

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ,
ВЫЯВЛЯЕМЫХ ИММУНОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ В
СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Горбунов Н. П. ^{1, 2},

Ищенко А. М. ^{1, 2},

Жахов А. В. ^{1, 2},

Трофимов А. В. ²,

Елисеев И. Е. ³,

Зурочка А. В. ⁴,

Фомина Л. О. ⁴,

Файзуллина А. И. ⁴,

Гриценко В. А. ⁵,

Симбирцев А. С. ^{1, 2}

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера
Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия.

² ФГУП "Гос.НИИ особо чистых биопрепаратов" ФМБА России, Санкт-
Петербург, Россия.

³ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»,
Школа информатики, физики и технологий.

⁴ ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург,
Россия.

⁵ ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН
(Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), Оренбург,
Россия.

**IMMUNOCHEMICAL DETECTION SPECIFICITY AND MOLECULAR
PROPERTIES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS-DERIVED CYTOKINE-
LIKE SUBSTANCES**

Gorbunov N. ^{a, b},

Ischenko A. ^{a, b},

Zhakhov A. ^{a, b},

Trofimov A. ^b,

Eliseev I. ^c,

Zurochka A. ^d,

Fomina L. ^d,

Fayzullina A. ^d,

Gritsenko V. ^e,

Simbirtsev A. ^{a, b}

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

^b Research institute of highly pure biopreparations, Federal medico-biological agency.

^c HSE University, School of Computer Science, Physics and Technology.

^d UrB RAS, Yekaterinburg, Russian Federation.

^e UrB RAS – a separate structural unit of the OFRC Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation.

Резюме

Цитокины регулируют взаимодействие между клетками разного происхождения у высших животных и человека, однако, близкие им по структуре молекулы – цитокиноподобные вещества (ЦПВ), обнаружены и у более примитивных организмов. С использованием методов иммунохимического анализа ЦПВ, напоминающие ряд цитокинов человека, обнаружены в супернатантах, полученных после культивирования бактерий разной видовой принадлежности, в том числе в супернатантах бульонных культур бактерий вида *Staphylococcus aureus*. Целями настоящей работы являлись изучение специфичности иммунохимического определения, и молекулярная характеристика ЦПВ из супернатантов культур различных штаммов стафилококков. Поскольку наиболее продуктивным источником ЦПВ являлся штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, а в супернатантах культур стафилококков максимальные концентрации регистрировались с помощью антител к рецепторному антагонисту интерлейкина-1 человека (IL-1ra), была изучена специфичность иммуноферментных методов, используемых для определения именно этого цитокина. Результаты экспериментов показали, что супернатанты *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 содержат вещества, отличные от IL-1ra, поскольку с ними связывались не только специфические к IL-1ra антитела, но и антитела другой направленности (например, к супероксиддисмутазе человека), характеризуя тем самым неспецифичность регистрируемого взаимодействия. При этом супернатант штамма *S. aureus* ATCC 25923 не оказывал конкурирующего эффекта на взаимодействие с иммобилизованным IL-1ra, что свидетельствовало об отсутствии специфического антигена в тестируемой пробе. Для идентификации ЦПВ их выделяли из супернатанта культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 посредством иммуноаффинной хроматографии на колонке с Сефарозой, нагруженной антителами против IL-1ra. При анализе методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата

натрия элюат адсорбированных на антителах к IL-1ra ЦПВ был гетерогенен и характеризовался 4 мажорными зонами в области молекулярных масс 50-60 кДа и 35 кДа, причем в спектре отсутствовал компонент с ММ 20 кДа, характерный для белка IL-1ra. Во фракциях разделенных компонентов элюата, вырезанных из геля и подвергнутых обработке трипсином для последующего исследования при помощи масс-спектрометрии, обнаружены триптические пептиды, гомологичные производным стафилококкового белка А (SpA). Результаты этого анализа позволили идентифицировать белок А как основной компонент исследованных образцов элюата. Таким образом, с большой долей вероятности можно полагать, что иммуноглобулины из иммуноферментных тест-систем для определения цитокинов могут реагировать с секреторными производными иммуноглобулин-связывающих белков стафилококков, которые регистрируются как ЦПВ. Следовательно, так называемые ЦПВ, выявляемые методом ИФА в супернатантах культивируемых стафилококков, отличаются от истинных цитокинов человека, а их взаимодействие с антителами носит «неспецифический» характер.

Ключевые слова: цитокины, *S. aureus*, цитокино-подобные вещества, иммуноферментный анализ, иммуноаффинная хроматография, электрофорез, масс-спектрометрия.

Abstract

Cytokines are main interaction regulators between cells of different origin in higher organisms and human. However similar molecules called cytokine-like substances (CLS) have been also found in more primitive organisms. Using immunochemical methods, CLS mimicking some human cytokines were detected in supernatants obtained after cultivation of different bacterial strains, including *Staphylococcus aureus*. This article was aimed at assessing immunochemical detection specificity and molecular properties of CLS derived from *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 supernatants. Maximal CLS concentrations were detected using antibodies against human interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), therefore justifying use of this cytokine for immunochemical specificity studies. According to the obtained data *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 supernatants contained unspecific substance different from IL-1ra because it interacted not only with specific anti IL-1ra antibodies, but also with antibodies recognizing other proteins (for example, human enzyme superoxide dismutase). Upon this, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 supernatant had no competitive effect on interaction with immobilized IL-1ra, evidencing about the lack of specific antigen in the test material. For CLS identification they were purified from *S. aureus* ATCC 25923 supernatant using immunoaffinity chromatography on Sepharose column containing anti-human IL-1ra antibodies. In the eluate studied with SDS PAGE electrophoresis we have found heterogenous material characterized by four major bands with $M_r=50-60$ kDa and 35 kDa. Importantly, it lacked 20 kDa signal specific for human IL-1ra. Each of four study electrophoretic components were extracted from the gel, digested with trypsin, and analyzed using mass-spectrometry that allowed to identify tryptic peptides highly homologous to that of staphylococcal protein A (SpA). Thus, the data obtained allowed to reveal SpA as a major eluate component. Highly likely it may be assumed that immunoglobulins used in enzyme immunoassay test kits for cytokine detection can react with secretory derivatives of staphylococcal immunoglobulin-binding proteins identified as CLS. Consequently, the so-called

CLS detected by ELISA in supernatants derived after staphylococcus cultivation differ from true human cytokines, and their interaction with antibodies may be “non-specific”.

Keywords: cytokines, *S. aureus*, cytokine-like substances, ELISA, immune affinity chromatography, electrophoresis, mass-spectrometry.

1 Введение

Цитокины как медиаторные молекулы производятся многоклеточными организмами и представляют собой белки, участвующие в регуляции многих жизненно важных физиологических и патологических процессов. Система цитокинов регулирует взаимодействие между клетками разного происхождения как на местном, так и системном уровнях. Считается, что цитокиновая сеть наиболее развита у высших животных и человека [5, 6]. Цитокины, как полноразмерные белки, так и близкие им по структуре молекулы – цитокиноподобные вещества (ЦПВ), обнаружены не только у млекопитающих и хордовых животных, но и у более примитивных многоклеточных организмов и даже у одноклеточных эукариот [11-14, 24, 27, 29]. Это говорит о древнем происхождении данных макромолекул, которые выполняли защитные и регуляторные функции для многообразных видов живых существ и принимали более совершенные виды в процессе эволюции по мере усложнения организмов.

В ряде опубликованных работ авторы, используя различные методы иммунохимического анализа, обнаружили в супернатантах культуральных жидкостей, полученных после культивирования разных прокариот грамположительных и грамотрицательных бактерий разной видовой принадлежности значимые количества таких цитокинов, как IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17, TNF, INF γ , INF α , IL-10, IL-1ra, которые были отнесены к ЦПВ [1, 2]. Наиболее широкий спектр и высокий уровень ЦПВ был зарегистрирован в супернатантах бульонных культур у бактерий вида *Staphylococcus aureus* [3, 7, 8].

Потенциально патогенные бактерии вида *S. aureus*, являясь частыми симбионтами человека, располагают широким набором факторов вирулентности и персистенции, что позволяет им уклоняться от иммунного ответа макроорганизма и колонизировать человеческую популяцию, вызывая

39 значительную заболеваемость и смертность во всем мире [25, 30].
40 Разнообразие механизмов иммунного уклонения у *S. aureus* сформировалось в
41 результате давнего взаимодействия бактерий и человека в процессе эволюции
42 [18-22, 26]. Можно допустить, что обнаружение ЦПВ у возбудителей
43 инфекционных заболеваний связано с тем, что микроорганизмы в процессе
44 эволюции приобрели способность синтезировать белки, которые имитируют
45 определенные участки полипептидных молекул цитокинов, синтезируемых
46 клетками эукариот, что позволяет им модифицировать иммунный ответ
47 хозяина, тем самым повышая свою способность к выживанию [33-35].

