, но более существенную продукцию ими IL-1b по сравнению с супернатантами *S. aureus*, несущими ген стафилококкового белка А.

3. Штаммы *S. aureus*, оппозиционные по генетическому *spa*-статусу, но обладающие цитокиноподобной активностью, очевидно, могут повышать вероятность формирования цитокинового шторма при развитии сепсиса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гриценко В.А., Мавзютов А.Р., Пашкова Т.М., Карташова О.Л., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П. Генетический профиль *Staphylococcus aureus*, выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2018. 4: 56-62. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-4-56-62

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

3. Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Лазарева М.А. Цитокиновый ответ и другие отличительные особенности критических фаз системного воспаления при сепсисе. Медицинская иммунология. 2014;16(2):173-182. DOI: 10.15789/1563-0625-2014-2-173-182

4. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Дукардт В.В., Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Черешнев В.А. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2016. Т. 2, 30с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>).

5. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Бактерии как продуценты цитокиноподобных веществ. Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), 3, С. 374-376.

6. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Дукардт В.В., Гриценко В.А. Цитокиновая и антицитокиновая активность стафилококков. Методические особенности. Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), 4, С. 707-709. eLIBRARY ID: 34982752.

7. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Стафилококки как продуценты цитокиноподобных веществ. Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), 2, С. 134-136. eLIBRARY ID: 29826626

8. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Фомина Л.О., Файзуллина А.И., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* в зависимости от наличия генетиче-

ских детерминант стафилококкового белка А. Российский иммунологический журнал, 2019. Т.13 (22), №.3, С1162-1167. DOI: 10.31857/S102872210007247-6.

9. Зурочка А.В., Гриценко В.А., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Черешнев В.А. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и его синтетические аналоги: иммунобиологические эффекты и клиническое применение. - Екатеринбург: УрО РАН, 2021. – 288 с. ISBN 978-5-7691-2549-2.

10. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. – Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. – 720 с. ISBN 978-5-7691-2497-6.

11. Медик В.А., Токмачев М.С., Фишман Б.Б. Статистика в медицине и биологии. «Теоретическая статистика». Под ред. Комарова Ю.М. – Москва: Медицина, 2000. – 412 с. ISBN 5-225-04630-4.

12. Файзуллина А.И., Зурочка А.В. Сравнительная оценка неспецифической активности цитокинпродуцирующих штаммов *Staphylococcus aureus*, имеющих и не имеющих ген белка А, при иммуноферментном анализе. Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, №. 2, С.163-168. DOI: 10.46235/1028-7221-270-ЕСА.

13. Фомина Л.О., Зурочка В.А., Симбирцев А.С., Гриценко В.А. Влияние времени культивирования *Staphylococcus aureus* на продукцию ими цитокино-подобных веществ, детектируемых методом иммуноферментного анализа. Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), №.3, С. 454-459. DOI: 10.31857/S102872210002427-4.

14. Фомина Л.О., Файзуллина А.И., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Симбирцев А.С., Гриценко В.А. Сравнительная оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* мультиплексным и иммуноферментным анализом. Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), №.3, С. 460-465. DOI: 10.31857/S102872210002428-5.

15. Fournier, B. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system / B. Fournier, D.J. Philpott. Clinical Microbiology Reviews, 2005, Vol. 18, No. 3, pp. 521-540. DOI: 10.1128/CMR.18.3.521-540.2005.

16. Cronin U.P., Girardeaux L., O'Meara E., Wilkinson M.G. Protein A-Mediated Binding of *Staphylococcus spp.* to Antibodies in Flow Cytometric Assays and Reduction of This Binding by Using Fc Receptor Blocking Reagent. ASM Journals. Applied and Environmental Microbiology, 2020. Vol. 86, No. 17, pdf. DOI: 10.1128/AEM.01435-20.

17. Macoto Kuroda et al. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet, 2001. Vol.357(9264), pp. 1225-1240. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04403-2.

18. Molne L., Verdrengh M., Tarkowski A. Role of neutrophil leukocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. Infection and immunity, 2000. Vol. 68(11), pp. 6162-6167. DOI: 10.1128/iai.68.11.6162-6167.2000.

19. Petrocola G, Nobile G, Rindi S, Speziale P. *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, Vol.7: 166. DOI: 10.3389/fcimb.201700166.

20. Rigby KM, DeLeo FR. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. Seminars in Immunopathology, 2012, Vol 34(2), pp. 237-259. DOI: 10.1007/s00281-011-0295-3.

