

4. Ip W.K.E., Hoshi N., Shouval D.S. et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*. 2017, 5; 356 (6337): 513-519. doi: 10.1126/science.aal3535.
5. Iwasaki A., Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* 2015 Apr; 16 (4): 343-53. doi: 10.1038/ni.3123.
6. Kaufmann S.H.E. *Novel vaccination strategies*. Wiley-VCH Verlag GmbH Co KGaA. Weinheim, 2004.
7. Kayama H., Takeda K. Functions of innate immune cells and commensal bacteria in gut homeostasis. *J. Biochem.* 2016 Feb; 159 (2): 141-9. doi: 10.1093/jb/mvv119.
8. Okabe Y., Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat. Immunol.* 2016, 17 (1): 9-17. doi: 10.1038/ni.3320.
9. Rodesney C.A., Roman B., Dhamani N. et al. Mechanosensing of shear by *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased levels of the cyclic-di-GMP signal initiating biofilm development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. pii: 201703255. doi: 10.1073/pnas.1703255114.
10. Shteinberg M., Schneer S., Lavon O., Adir Y. Long term treatment with macrolides in chronic lung diseases. *Harefuah*. 2016, 155 (9): 567-571.
11. Vivier E., Medzhitov R. Editorial overview: Innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2016;38:v-vii. doi: 10.1016/j.coi.2015.12.005.
12. Wang A., Huen S.C., Luan H.H. et al. Opposing effects of fasting metabolism on tissue tolerance in bacterial and viral inflammation. *Cell*. 2016, 8; 166 (6): 1512-1525.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.026.

Поступила 31.10.17

Контактная информация: Калиниченко Е.О.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Н.К.Ахматова¹, Е.О.Калиниченко¹, И.Д.Макаренкова², Э.А.Ахматова¹,
А.И.Тухватулин³, Д.Ю.Логун³, Н.А.Михайлова¹*

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ БЕЛКОВ PSEUDOMONAS AERUGINOSA OprF И aTox

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, Владивосток; ³Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Изучение влияния белков OprF и aTox *Pseudomonas aeruginosa* на цитокиновый профиль дендритных клеток мышей. *Материалы и методы.* Дендритные клетки (ДК) получали из клеток костного мозга мышей при культивировании с 20 нг/мл рекомбинантных GM-CSF и IL-4 (Biosource, США). В качестве индуктора созревания использовали белки OprF и aTox *P. aeruginosa* (НИИВС им. И.И.Мечникова). Уровень цитокинов определяли в супернатантах ДК с использованием набора Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad, США). *Результаты.* Оценка профиля и уровня цитокинов, продуцируемых дендритными клетками мышей, демонстрирует высокую активность зрелых ДК. Под воздействием рекомбинантных белков OprF+aTox как несорбированных, так и сорбированных на гидроксиде алюминия, ДК синтезировали большое количество Th-1 цитокинов: IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α, Th-2 цитокинов: IL-4, IL-10, IL-13, регуляторных цитокинов: IL-12, IFN-γ, IL-17A и хемокинов: KC(CXCL1), MIP-1α(CCL3), MIP-1β(CCL4), RANTES(CCL5). В наших исследованиях продемонстрирована возможность получения культуры клеток, состоящей как из зрелых ДК, так и макрофагов из костномозговых предшественников мышей при цитокиновой стимуляции с использованием в качестве индуктора созревания ДК комплекса антигенов *P. aeruginosa*. *Заключение.* Кандидатная вакцина против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox индуцирует продукцию хемокинов и Th-1, Th-2, Th-17 цитокинов дендритными клетками у мышей.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 15—22

Ключевые слова: рекомбинантные белки OprF и aTox *Pseudomonas aeruginosa*, дендритные клетки, Th-1, Th-2, Th-17 цитокины

*N.K.Akhmatova*¹, *E.O.Kalinichenko*¹, *I.D.Makarenkova*², *E.A.Akhmatova*¹,
*A.I.Tukhvatulin*³, *D.Yu.Logunov*³, *N.A.Mikhailova*¹