48 Обнаруженные в культуральной среде ЦПВ были выявлены с
49 использованием различных коммерческих наборов реагентов от разных
50 производителей, включающих как мультиплексные хемилюминесцентные,
51 так и иммуноферментные тест-системы для определения цитокинов человека
52 [7-9, 13]. Однако, полученные экспериментальные данные о секреции
53 прокариотами ЦПВ, опубликованные в работах [2, 7, 12, 13] и основанные
54 только на результатах иммунохимических методов, не дают представления о
55 природе, структуре и функциях детектируемых веществ, продуцируемых
56 бактериями. Они также не были подтверждены молекулярно-генетическими
57 исследованиями по экспрессии мРНК цитокинов в исследуемых
58 микроорганизмах, и данными о проявлении ЦПВ функциональной активности
59 в отношении иммунокомпетентных клеток. Вместе с тем известно, что
60 аминокислотные мотивы ряда полипептидов в протеоме про- и эукариот
61 характеризуются гомологией [32], и это позволяет предположить возможность
62 получения ложноположительных результатов при использовании реакций
63 антиген-антитело.

64 Целями настоящей работы являлись детальные исследования
65 специфичности взаимодействий, регистрируемых методами ИФА, а также
66 молекулярная характеристика природы ЦПВ, выделенных из супернатантов

57 культуральных жидкостей *S. aureus* с использованием методов масс-
58 спектрометрии и электрофореза в ПААГ.

59 2 Материалы и методы исследований

60 В работе использовано 7 штаммов *Staphylococcus aureus*, включая 2
61 музейных тест-штамма из коллекции ATCC *S. aureus* ATCC 25923 и
62 ATCC 6538-209P, а также 5 клинических штаммов *S. aureus* из коллекции
63 Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбург).
64 Штаммы *S. aureus* были разделены на две группы – с наличием у них в геноме
65 гена *sra* (1 группа) и его отсутствием (2 группа), которые ранее были
66 охарактеризованы в работе [1].

67 На первом этапе для оценки продукции бактериями цитокиноподобных
68 веществ (ЦПВ) изученные штаммы *S. aureus* инкубировали в мясопептонном
69 бульоне (МПБ) при 37°C в течение 24 и 48 ч, после чего бульонные культуры
70 центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин и отбирали
71 супернатанты, которые пропускали через мембранные фильтры с диаметром
72 пор 0,22 мкм с целью их дополнительной очистки от клеток и клеточного
73 дебриса.

74 Количественное определение провоспалительных (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-
75 8, IL-17, TNF, INF γ , INF α) и противовоспалительных (IL-10, IL-1ra) цитокинов
76 человека в бактериальных супернатантах производили методом сэндвич ИФА
77 с использованием тест-систем компании ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург,
78 Россия). Концентрации цитокинов определялись согласно инструкции
79 производителя. Выбор указанных тест-систем обусловлен тем, что
80 результаты, полученные при их использовании, коррелировали с данными,
81 полученными с применением других тест-систем (АО «Вектор-Бест»
82 (Новосибирск, Россия) и с помощью других методов анализа [3,9]. В качестве
83 отрицательного контроля использовали среду для культивирования бактерий
84 – МПБ.

Для детального исследования специфичности взаимодействия возможного аналога рецепторного антагониста интерлейкина-1 (IL-1ra), выявленного в супернатанте *S. aureus* ATCC 25923, использовали рекомбиантные высокоочищенные белки IL-1ra, супероксиддисмутазу (SOD) и поликлональные иммуноаффинно очищенные антитела кролика к этим белкам. Эти же иммуноглобулины в качестве захватывающих и детектирующих антител использовались в наборе реагентов тест-системы ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия).

В конкурентном ИФА помимо рекомбинантного IL-1ra использовали конъюгат поликлональных иммуноаффинноочищенных антител кролика с пероксидазой хрена (антиIL-1ra-ПХ) и супернатант *S. aureus* ATCC 25923. Для проведения конкурентного ИФА подбирали рабочее разведение антиIL-1ra-ПХ. С этой целью в лунки планшета сорбировали IL-1ra в концентрации 6,75 мкг/мл путем 18-часовой инкубации при +4°C во влажной камере. Подбор рабочего разведения конъюгата проводили в прямом твердофазном ИФА, титруя приготовленный конъюгат с шагом 1:4 и основываясь на показателе оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) после 1 часовой инкубации конъюгата с сорбированным IL-1ra. В результате экспериментов выбрано оптимальное разведение (рабочее разведение) для постановки конкурентного ИФА - 1:3200 IL-1ra, при котором уровень ОП₄₅₀ приходился на линейную часть кривой зависимости ОП от концентрации.

Для идентификации (потенциально IL-1ra-подобного вещества в супернатанте клеток штамма *S. aureus* ATCC 25923, который в дальнейшем обозначался как IL-1ra*, синтезировали иммуноаффинный сорбент, на котором методом иммуноаффинной хроматографии осуществляли выделение IL-1ra* из супернатанта. Синтез сорбента осуществляли, применяя матрицу CNBr-активированной сефарозы производства GE Healthcare, на которую иммобилизовали иммуноаффинно очищенную фракцию строго специфичных

поликлональных IgG кролика к IL-1ra с нагрузкой 2,5 мг антител/мл сорбента, обозначаемого как IgG_{IL-1Ra}-Сефароза.

Иммуноаффинную хроматографию проводили пропусканием через колонку с 5 мл IgG_{IL-1Ra}-Сефарозы, уравновешенную буферным раствором, содержащим 20 mM фосфатного буфера pH 7,5 и 150 mM NaCl (фосфатно-солевой буфер, ФСБ) 1000 мл супернатанта культуры *S. aureus* ATCC 25923 или в параллельном эксперименте раствора содержащего 0,5 мг IL-1ra. Колонку отмывали буферным раствором под контролем УФ монитора ($\lambda=280$ нм) до значения оптической плотности ФСБ. Адсорбированные белки элюировали 0,2М глицин-HCl буфером, pH 2,0, контролируя их выход с помощью спектрофотометра при длине волны 280 нм, и после элюции немедленно нейтрализовали белковые растворы до значения pH 7,2. Полученные в элюате белки исследовали методами ИФА и электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с додецилсульфатом натрия (ПААГ-НаДДС) с последующим окрашиванием Кумасси (G-250).

Идентификацию выделенного из супернатанта культуры *S. aureus* ATCC 25923 белка осуществляли методом масс спектрометрии. С этой целью после электрофореза фракций элюированного IL-1ra* белковые зоны вырезали из геля и обрабатывали трипсином по стандартному протоколу [31]. Полученные в результате трипсинолиза пептиды экстрагировали из геля и разделяли при помощи обращенно-фазной хроматографии. Масс-спектры были получены на приборе Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) с использованием электроспрей ионизации. Пептиды были идентифицированы *de novo* в пакете PEAKS [35] с максимальным допустимым отклонением массы прекурсора 10 ppm и массы фрагмента 0,05 Да. Идентификация белков была проведена путем их поиска в протеомах *S. aureus* в базе данных Uniprot, версия от 15.08.2019. Парное выравнивание пептидов проводилось со стафилококковым белком A из *S. aureus* штамма NCTC 8325 (UniprotKB P02976).

3 Результаты исследований

На первом этапе исследования методом сэндвич ИФА были определены концентрации цитокиноподобных веществ (ЦПВ), соответствующих ряду цитокинов человека (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17, INF α , INF γ , TNF α , IL-10, IL-1 α) в супернатантах суточных и двухсуточных культур 7 штаммов *S. aureus*, оппозитных по наличию у них в геноме гена *sra*, ответственного за продукцию стафилококкового пептида А (SpA).

Следует отметить, что из спектра изученных цитокинов в супернатантах 7 штаммов *S. aureus*, вне зависимости от наличия у них гена *sra*, в относительной высоких концентрациях регистрировались ЦПВ, «аналогичные» IL-1 α , IL-4, INF α и INF γ человека (табл. 1), тогда как другие ЦПВ либо детектировались в незначительных (следовых, на уровне ошибки метода) количествах (IL-1 β и TNF α), либо вовсе не выявлялись антителами к таким цитокинам человека, как IL-6, IL-8, IL-10 и IL-17 (в таблице не представлены).