Авторы

Фомина Людмила Олеговна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

Аспирант

Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

fomina454@yandex.ru

Гриценко Виктор Александрович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН

Д.м.н., профессор, главный научный сотрудник

Российская Федерация, 460000, Оренбург, ул. Пионерская, 11

vag59@mail.ru

Файзуллина Анастасия Ирековна
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук
Аспирант
Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106
anafaz@mail.ru

L.O. Fomina¹, V.A. Gritsenko², A.I. Fayzullina¹

COMPARATIVE ANALYSIS OF CYTOKINE DETERMINATION IN NEUTROPHIL SUPERNATANTS STIMULATED BY *S. AUREUS* SUPERNATANTS WITH AND WITHOUT THE *SPA* GENE

¹ Institute of Immunology and Physiology

of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation;

² Orenburg Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Abstract. This study presents the results of the determination of cytokines by multiplex analysis in the blood neutrophil supernatants of donors stimulated by *Staphylococcus aureus* supernatants, depending on the presence or absence of the staphylococcal protein A (*spa*) gene in bacteria. Cytokine indication was carried out by multiplex analysis using BioRad kits (USA) for the determination of 17 human cytokines (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A) after 1 hour incubation of staphylococcal supernatants with neutrophils.

It was shown that *S. aureus*, which had the staphylococcal protein A (*spa*) gene, significantly stimulated the secretion of neutrophils G-CSF (growth factor), IL-12p70, IL-17A, IFN- γ , IL-13, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-7, TNF- α (proinflammatory cytokines), MCP-1 (chemokine). But at the same time, they significantly reduced the secretion of IL-10 (anti-inflammatory cytokine), IL-8, MIP-1 β (chemokines). *S. aureus* supernatants, which did not have *spa*, also acted almost identically. IFN- γ increased less significantly under their action, and IL-1b, on the contrary, more significantly compared to *S. aureus* supernatants having the staphylococcal protein A gene. It was found that the supernatants of all studied clinical isolates of *S. aureus* with a pronounced ability to produce cytokine-like substances, regardless of the presence/absence of the *spa* gene, affect the ability of neutrophils to secrete cytokines.

Thus, the presence of cytokine-like activity in *S. aureus* affects the response of neutrophils to secrete a pool of cytokines upon contact of phagocytic cells with staphylococcal supernatants. In particular, pro-inflammatory interleukins, some chemokines and growth factors. This indicates that the interaction of neutrophils with extracellular cytokine-like products of *S. aureus* can significantly modulate the inflammatory process.

Keywords: neutrophils, cytokines, *Staphylococcus aureus*, *spa* gene, cytokine-like substances, multiplex analysis

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Lyudmila O. Fomina
fomina454@yandex.ru

Received 23.05.2021

For citation:

Fomina L.O., Gritsenko V.A., Fayzullina A.I. Comparative analysis of cytokine determination in neutrophil supernatants stimulated by *S. aureus* supernatants with and without the *SPA* gene. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 273–281. DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-273-281 (In Russ)