THE CYTOKINE PROFILE OF MICE DENDRITIC CELLS UNDER THE INFLUENCE OF OprF AND aTox PROTEINS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok; ³Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. To study the effect of OprF and aTox proteins of *Pseudomonas aeruginosa* on the cytokine profile of mice dendritic cells. *Materials and methods.* Dendritic cells (DC) were obtained from bone marrow cells of BALB/c mice when cultured with 20 ng/ml of recombinant GM-CSF and IL-4 (Biosource, USA). OprF and aTox of *P. aeruginosa* were used as the inducer of maturation of DC. The level of cytokines was determined in supernatants of DC using the Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad, USA). *Results.* Evaluation of the profile and level of cytokines produced by dendritic cells of mice demonstrates the high activity of mature DC. Under the influence of recombinant proteins OprF+aTox, both large amounts of Th-1 cytokines were synthesized: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , Th-2 cytokines: IL-4, IL-10, IL-13, regulatory cytokines: IL-12, IFN- γ , IL-17A and chemokines: KC (CXCL1), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5). In our studies, we demonstrated the possibility of obtaining mature dendritic cells from the bone marrow of mice under the influence of a complex of *P. aeruginosa* antigens. *Conclusion.* The candidate *Pseudomonas aeruginosa* vaccine based on its recombinant proteins OprF and aTox induces the production of chemokines and Th-1, Th-2, Th-17 cytokines by mice dendritic cells.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 15–22

Key words: recombinant proteins OprF and aTox *Pseudomonas aeruginosa*, dendritic cells, Th-1, Th-2, Th-17 cytokines

ВВЕДЕНИЕ

Цитокины играют важную роль в развитии иммунного ответа. Они обеспечивают взаимодействие между иммунокомпетентными клетками и выполняют роль эффекторных молекул иммунных реакций. Функция цитокинов многогранна — они являются мессенджерами, обеспечивающими связь иммунной системы с гемопоэзом, с эндокринной и нервной системами [3]. Именно посредством цитокинов иммунная система регулирует многие процессы, связанные с метаболизмом, физиологической и репаративной регенерацией, оказывая поддерживающее влияние на гомеостаз. На цитокиновый баланс огромное влияние оказывает наше окружение, включая различные микробы.

Важной задачей медицинской практики является разработка препаратов, обладающих активирующим влиянием на эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета против *Pseudomonas aeruginosa*. В НИИВС им. И.И. Мечникова ведется разработка кандидатной вакцины против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox (делеционной атоксической формы экзотоксина А), сорбированных на гидроксиде алюминия.

Цель работы — изучение влияния рекомбинантных белков OprF и aTox *P. aeruginosa* на цитокиновый профиль дендритных клеток мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат: 25 мкг OprF, 50 мкг aTox, сорбированные на 75 мкг гидроксида алюминия (НПО «Микроген»). Препарат рекомбинантных белков смешивали в равных весовых долях с гелем гидроксида алюминия, разводили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и проводили сорбцию в течение 12 часов при температуре 4°C.

ДК получали из клеток костного мозга мышей линии BALB/c. Костный мозг мышей гомогенизировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США), трижды осаждали центрифугированием (250 g x 5 мин) и переводили в обогащенную среду культивирования (10⁶ клеток в 1 мл среды RPMI-1640 с добавлением 100 мкг/мл гентамицина сульфата и 10% термоактивированной эмбриональной телячьей сыворотки — ЭТС), содержащую по 20 нг/мл рекомбинантные GM-CSF и IL-4 (Biosource, США). На шестые сутки производили смену среды и в культуру незрелых ДК (нДК) мышей вносили вакцинный препарат по 15 мкл на миллилитр культуральной жидкости. В качестве классического индуктора созревания (позитивный контроль) использовали коммерческий TNF- α (20 нг/мл, Biosours, США).