Как видно из данных, представленных в таблице 1, наблюдалась выраженная межштаммовая вариабельность *S. aureus* (вне зависимости от наличия/отсутствия гена *sra*) уровней продукции ЦПВ, выявляемых антителами к IL-1 α , INF α , INF γ и IL-4 человека, которые колебались в достаточно широких диапазонах. Так, в супернатантах суточных культур бактерий максимальные значения концентраций превышали минимальные для IL-1 α в 63,7 раза (63,7 против 1,0 нг/мл), для INF α в 30,2 раза (178,2 против 21,1 пкг/мл), для INF γ в 32,0 раза (2339,0 против 73,0 пкг/мл), для IL-4 в 81,3 раза (162,5 против 2,0 пкг/мл). Кроме того, экспериментально установлено, что увеличение длительности культивирования бактерий с 24 до 48 часов сопровождалось повышением в супернатантах концентрации всех ЦПВ в 1,27-1,63 раза, причем максимальный рост наблюдался при анализе в культуральной среде IL-1 α -подобного вещества (39,1 $\pm$ 9,5 против 63,7 $\pm$ 11,4

нг/мл, $p < 0,05$).

Поскольку наиболее продуктивным источником ЦПВ являлся штамм *S. aureus* ATCC 25923, а среди этих веществ в супернатантах культур стафилококков максимальные концентрации (исчисляемые в десятках нг/мл) регистрировались с помощью антител к рецепторному антагонисту интерлейкина-1 (IL-1ra), то на втором этапе работы была изучена специфичность методов и тест-систем ИФА, используемых для определения цитокинов человека, с комбинированным применением специфических антител к рекомбинантным цитокину IL-1ra и белку SOD.

В качестве захватывающих антител использовались поликлональные иммуноаффинно очищенные антитела кролика к каждому из белков, а в качестве детектирующих – конъюгаты этих антител с пероксидазой хрена (ПХ).

В качестве положительного контроля специфичности для каждой пары антител и выбранных антигенов использовали вариант постановки иммуноферментной реакции, в которой использовались пары специфичных для каждого антигена антител:

А) (анти-IL-1ra)-(IL-1ra)-(анти-IL-1ra-ПХ)

Н) (анти-SOD)-(СОД)-(анти-SOD-ПХ).

В качестве отрицательного контроля для каждого антигена в парах использовались «чужие» либо захватывающие, либо детектирующие антитела:

В) (анти-IL-1ra)-(IL-1ra)-(анти-SOD-ПХ)

С) (анти-SOD)-(IL-1ra)-(анти-IL-1ra-ПХ)

Д) (анти-SOD)-(IL-1ra)-(анти-SOD-ПХ)

Е) (анти-IL-1ra)-(SOD)-(анти-IL-1ra-ПХ)

F) (анти-IL-1ra)-(SOD)-(анти-SOD-ПХ)

G) (анти-SOD)-(SOD)-(анти-IL-1ra-ПХ)

В случае использования специфических пар антител (А и Н) наблюдались линейные зависимости, связывающие оптическую плотность и концентрацию белка (рисунок 1 А, Н). В случае использования антигенов в паре с «чужим» антителом наблюдалось полное отсутствие реакций (рисунок 1 В, С, D, E, F, G).

Эти результаты свидетельствовали о строгой специфичности взаимодействий антиген-антитело в использованных тест-системах.

При исследовании специфичности взаимодействий выбранных пар антител с супернатантами стафилококков в композиционных постановках заменяли IL-1ra на супернатант культуры штамма *S. aureus* ATCC 25923, обозначая его далее по тексту условно IL-1ra*, и составляли композиции, в которых комбинировали пары специфичных антител с «чужими»:

A*) (анти-IL-1ra)-(IL-1ra*)-(анти-IL-1ra-ПХ)

B*) (анти-IL-1ra)-(IL-1ra*)-(анти-SOD-ПХ)

C*) (анти-SOD)-(IL-1ra*)-(анти-IL-1ra-ПХ)

D*) (анти-SOD)-(IL-1ra*)-(анти-SOD-ПХ)

В качестве отрицательного контроля в вышеуказанных композициях использовали образец культуральной среды (КС):

E*) (анти-IL-1ra)-(КС)-(анти-IL-1ra-ПХ)

F*) (анти-IL-1ra)-(КС)-(анти-SOD-ПХ)

G*) (анти-SOD)-(КС)-(анти-IL-1ra-ПХ)

H*) (анти-SOD)-(КС)-анти-SOD-ПХ)

Полученные данные представлены в таблице 2, из которой видно, что композиционные смеси, составленные по принципу пары специфичных антител, реагировали также, как и те, в составе которых с антигеном IL-1ra* использовались пары «чужих» антител (анти-SOD).

Результаты этого эксперимента указывали на то, что супернатанты *S. aureus* ATCC 25923 содержат вещества, отличные от IL-1ra, поскольку их распознавали и с ними связывались не только специфические к IL-1ra антитела, но и «чужие» антитела (к SOD), характеризуя тем самым неспецифичность регистрируемого взаимодействия.

С целью дополнительного исследования специфичности взаимодействия IL-1ra*, находящегося в составе супернатанта культуральной среды *S. aureus* ATCC 25923, с поликлональными антителами к IL-1ra, был проведен конкурентный ИФА. С этой целью готовили серии разведений IL-1ra в диапазоне концентраций от 5000 до 39 нг/мл, супернатанта штамма *S. aureus* ATCC 25923 (IL-1ra*) и культуральной среды (КС) в качестве контроля в пределах от 1 до 1:128. Каждую пробу после разведения инкубировали 1 час при 37°C с конъюгатом анти-IL-1ra-ПХ в рабочем разведении, и вносили в лунки планшета с сорбированным цитокином IL-1ra (6.75 мкг/мл). Планшет инкубировали 1 час при 37°C и регистрировали оптическую плотность с помощью планшетного ридера. Результаты конкурентного ИФА представлены в таблице 3.

Как следует из полученных результатов, IL-1ra в растворе связывался с конъюгатом анти-IL-1ra-ПХ и дозозависимо конкурировал с иммобилизованным IL-1ra за взаимодействие со свободным конъюгатом анти-IL-1ra-ПХ. В то же время супернатант штамма *S. aureus* ATCC 25923, инкубированный даже в максимально высокой концентрации (без разведения) не оказывал конкурирующего эффекта на взаимодействие с иммобилизованным IL-1ra, что свидетельствовало об отсутствии

специфического антигена в тестируемой пробе.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов подтвердили гипотезу о неспецифической иммуноферментной реакции при определении IL-1ra в супернатанте культуры штамма *S. aureus* ATCC 25923 и об отсутствии полной идентичности находящихся в нем веществ с цитокином IL-1ra.

В связи с этим на следующем этапе исследования были проведены эксперименты по идентификации белка IL-1ra*, содержащегося в супернатанте бульонной культуры штамма *S. aureus* ATCC 25923, с использованием физико-химических и физических методов. Для этого IL-1ra* выделяли из супернатанта посредством иммуноаффинной хроматографии на колонке с IgG_{IL-1ra}-Сефарозой. На колонку наносили 1000 мл супернатанта, в котором титр препарата, условно называемого IL-1ra*, в оптических единицах оценивался как 1:10⁷. Полноту адсорбции белка IL-1ra* из супернатанта проверяли с использованием тест-системы ООО «Цитокин» по достижению нулевого уровня его содержания при выходе из колонки. Параллельно вели адсорбцию рекомбинантного IL-1ra, как описано в материалах и методах.

Элюаты адсорбированных на иммуносорбенте белков были проанализированы посредством электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с использованием градиентного геля 4-20% в присутствии додецилсульфата натрия в восстанавливающих и в невосстанавливающих условиях (рисунок 2 А и В). Элюат адсорбированного IL-1ra* характеризовался одним широким пиком, который был разделен на три фракции: одну отбирали на максимуме пика и две другие – на склоне пика (дорожки 1, 2 и 3 на электрофореграмме). Как видно из электрофореграммы (рисунок 2 А), препарат IL-1ra* был гетерогенен и характеризовался 4 мажорными зонами в области наиболее высоких молекулярных масс 50-60 кДа и 35 кДа.

IL-1ra был элюирован индивидуальным узким пиком, оказался

гомогенен и характеризовался, как и ожидалось, молекулярной массой около 20 кДа (рисунок 2 В), строго соответствующей цитокину IL-1ra.

Аминокислотные последовательности экстрагированных из геля и определенных при помощи масс-спектрометрии уникальных триптических пептидов IL-1ra* каждой фракции приведены в таблице 4.