REFERENCES

1. Gritsenko V.A., Mavzyutov A.R., Pashkova T.M., Kartashova O.L., Tyapaeva Ya.V., Belozertseva Yu.P. Genetic profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bacteria carriers and patients with infectious and inflammatory pathology. J. microbiol., epidemiol. and immunobiol. 2018.4:56-62. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-4-56-62 (in Russ)
2. Gritsenko V.A., Aminin D.L., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Ivanov Y.B. Some biological effects immunomodulation by natural and synthetic origin in vitro as a basis for development of new drugs to combat the endogenous infections. Bulletin of the Orenburg Scientific Center of UB RAS, 2012, Vol. 3, pp. 1–17. [Electronic resource] URL: <http://elmag.uran.ru/magazine/Numbers/2012–3/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf>. (in Russ)
3. Gusev E.Yu., Zotova N.V., Lazareva M.A. Cytokine response and other differences between critical phases of sepsis-associated systemic inflammation. Medical Immunology (Russia). 2014;16(2):173-182. (In Russ.) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2014-2-173-182> (in Russ)
4. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Dukardt V.V., Gritsenko V.A., Tyapaeva Ya.V., Chereshev V.A. The phenomenon of the presence of a unique combination of immunobiological properties of the synthetic analogue of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM–CSF). Bulletin of the Orenburg Scientific Center UB RAS, 2016, Vol. 2: pp. 30c. [Elektr. resource] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016–2/Articles/ZAV-2016–2.pdf>). (in Russ)
5. Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zuyeva E.B., Tyapayeva Y.V., Gritsenko V.A. Bacteria as producers of cytokine-like substances. Russian journal of immunology, 2017, Vol. 11 (20), no. 3, pp. 374-376. URL: <https://rusimmun.ru/jour/article/view/691> eLIBRARY ID: 29826626.(in Russ)
6. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zuyeva E.B., Tyapayeva Y.V., Dukardt V.V., Gritsenko V.A. Cytokine and anti-cytokine activity of staphylococci. Methodical features. Russian journal of immunology, 2017, Vol. 11 (20), no. 4, pp. 707-709. eLIBRARY ID: 34982752. (in Russ)
7. Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zuyeva E.B., Tyapayeva Y.V., Gritsenko V.A. *Staphylococcus* as producers of cytokine-like substances. Russian journal of immunology, 2017, Vol. 11 (20), no. 2, pp. 134-136. <https://rusimmun.ru/jour/article/view/603>. eLIBRARY ID: 29826626. (in Russ)
8. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Fomina L.O., Fayzullina A.I., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A. Estimation of cytokine-like activity of *Staphylococcus aureus* depending on the availability of genetic determinant of staphylococcal protein A. Russian Journal of Immunology, 2019, Vol. 22 (13), no. 3, pp. C1162-1167. DOI: 10.31857/S102872210007247-6. (in Russ)
9. Zurochka A.V., Gritsenko V.A., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Chereshev V.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM–CSF) and its synthetic analogues: immunobiological effects and clinical application. Yekaterinburg: UrB RAS, 2021. 288 p. ISBN 978-5-7691-2549-2. (in Russ)
10. Zurochka A.V., Khaydukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research. – Yekaterinburg: RIO URO RAS, 2018. - 720 p. ISBN 978-5-7691-2497-6. (in Russ)
11. Medik V. A., Tokmachev M. S., Fishman B. B. Statistika in medicine and biology. «Theoretical statistics». Under the editorship of Yu. M. Komarov. Moscow: Medicine, 2000, 412 p. ISBN 5-225-04630-4. (in Russ)
12. Fayzullina A.I., Zurochka A.V. “ELISA-based comparative analysis of non-specific activity for cytokine-producing protein a gene-positive and negative *Staphylococcus aureus* strains”, Russian Journal of Immunology, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 163-168. doi: 10.46235/1028-7221-270-ECADOI: 10.46235/1028-7221-270-ECA. (in Russ)
13. Fomina L.O., Zurochka V.A Simbirtsev A.S., Gritsenko V.A. Influence of time of cultivation of *Staphylococcus aureus* on the production of cytokine-like substances that detected by ELISA. Russian journal of immunology, 2018. Vol. 12 (21), no. 3, pp. 454-459. doi: 10.31857/S102872210002427-4. (in Russ)
14. Fomina L.O., Fayzullina A.I., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Simbirtsev A.S., Gritsenko V.A. Comparative evaluation cytokine-like activity of *Staphylococcus aureus* by methods multiplex and ELISA. Russian journal of immunology, 2018. Vol. 12 (21), no. 3, pp. 460-465. doi: 10.31857/S102872210002428-

5. (in Russ)

15. Fournier, B. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system / B. Fournier, D.J. Philpott. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, Vol. 18, No. 3, pp. 521-540. doi: 10.1128/CMR.18.3.521-540.2005.

16. Cronin U.P., Girardeaux L., O'Meara E., Wilkinson M.G. Protein A-Mediated Binding of *Staphylococcus* spp. to Antibodies in Flow Cytometric Assays and Reduction of This Binding by Using Fc Receptor Blocking Reagent. *ASM Journals. Applied and Environmental Microbiology*, 2020. Vol. 86, No. 17, pdf. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01435-20>.

17. Macoto Kuroda et al. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 2001. Vol.357(9264), pp. 1225-1240. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04403-2.

18. Molne L., Verdrengh M., Tarkowski A. Role of neutrophil leukocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 2000. Vol. 68(11), pp. 6162-6167. doi: 10.1128/iai.68.11.6162-6167.2000.

19. Petrocola G, Nobile G, Rindi S, Speziale P. *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, Vol.7: 166. doi:10.3389/fcimb.201700166.

20. Rigby KM, DeLeo FR. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Seminars in Immunopathology*, 2012, Vol 34(2), pp. 237-259. doi:10.1007/s00281-011-0295-3.

Authors

Lyudmila O. Fomina

Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

Postgraduate student

106 Pervomayskaya st. Yekaterinburg Russian Federation 620049

fomina454@yandex.ru

Victor A. Gritsenko

Orenburg Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

MD, professor, Chief Researcher

11 Pionerskaya st. Orenburg Russian Federation 460000

vag59@mail.ru

Anastasia I. Fayzullina

Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

Postgraduate student

106 Pervomayskaya st. Yekaterinburg Russian Federation 620049

anafaz@mail.ru