Уровень цитокинов определяли в супернатантах ДК на 9 сутки культивирования с исследуемыми препаратами на приборе Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader. Исследовали содержание 23 цитокинов и хемокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, Eotaxin (CCL11), G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC (CXCL1), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), TNF- α) с использованием набора Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad, USA) согласно инструкции производителя.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10. Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли в рамках непараметрической базовой статистики с использованием U-критерия Mann-Whitney. Различия рассматривались как значимые при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. и на рис. представлены данные влияния рекомбинантных белков OprF и aTox *P. aeruginosa* на синтез цитокинов в культуре дендритных клеток мышей. TNF- α , используемый в качестве референс-препарата, в меньшей степени индуцировал продукцию цитокинов ДК, чем исследуемые белки синегнойной палочки. Индекс стимуляции Th-1 цитокинов относительно контроля (нДК) колебался от 1,9 до 2,9 уе. Комплекс белков OprF+aTox в 18,7 — 117,9 раза сильнее стимулировал синтез цитокинов по сравнению с нДК, а по сравнению с TNF- α -ДК — в 8,74 — 28,9 раза. Наиболее высокая активность наблюдалась в отношении сорбированных белков (OprF + aTox +AL). Их активность по сравнению с нДК была повышена в 66,5 — 320,5 раза, а TNF- α -ДК — в 18,2 — 110,2 раза.

Из всех исследованных Th-1 цитокинов отмечено максимальное повышение уровня IL-6 и IL-1 α под воздействием OprF + aTox (соответственно 6809,5 пг/мл и 3362,25 пг/мл) и OprF + aTox +AL (10929 пг/мл и 9888 пг/мл).

Показатели Th-2 цитокинов (IL-4, IL-10 и IL-13) повышались не столь активно, как Th-1 (табл.). TNF- α стимулировал в пределах 1,13 — 1,68 уе., OprF+aTox — 1,84 — 3,3 уе., а сорбированные белки — 2,93 — 22,27 уе. по сравнению с нДК. Соответственно эти показатели повышались в 1,62 — 2,19 раза и 2,58 — 7,6 раза под воздействием белков без адьюванта и с ним.

Уровень цитокинов в супернатантах ДК мышей, пг/мл

Th-1 цитокины				
Препарат	IL-1 α	IL-1 β	IL-6	TNF- α
OpGF + aTox	3362,25 \pm 220,25*#	1213,5 \pm 85,5*#	6809,5 \pm 1098,5*#	1600 \pm 66,22*#
OpGF + aTox +AL	9888 \pm 1019*#	4630,75 \pm 120,75*#	10929 \pm 968,75*#	5701 \pm 153,68*#
TNF- α	266,75 \pm 1,25*	42 \pm 5*	598,5 \pm 5,5*	183,13 \pm 4,1*
нДК	92 \pm 4#	22 \pm 1#	57,75 \pm 57,75#	85,7 \pm 0,2#
Th-2 цитокины				
Препарат	IL-4	IL-10	IL-13	
OpGF + aTox	42,22 \pm 0,69*#	716,9 \pm 77,95*#	906 \pm 11,87*#	
OpGF + aTox +AL	147,55 \pm 19,6*#	1293,255 \pm 25,47*#	1438,8 \pm 50,8*#	
TNF- α	19,26 \pm 1,09*	395,97 \pm 4,09*	557,23 \pm 0,2*	
нДК	13,09 \pm 0,1#	235,87 \pm 11,72#	490,89 \pm 7,57#	
Регуляторные цитокины				
Препарат	IL-12(p40)	IL-12(p70)	IFN- γ	IL-17A
OpGF + aTox	10628 \pm 1561*#	1936 \pm 124,7*#	7946,7 \pm 1202,7*#	456,5 \pm 35,5*#
OpGF + aTox +AL	15320 \pm 2635*#	8435 \pm 819*#	8392,5 \pm 176,5*#	785,5 \pm 210*#
TNF- α	3181 \pm 102,5*	265,5 \pm 30,6*	458,7 \pm 17,25*	117,1 \pm 32,3*
нДК	933,5 \pm 14,5#	183 \pm 0,2#	86 \pm 6#	82,7 \pm 4,1#
Хемокины				
Препарат	KC(CXCL1)	MIP-1 α (CCL3)	MIP-1 β (CCL4)	RANTES (CCL5)
OpGF + aTox	7046,7 \pm 1202*#	4738 \pm 137,75*#	5613,75 \pm 378,75*#	14121 \pm 1543*#
OpGF + aTox +AL	8392,5 \pm 176,5*#	1204,5 \pm 176*#	8629,25 \pm 627,75*#	19672 \pm 1332*#
TNF- α	458,75 \pm 17,25*	2777,25 \pm 18,75*	3911,25 \pm 377,75*	796 \pm 89*
нДК	86 \pm 6#	552,75 \pm 66,25#	745,75 \pm 16,75#	164 \pm 10#