Большинство пептидов, не связанных с белком А, являлись фрагментами фактора элонгации EF-Tu, что можно объяснить контаминацией образцов из-за распространенности данного белка у бактерий вида *S. aureus*. Пример покрытия последовательности белка А идентифицированными пептидами приведен на рисунке 3.

Таким образом, результаты анализа позволили идентифицировать белок А как основной компонент исследованных образцов элюата. Во всех образцах были выявлены фрагменты белка А, во фракциях 2-4 они составляли подавляющее большинство идентифицированных пептидов. Среди 5 пептидов, найденных во всех 4-х фракциях, 4 принадлежали белку А.

4 Обсуждение

В настоящем исследовании мы воспроизвели и детально проанализировали ранее опубликованные данные о том, что в супернатантах культур музейных и клинических штаммов *S. aureus* методом ИФА выявляются значимые уровни ряда провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (а именно, IL-1ra, INFα, INFγ и IL-4), обозначенных нами как цитокиноподобные вещества – ЦПВ [2, 3, 8, 9]. Детальное их изучение с применением различных физических и физико-химических методов позволило приблизиться к пониманию природы IL-1ra-подобного соединения (IL-1ra*), продуцируемого *S. aureus*.

В частности, в экспериментах с помощью сформированной сэндвич тест-системы для ИФА на основе пары антител анти-IL-1ra/анти-SOD («свой»/«чужие») было доказано, что цитокин подобный IL-1ra* в

супернатанте культуры штамма *S. aureus* ATCC 25923 с приблизительно равной интенсивностью распознается как «своими» антителами (анти-IL-1ra), так и «чужими» (анти-SOD). Неспецифичность взаимодействия цитокиноподобных IL-1ra* с антителами к IL-1ra подтверждалась результатами конкурентного ИФА, которые свидетельствовали, что конкурентный рекомбинантный IL-1ra дозозависимо снижал интенсивность связывания детектирующего антитела с иммобилизованным IL-1ra, в то время как культуральный супернатант не оказывал на иммуноферментную реакцию никакого влияния. Иначе говоря, полученные результаты указывают на то, что имеющиеся в супернатанте культуры *S. aureus* вещества нельзя отнести к «истинному» IL-1ra, хотя они и были способны связываться с антителами к данному цитокину, то есть давать ложноположительную реакцию в ИФА.

Для идентификации возможного белка, способного взаимодействовать с антителами к IL-1ra в кросс-реакции, нами на колонке с помощью синтезированного иммуноаффинного сорбента IgG_{IL-1Ra}-Сефарозой из супернатанта бульонной культуры штамма *S. aureus* ATCC 25923 были выделены белки, исследованные методом электрофореза в ПААГ-НаДДС. Полученный препарат включал набор молекулярных масс, в спектре которого отсутствовал компонент с мол. м. 20 кДа, характерной для белка IL-1ra. Во фракциях разделенных компонентов элюата, вырезанных из геля и подвергнутых обработке трипсином для последующего исследования при помощи масс-спектрометрии, обнаружены триптические пептиды, гомологичные производным стафилококкового белка А (SpA).

Следует отметить, что SpA, продуцируемый большинством клинических штаммов *S. aureus*, относится к важным факторам вирулентности этих бактерий. Известно, что молекулы SpA изначально прикрепляются к клеточной стенке и впоследствии высвобождаются в среду. Точный механизм высвобождения SpA не установлен, но есть предположения, что этот эффект достигается, посредством активности LytM, гидролазы клеточной стенки,

которая разрезает поперечные мостики стафилококкового пептидогликана и обеспечивает выход белка А в окружающую среду [15, 28]. Возможно, в этом процессе участвует и сериновая протеаза V8 *S. aureus*, обеспечивающая отщепление SpA с поверхности клеток [23].

Считается, что высвобожденный стафилококковый пептид А защищает бактерии, циркулирующие в организме, в частности в крови человека, от гибели за счет уклонения от нормального иммунного ответа [19]. Среди множества механизмов, с помощью которых SpA нарушает врожденный и адаптивный иммунитет, можно выделить его способность связываться с Fc-областью IgG, что приводит к дезориентации взаимодействия комплекса антитела с антигеном и, тем самым, снижает эффективность фагоцитоза. Наличие сразу пяти иммуноглобулин-связывающих доменов в молекуле полноразмерного белка А позволяет ему активно преципитировать антитела из раствора. Возможно, именно эта способность белка А лежит в основе наблюдаемого эффекта ложноположительного сигнала в ИФА. Кроме того, SpA препятствует взаимодействию между Fc фрагментами молекул IgG (Fc–Fc взаимодействие) ингибируя активацию системы комплемента [17]. Способность взаимодействия SpA с Fc-IgG в настоящее время широко используется в биотехнологии для выделения определенных субтипов иммуноглобулинов.

Кроме SpA, у *S. aureus* иммуноглобулин-связывающей активностью обладает белок Sbi, имеющий два N-концевых домена, которые связываются с Fc-областью IgG аналогично белку А, и два домена, которые могут связываться с белком системы комплемента C3, выключая его из участия в альтернативном пути активации в жидкой фазе. Sbi наряду с SpA присутствует в надосадочных жидкостях стафилококковых культур, и как секретируемая форма также способствует уклонению от иммунного ответа на стафилококк, взаимодействуя с IgG и блокируя его защитный эффект [32]. К этой же группе

белков принадлежит выявленный у некоторых штаммов *S. aureus* Ig-связывающий пептид, который позже был идентифицирован как часть Sbi (белок second binding immunoglobulin) [36, 37].

Следовательно, не только штаммы *S. aureus*, имеющие ген *spa*, но и изоляты этих бактерий с другими генотипами могут рассматриваться как потенциальные поставщики иммуноглобулин-связывающих молекул. Нельзя исключить, что именно с этим связана, с одной стороны, гетерогенная картина молекулярно-весового спектра элюированного с иммуноаффинной колонки материала из культурального супернатанта штамма *S. aureus* ATCC 25923, с другой стороны, обнаруженные с помощью ИФА у клинических изолятов *S. aureus* без гена *spa* целый ряд молекул, расцениваемых как ЦПВ [4, 7].

Помимо стафилококков многие грамположительные и грамотрицательные бактерии в процессе культивирования выделяют в окружающую среду факторы вирулентности, где они могут взаимодействовать с иммуноглобулинами класса G, как, например, белок G стрептококков группы C или M-подобные белки стрептококков группы A [10,16], в результате чего можно ожидать получения аналогичных ложноположительные результатов при использовании ИФА.

Таким образом, с большой долей вероятности можно полагать, что иммуноглобулины из наборов (IgG_н) коммерческих тест-систем для определения цитокинов реагируют с секреторными производными иммуноглобулин-связывающих белков, вышедшими в культуральную среду с образованием комплексов (IgG_н) – (SpA/Sbi/Ig-связывающие пептиды) – (IgG_н-ПХ), которые регистрируются как ЦПВ. Следовательно, данные, представленные в настоящей работе и обсуждаемых публикациях, свидетельствуют о том, что так называемые цитокиноподобные вещества, выявляемые методом ИФА в супернатантах культивируемых стафилококков и других бактерий, отличаются от истинных цитокинов человека и животных, а

их взаимодействие с антителами носит «неспецифический» характер (кросс-реакция) и, скорее всего, обусловлено наличием у них эпитопов, которые обеспечивают с разной степенью аффинности связывание этих соединений с антителами к определенным цитокинам.

В то же время, уже имеющиеся результаты необходимо учитывать при определении уровней цитокинов в биологических жидкостях методами ИФА или другими методами с применением антител, когда у пациента – источника исследуемого образца имеется бактериальная инфекционно-воспалительная патология, особенно генерализованная инфекция и/или сепсис. Такими образцами для исследования могут быть плазма крови при септических состояниях, материал из гнойного очага воспаления, отделяемое из раны и др. Присутствие в исследуемом материале бактерий, синтезирующих взаимодействующие с антителами белки, может привести к искажению оценки реальных уровней цитокинов и других медиаторов воспаления. В этой связи необходима разработка новых подходов к определению уровней цитокинов в исследуемых образцах или моделей, обеспечивающих возможность оценки вклада инфекционного агента в формирование пула регистрируемых цитокинов.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Концентрация ряда цитокиноподобных веществ в супернатантах бульонных культур *S. aureus*, определенных с использованием тест-систем для ИФА цитокинов человека, с учетом времени культивирования бактерий.

Table 1. Concentration of a number of cytokine-like substances in the supernatants of *S. aureus* broth cultures determined using human cytokine ELISA test-systems, taking into account the time of bacterial cultivation.

Штаммы бактерий / Bacterial strains	Ген <i>spa</i> / Gen <i>spa</i> (+/-) *	Концентрация цитокиноподобных веществ в супернатантах с учетом времени культивирования бактерий Concentration of cytokine-like substances in the supernatants, taking into account the time of bacterial cultivation							
		IL-1ra, нг/мл		INFα, пкг/мл		INFγ, пкг/мл		IL-4, пкг/мл	
		24 ч / 24 h	48 ч / 48 h	24 ч / 24 h	48 ч / 48 h	24 ч / 24 h	48 ч / 48 h	24 ч / 24 h	48 ч / 48 h
Группа штаммов <i>S. aureus</i> с геном <i>spa</i> / A group of <i>S. aureus</i> strains with the <i>spa</i> gene									
1. <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	+	60,5	80,0	178,2	191,8	2339,0	2523,0	162,5	174,5
2. <i>S. aureus</i> (ATCC 6538-209P)	+	63,7	80,0	21,1	32,7	603,0	852,0	39,2	63,2
3. <i>S. aureus</i> (ICIS 39K)	+	41,9	80,0	131,0	156,8	1355,0	1689,0	109,0	150,5

4. <i>S. aureus</i> (ICIS 885G)	+	6,7	43,6	50,5	57,0	987,0	1170,0	54,0	59,7
Группа штаммов <i>S. aureus</i> без гена <i>spa</i>									
5. <i>S. aureus</i> (ICIS 33K)	-	49,7	79,6	83,1	155,8	1291,0	1898,0	103,4	163,9
6. <i>S. aureus</i> (ICIS 34K)	-	1,0	2,6	5,9	6,3	73,0	156,0	2,0	5,4
7. <i>S. aureus</i> (ICIS 37K)	-	50,0	80,0	39,4	98,8	883,0	1292,0	59,1	109,7
Отношение: Концентрация ЦПВ на 48 ч. Концентрация ЦПВ на 24 ч.		1,63		1,37		1,27		1,37	

Примечания: ген *spa* (+/-) *, где «+» - наличие гена; «-» - отсутствие гена

Notes: *spa* gene (+/-)*, where “+” - presence of the gene; “-” - absence of the gene

Таблица 2. Исследование специфичности белков супернатанта штамма *S. aureus* ATCC 25923 методом ИФА.

Table 2. A study of the specificity of the supernatant proteins *S. aureus* strain ATCC 25923 by ELISA.

			детектирующие антитела / detecting antibodies			
			анти-IL-1ra-PIX / anti-IL-1ra-HP	анти-SOD-PIX / anti-SOD-HP	анти-IL-1ra-PIX / anti-IL-1ra-HP	анти-SOD-PIX / anti-SOD-HP
			Оптическая плотность при 450 нм/Optical density at 450 nm			
вариант комбинации / combination option			A	B	C	D
rIL-1ra в различных концентрациях, пкг/мл / rIL-1ra in different concentrations, pg/ml	концентрация / concentration	120				
		0	1,207	0,025	0,040	0,088
		300	0,317	0,022	0,025	0,063
		150	0,163	0,024	0,022	0,066
		0	0,032	0,026	0,023	0,069
вариант комбинации / combination option			E	F	G	H
	концентр	250				
		0	0,037	0,027	0,022	2,687

rSOD в разных концентрациях , ПКГ/мл / rSOD in different concentrations, pg/ml		600	0,026	0,020	0,014	1,112
		150	0,035	0,024	0,020	0,286
		0	0,038	0,029	0,021	0,053
вариант комбинации/ combination option			A*	B*	C*	D*
Супернатант штамма <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (IL-1ra*)	разведение /	1	3,270	3,311	3,256	3,239
		20	3,216	3,269	3,146	3,219
		400	0,733	1,114	0,218	0,583
		800				
		0	0,052	0,057	0,027	0,096
вариант комбинации / combination option			E*	F*	G*	H*
Культуральн ая среда (КС) / Culture medium (CM)	разведение /	1	0,040	0,036	0,022	0,063
		20	0,042	0,034	0,021	0,093
		400	0,029	0,021	0,019	0,083
		800				
		0	0,030	0,022	0,018	0,079
			анти-IL-1ra / anti-IL-1ra		анти-SOD / anti- SOD	
			захватывающие антитела / capture antibodies			

Таблица 3. Исследование специфичности взаимодействия супернатанта штамма *S. aureus* ATCC 25923 с поликлональными аффинно-очищенными антителами к IL-1ra методом конкурентного ИФА.

Table 3. Study of the specificity of the interaction of *S. aureus* strain supernatant ATCC 25923 with polyclonal affinity-purified antibodies to IL-1ra by competitive ELISA.

детектирующие антитела / detecting antibodies					
анти-IL-1ra-ПХ / anti-IL-1ra-HP					
Конкуратор (IL-1ra или супернатант <i>S. aureus</i> ATCC 25923) / Concurator (IL-1ra or <i>S. aureus</i> supernatant ATCC 25923)					
Антиген IL-1ra / Antigen IL-1ra		Супернатант штамма <i>S. aureus</i> ATCC 25923 / <i>S. aureus</i> strain supernatant ATCC 25923		Культуральная среда (КС) / Culture medium (CM)	
Концентрация IL-1ra, нг/мл / Concentration IL-1ra, ng/ml	ОП при 450 нм / OD at 450 nm	Разведение супернатанта / Breeding of the supernatant	ОП при 450 нм / OD at 450 nm	Разведение КС / Breeding of CM	ОП при 450 нм / OD at 450 nm
5000	0,076	1	0,744	1	0,688
2500	0,134	2	0,763	2	0,719
1250	0,335	4	0,759	4	0,793

625	0,524	8	0,770	8	0,770
313	0,627	16	0,773	16	0,768
156	0,729	32	0,772	32	0,788
78	0,778	64	0,786	64	0,788
39	0,805	128	0,795	128	0,788
Сорбированный антиген IL-1ra 6,75 мкг/мл / Sorbed IL-1ra antigen 6.75 mcg/ml					

Таблица 4. Аминокислотные последовательности всех уникальных пептидов, идентифицированных во фракциях 1-4 при помощи масс-спектрометрии.

Table 4. Amino acid sequences of all unique peptides identified in fractions 1-4 by mass spectrometry.

Фракция 1 / Fraction 1	Фракция 2 / Fraction 2	Фракция 3 / Fraction 3	Фракция 4 / Fraction 4
		EILAEAK	ADNKFNK
		ADNNFNK	NGFIQSLK
		LNDAQAPK	LNESQAPK
		LNESQAPK	LNDAQAPK
<u>KLNDAPK</u>	<u>KLNDAPK</u>	<u>KLNDAPK</u>	<u>KLNDAPK</u>
<u>KLNESQAPK</u>	<u>KLNESQAPK</u>	<u>KLNESQAPK</u>	<u>KLNESQAPK</u>
TTVTGVEMFR	DAAYEIIQAK	DAAYEIIQAK	ADAQQNKFNK
			NGFIQSLKDD
		PSQSTNVLGE	PSQSTNVLGEA

		AK	K
		PSQSANLLAE AK	PSQSANLLAEA K
			KLNDAPKAD NK
<u>DDPSQSANLLA</u> <u>EAK</u>	<u>DDPSQSANLLA</u> <u>EAK</u>	<u>DDPSQSANLLAE</u> <u>AK</u>	<u>DDPSQSANLLAE</u> <u>AK</u>
<u>DDPSQSTNVLG</u> <u>EAK</u>	<u>DDPSQSTNVLG</u> <u>EAK</u>	<u>DDPSQSTNVLGE</u> <u>AK</u>	<u>DDPSQSTNVLGE</u> <u>AK</u>
ADGQFVTGGSI LYR	N(+.98)GFIQSLK	KLN(+.98)DAQ APK	KLN(+.98)DAQA PK
HTPFFSNYRPQF YFR			N(+.98)GFIQSLK DD
<u>LLDYAEAGDNI</u> <u>GALLR</u>	<u>LLDYAEAGDNIG</u> <u>AL LR</u>	<u>LLDYAEAGDNI</u> <u>GALLR</u>	<u>LLDYAEAGDNIG</u> <u>AL LR</u>
GMDIVIVTTAN TDEEAR		EQQNAFYEIL HLPNLTEEQR	DDPSQSAN(+.98) LLAEAK
VNIIDTPGHVDF TVEVER		EQQNAFYEIL HLPNLNEEQR	N(+.98)GFIQSLK DDPSVSK
IQFFLSQNFHVA EQFTGQK	IQFFLSQNFHVA EQFTGQK	N(+.98)GFIQSL KDDPSQSANL LAEAK	N(+.98)GFIQSLK DDPSQSANLLA EAK
GM(+15.99)DIVI VTTANTDEEAR		ADNNFNKEQQ NAFYEILNM(+ 15.99)PNLNEE	

		QR	
AAVEEGIVAGGG TALVN(+.98)VYQ (+.98)K			

Примечания: Жирным шрифтом отмечены пептиды, относящиеся к стафилококковому белку А. Подчеркнуты пептиды, выявленные во всех 4-х фракциях.

Notes: The peptides related to staphylococcal protein A are marked in bold. The peptides detected in all 4 fractions are underlined.

РИСУНКИ

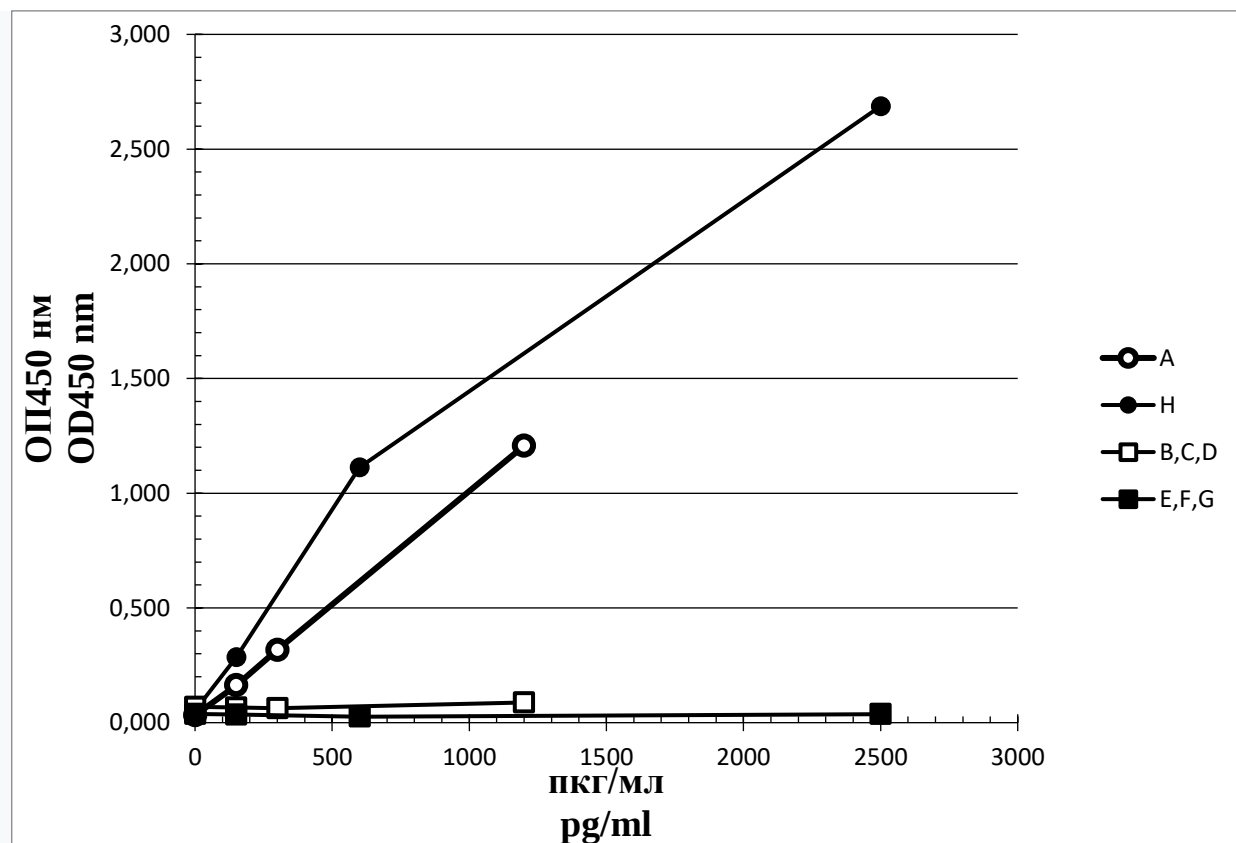
Рисунок 1. Зависимость оптической плотности от концентрации антигенов

при различных сочетаниях специфических и «чужих» антител.

Figure 1. Dependence of optical density on antigen concentration for various combinations of specific and “foreign” antibodies.

		детектирующие антитела / detecting antibodies			
		анти- IL-1ra-ПХ / anti-IL- 1ra-HP	анти- SOD-ПХ / anti-SOD- HP	анти- IL-1ra-ПХ / anti-IL- 1ra-HP	анти- SOD-ПХ/ anti-SOD- HP
		Оптическая плотность при 450 нм/Optical density at 450 nm			
вариант комбинации / combination option		A	B	C	D
	кон 1200	1,207	0,025	0,040	0,088

rIL-1ra в разных концентрациях, пкг/мл / rIL-1ra in different concentrations, pg/ml		300	0,317	0,022	0,025	0,063
		150	0,163	0,024	0,022	0,066
		0	0,032	0,026	0,023	0,069
вариант комбинации		E	F	G	H	
rSOD в разных концентрациях, пкг/мл / rSOD in different concentrations, pg/ml	концентрация / Concentration	2500	0,037	0,027	0,022	2,687
		600	0,026	0,020	0,014	1,112
		150	0,035	0,024	0,020	0,286
		0	0,038	0,029	0,021	0,053
		анти-IL-1ra / anti-IL-1ra		анти-SOD / anti- SOD		
		захватывающие антитела / exciting antibodies				

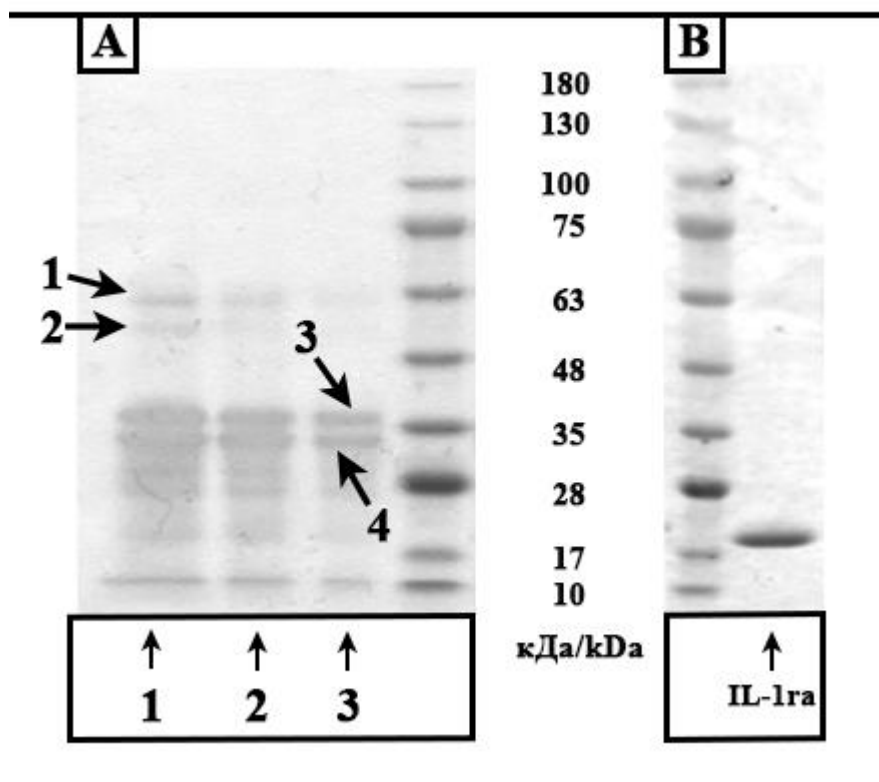


Примечания. На графике рисунка 1 точки комбинаций B,C,D и E,F,G приведены как средние значения оптических плотностей, указанных в таблице, сопровождающей рисунок.

Notes. In the graph of Figure 1, the points of combinations B,C,D and E,F,G are given as average values of optical densities indicated in the table accompanying the figure.

Рисунок 2. (А, В). Электрофореграмма образцов элюатов после адсорбции на колонке с IgG_{IL-1ra}-Сефарозой.

Figure 2. (A, B). An electrophoregram of eluate samples after adsorption on a column with IgG_{IL-1ra}-Sephadex.



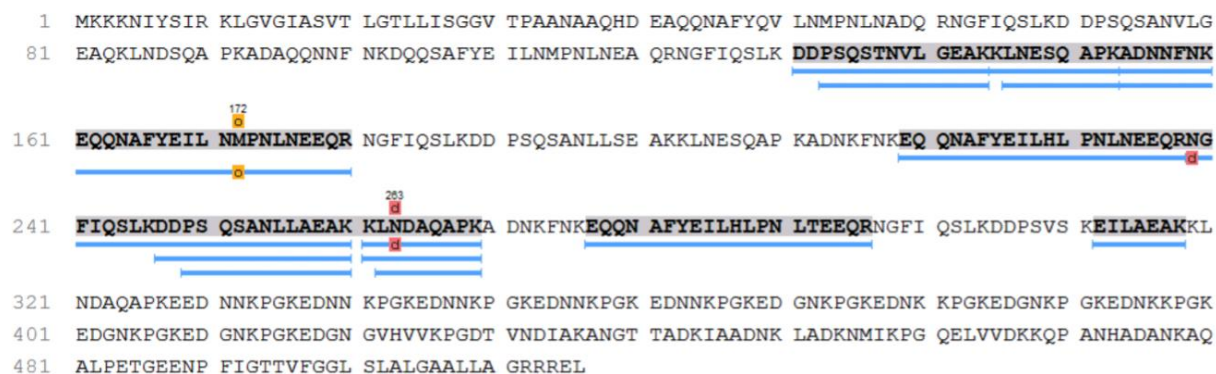
А – элюат IL-1ra* после пропускания супернатанта штамма *S. aureus* ATCC 25923 (дорожки: 1 – фракция максимум пика элюата; 2 и 3 – склон пика элюата; В – элюат рекомбинантного IL-1ra.

Маркеры молекулярных масс 10, 17, 28, 35, 48, 63, 75, 100, 130, 180 кДа (ab116027, Abcam); Стрелками указаны белковые зоны для вырезки образцов геля для трипсинолиза и масс-спектрометрии.

A – IL-1ra eluate* after passing the *S. aureus* strain supernatant ATCC 25923 (tracks: 1 – fraction of the maximum eluate peak; 2 and 3 – slope of the eluate peak; B – recombinant IL-1ra eluate. Markers of molecular weights 10, 17, 28, 35, 48, 63, 75, 100, 130, 180 CD (ab116027, Abcam); the arrows indicate the protein zones for cutting gel samples for trypsinolysis and mass spectrometry.

Рисунок 3. Визуализация покрытия последовательности стафилококкового белка А (Uniprot P02976) пептидами, идентифицированными во фракции 3.

Figure 3. Visualization of the coating of the sequence of staphylococcal protein A (Uniprot P02976) with peptides identified in fraction 3.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Ищенко Александр Митрофанович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией гибридомных технологий. ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия;

адрес: Санкт-Петербург, 198097, Огородный пер. д.6, кор. 2, кв. 6;

телефон: +7911-242-23-11;

e-mail: amischenko1946@mail.ru

Ischenko Aleksandr Mitrofanovich, Candidate of Biological Sciences (PhD), head of hybridoma technology laboratory. St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

address: St. Peterburg, 198097, Ogorogny Lane. 6, Bldg. 2, Apt. 6;

telephone: +7911-242-23-11;

e-mail: amischenko1946@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Горбунов Н.П., младший научный сотрудник, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия.

Gorbunov N.P. Junior Researcher St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; niko_laygo@mail.ru

Жахов А.В., научный сотрудник. ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия.

Zhakhov A.V. Research fellow. St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; zhs2003@list.ru

Трофимов А.В., руководитель группы. ФГУП "Гос.НИИ особо чистых биопрепаратов"

ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Trofimov A.V. Group leader. Research institute of highly pure biopreparations, Federal medico-biological agency, St.Petersburg, Russia.

Елисеев И.Е., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Школа информатики, физики и технологий.

Eliseev I.E., Candidate of Biological Sciences (PhD), senior researcher, HSE University, School of Computer Science, Physics and Technology; ieliseev@hse.ru

Зурочка А.В. ЗДН РФ, д.м.н., профессор, в.н.с., лаборатории иммунопатофизиологии ФБГУН ИИФ УрО РАН.

Zurochka A.V., Doctor of Medical Sciences, professor, Leading Researcher at the Institute of Immunology and Physiology, UrB RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; av_zurochka@mail.ru

Фомина Л.О. лаборатории иммунопатофизиологии ФБГУН ИИФ УрО РАН (аспирант).

Fomina L.O., postgraduate student, Institute of Immunology and Physiology, UrB RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; fomina454@yandex.ru

Файзулина А.И. лаборатории иммунопатофизиологии ФБГУН ИИФ УрО РАН (аспирант).

Fayzullina A.I. postgraduate student, Institute of Immunology and Physiology, UrB RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; anafaz@mail.ru

Гриценко В.А. д.м.н., профессор, Ученый секретарь Оренбургского федерального, исследовательского центра УрО РАН (ОФИЦ УрО РАН), главный научный сотрудник ИКВС УрО РАН.

Gritsenko V.A., Doctor of Medical Sciences, professor, Chief Researcher at the Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, UrB RAS – a separate structural unit of the OFRC Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation; vag59@mail.ru

Симбирцев А.С., ГосНИИ ОЧБ, научный руководитель, д.мед. н., профессор, чл.-корр. РАН, Санкт-Петербург, Россия.

Simbirtsev A.S. Research institute of highly pure biopreparations, Federal medico-biological agency, scientific supervisor, professor, MD, Russian academy of science corresponding member, St. Petersburg, Russia.

Блок 3. Метаданные статьи

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ,
ВЫЯВЛЯЕМЫХ ИММУНОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ В
СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР STAPHYLOCOCCUS AUREUS

IMMUNOCHEMICAL DETECTION SPECIFICITY AND MOLECULAR
PROPERTIES OF CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES FROM
STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ

CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES STUDY

Ключевые слова: цитокины, *S. aureus*, цитокино-подобные вещества, иммуноферментный анализ, иммуноаффинная хроматография, электрофорез, масс-спектрометрия.

Keywords: cytokines, *S. aureus*, cytokine-like substances, ELISA, immune affinity chromatography, electrophoresis, mass-spectrometry.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 15,

количество таблиц – 4,

количество рисунков – 3.

18.07.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
1	Гриценко В.А., Мавзютов А.Р., Пашкова Т.М., Карташова О.Л., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П. Генетический профиль <i>Staphylococcus aureus</i> , выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.	V. A .Gritsenko, A.R.Mavzyutov, T.M.Pashkova, O.L.Kartashova, Ya.V.Tyapaeva, Yu.P.Belozertseva Genetic profile <i>Staphylococcus aureus</i> , isolated from bacterial carriers and patients with infectious inflammatory pathology. Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, no. 4, pp. 56—62	doi: 10.36233/0372-9311-2018-4-56-62
2	2018, Т.95. № 4, С. 56-62		

3	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. 20, №.2. С. 134-136	Zurochka A. V., Dukardt V. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zueva E. B., Tyapaeva Y. V., Gritsenko V. A. Staphylococcus as producers of cytokine-like substances. Russ.J.Immunol. 2017. vol. 20, no. 2, pp. 134-136	
4	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. 20, №.3. С. 374-376	Zurochka A. V., Dukardt V. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zueva E. B., Tyapaeva Y. V., Gritsenko V. A. Bacteria as producers of cytokine-like substances. Russ.J.Immunol. 2017. vol. 20, no. 3, pp. 374-376. Fomina, A. I. Fayzullina, M. A. Dobrynina, V. A. Gritsenko Estimation of cytokine-like activity of staphylococcus aureus depending on the	doi:

5	Зурочка А.В., Зурочка В. А., Фомина Л.О., Файзуллина А.И., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Оценка цитокиноподобной активности <i>Staphylococcus aureus</i> в зависимости от наличия генетических детерминант стафилококкового белка А // Российский иммунологический журнал. 2019. Т. 22, №. 3. С.1162-1167	availability of genetic determinant of <i>Staphylococcal</i> protein A. Russ.J.Immunol., 2019. vol. 22, no. 3, pp. 1162-1167	10.31857/S102872 210007247-6
6	Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. - СПб: Фолиант, 2018. 512 С.	Simbirtsev A.S. Cytokines in human illness pathogenesis and therapy. St.Petersburg, Foliant. 2018. 512 P.	
7	Система цитокинов: Теоретические и клинические аспекты / Под ред. В.А.	Kozlov V.A., Sennikov S.V. (red.) Cytokine system: theoretic and clinical aspects. Novosibirsk. Nauka. 2004. 324 P.	

8	Козлова, С.В. Сенникова. - Новосибирск: Наука, 2004. 324. С. 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-ECA. [А.И.	Fayzullina, A.V. Zurochka ELISA-based comparative analysis of non-specific activity for cytokine-producing protein a gene-positive and negative Staphylococcus aureus strains, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, vol. 23, no. 2, pp. 163-168.	doi: 10.46235/1028-7221-270-ECA
9	Фомина Л.О., Зурочка В.А., Симбирцев А.С., Гриценко В.А. Влияние времени культивирования Staphylococcus aureus на продукцию ими цитокино-подобных	L. O. Fomina, A. V. Zurochka, A. S.Simbirtsev , V. A. Gritsenko. Influence of time of cultivation of Staphylococcus aureus on the production of cytokine-like substances detected by ELISA. Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy	doi: 10.31857/S102872210002427-4.

10	веществ, детектируемых методом иммуноферментного анализа // Российский иммунологический журнал. 2018. Т. 21. № 3. С. 454-459 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. 21. № 3. С. 460-465	Immunologicheskii Zhurnal, 2018, vol. 21, no. 3, pp. 454-459 L. O. Fomina, A.I. Fayzullina, A. V. Zurochka, M.A.Dobrynina, A. S.Simbirtsev, V. A. Gritsenko. Comparative evaluation cytokine-like activity of Staphylococcus aureus by methods multiplex and ELISA. Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2018, vol. 21, no. 3, pp. 460-465	doi: 10.31857/S102872 210002428-5 doi: 10.3389/fimmu.20
11		Ahnlide V.K., de Neergaard T., Sundwall M., Ambjörnsson T., Nordenfelt P. A Predictive Model of Antibody Binding in the Presence of IgG-Interacting Bacterial Surface Proteins. Front Immunol. 2021. V. 12: 629103.	21.629103

12		Ballarin L., Franchini A., Ottaviani E., Sabbadin A. Morula Cells as the Major Immunomodulatory Hemocytes in Ascidians: evidences From the Colonial Species Botryllus schlosseri. Biol. Bull. 2001, vol. 201, no. 1. pp. 59–64.	doi: 10.2307/1543526
13		Beck G, Habicht GS. Isolation and characterization of a primitive interleukin-1-like protein from an invertebrate, Asterias forbesi. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(19):7429-33	doi: 10.1073/pnas.83.1 9.7429
14		Beck G., O'Brien R.F., Habicht G.S., Stillman D.L., Cooper E.L., Raftos D.A. Invertebrate cytokines III: Interleukin 1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and	doi: 10.1006/cimm.199 3.1027
15			

16		echinoderm cells. Cell Immunol. 1993, vol. 146, no. 2, pp. 284-99.	doi.org/10.2741/A303
17		Beck G. Macrokinases: invertebrate cytokine-like molecules? Frontiers in Bioscience. 1998, vol. 3, no. 4, pp. 559–569	doi: 10.1073/pnas.1317181111
18		Becker S, Frankel MB, Schneewind O, Missiakas D. Release of protein A from the cell wall of Staphylococcus aureus. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2014, vol. 111, no. 4, pp. 1574–1579.	doi.org/10.4049/jimmunol.133.2.969
		Björck L., Kronvall G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. J Immunol., 1984, vol. 133, issue 2, pp. 969–974	doi: 10.1073/pnas.2016772118

19		Cruz AR, den Boer MA, Strasser J. et al. Staphylococcal protein A inhibits complement activation by interfering with IgG hexamer formation. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2021, vol. 118, no 7: e2016772118	doi: 10.1128/microbiol spec.GPP3-0061- 2019
20		de Jong NWM, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Immune Evasion by Staphylococcus aureus. Microbiol. Spectr., 2019, vol. 7(2): 10.1128/microbiolspec.gpp3-0061-2019. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0061-2019	doi: 10.1128/mBio.005 75-13
21		Falugi F, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O. Role of protein A in the evasion of host adaptive	doi: 10.1016/j.mib.202 3.102420

22		immune responses by Staphylococcus aureus. mBio. 2013;4(5):e00575-13.	doi: 10.1038/s41579-023-00852-y
23		Guerra S, LaRock C. Group A. Streptococcus interactions with the host across time and space. Curr Opin Microbiol. 2024, 77: 102420. doi: 10.1016/j.mib.2023.102420	doi: 10.1111/evo.12171
24		Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, Baines SL, Sharkey LK, Lee JYH, Hachani A, Monk IR, Stinear TP. Staphylococcus aureus host interactions and adaptation. Nat Rev Microbiol. 2023, vol. 21, no. 6, pp. 380-395	doi: 10.1002/mbo3.55
		Hurford A, Day T. Immune evasion and the evolution of molecular mimicry in parasites.	

25		Evolution. 2013;67(10):2889-904 doi: 10.1111/evo.12171	
26		Kolar SL, Ibarra JA, Rivera FE, Mootz JM, Davenport JE, Stevens SM, Horswill AR, Shaw LN.. Extracellular proteases are key mediators of Staphylococcus aureus virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. Microbiologyopen. 2013, vol. 2, no.1 pp. 18– 34doi: 10.1002/mbo3.55	doi: 10.1046/j.1365- 3083.1996.d01- 322.x
27		Legas E., Vaugier G.L., Bousquet F., Bajelan M., Leclerc M. Primitive cytokines and cytokine receptors in invertebrates: the sea star <i>Asterias</i> <i>rubens</i> as a model of study. Scand. J. Immunol., 1996, vol. 44, no. 4, pp. 375-380	doi: 10.1056/NEJM199 808203390806
28			
28			

29		Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. N. Engl. J. Med. 1998, vol. 339, no. 8. pp. 520–532 doi: 10.1056/NEJM199808203390806	doi: 10.3390/microorga nisms11061472
30		Martins YC, Jurberg AD, Daniel-Ribeiro CT. Visiting Molecular Mimicry Once More: Pathogenicity, Virulence, and Autoimmunity. Microorganisms, 2023, vol. 11, no. 6, pp.1472 doi: 10.3390/microorganisms11061472	doi: 10.1016/s1532- 0456(01)00179-x
31		Nair S.V., Burandt M., Hutchinson A. et al. A C-type lectin from the tunicate, Styelaplicata, that modulates cellular activity. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 2001. vol. 129, no. 1, pp. 11-24	doi: 10.1128/IAI.03122 -14

32		O'Halloran DP, Wynne K, Geoghegan JA. Protein A is released into the Staphylococcus aureus culture supernatant with an unprocessed sorting signal. Infect. Immun. 2015, vol. 83, №. 4, pp. 1598–1609	doi: 10.1038/icb.1996.3
33		Raftos D.A. Interactions of tunicate immunomodulatory proteins with mammalian cells. Immunol. Cell. Biol. 1996, vol. 74, no. 1, pp. 26-31 doi: 10.1038/icb.1996.3	doi: 10.3390/pathogens14020185
34		Rasquel-Oliveira FS, Ribeiro JM, Martelossi-Cebinelli G, Costa FB, Nakazato G, Casagrande R, Verri WA. Pathogens, 2025, vol. 4, no. 2, pp. 185	doi.org/10.1038/nprot.2006.468
35			doi: 10.1128/IAI.05075-11

36		Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc. 2006, vol. 1, no. 6, pp. 2856–2860 Smith E.J., Visai L., Kerrigan S.W., Speziale P., Foster T.J. The Sbi Protein Is a Multifunctional Immune Evasion Factor of Staphylococcus aureus. Infect Immun. 2011, vol. 79, no. 9, pp. 3801–3809	doi: 10.1038/nrmicro.2017.27 doi: 10.1038/nrmicro3521
37		Spaan AN, van Strijp JAG, Torres VJ. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. Nat. Rev. Microbiol. 2017, vol. 15, no. 7, pp. 435–447	doi.org/10.1074/mcp.M111.010587

		Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. Nat. Rev. Microbiol. 2015, vol. 13, no. 9, pp. 529–543 doi: 10.1038/nrmicro3521 Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G.A. and Ma, B. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. Molecular & cellular proteomics, 2012, vol. 11, no. 4, pp. M111.010587(1-8) Zhang L., Jacobsson K., Vasi J., Lindberg M., Frykberg L. A second IgG-binding protein in Staphylococcus aureus. Microbiology. 1998, vol.	doi: 10.1099/00221287-144-4-985 doi: 10.1099/13500872-145-1-177
--	--	---	---

		144, Pt 4, pp. 985–991 doi: 10.1099/00221287-144-4-985 Zhang L., Jacobsson K., Strom K., Lindberg M., Frykberg L. Staphylococcus aureus expresses a cell surface protein that binds both IgG and beta2-glycoprotein I. Microbiology, 1999, vol. 145, Pt 1, pp. 177–183	
--	--	--	--