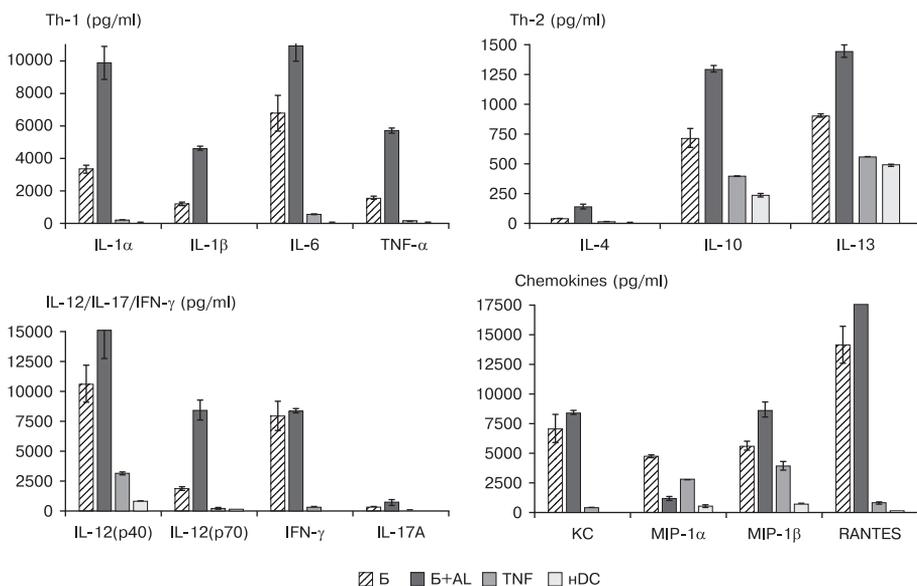
Примечание. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение; достоверность различий по сравнению: * с контролем (нДК), # TNF- α (классический индуктор), P<0,01 (тест Манна-Уитни).

Наиболее высокий уровень выявлен у IL-13, затем у IL-10 под действием OpGF + aTox +AL (соответственно 1438,8 пг/мл и 906 пг/мл) и OpGF + aTox (соответственно 716,9 пг/мл и 716,9 пг/мл).

В отношении регуляторных цитокинов максимально сработали сорбированные белки, затем сами белки, действующие классического индуктора TNF- α на ДК было умеренным. Важным цитокином, участвующим в презентации антигена и запуске адаптивного иммунного ответа является IL-12. Цитокин IL-12 состоит из двух разных субъединиц: IL-12p35 (MW 35 кДа) + IL-12p40 (MW 40 кДа). Считается, что субъединица IL-12p70 является биоактивной и IL-12p40 — регуляторной.

Регуляторный гетеродимер IL-12p40 повышался интенсивнее биоактивного гетеродимера IL-12(p70). Если при введении в культуру OpGF + aTox ДК синтезировали IL-12(p70) в пределах 1936 пг/мл, а OpGF + aTox +AL — 8435 пг/мл, то IL-12(p40) соответственно — 10628 пг/мл и 15320 пг/мл.

В целом, уровень IL-12 под влиянием белков синегнойной палочки повышался в 10,57 — 11,4 раза относительно контроля (нДК) и в 3,34 — 7,29 раза по сравнению с классическим индуктором созревания, а под воздействием сорбированных белков — соответственно в 16,4 — 46 раза и в 4,82 — 31,7 раза.



Цитокиновый профиль дендритных клеток мышей под воздействием белков *Pseudomonas aeruginosa* OprF и aTox.

Б — OprF + aTox; Б+AL — OprF + aTox+ AL; TNF — TNF- α ; нДК — незрелые ДК.

Действие сорбированных и несорбированных белков на продукцию ДК IFN- γ практически было сопоставимым. Они обладали максимальной активностью по сравнению с классическим индуктором созревания (TNF- α), выявлено повышение с 86 пг/мл (нДК) до 458,7 пг/мл (TNF- α -ДК), 7946,7 пг/мл (OprF + aTox) и 8392,5 пг/мл (OprF + aTox + AL).

Отмечены высокий уровень IL-17A под воздействием сорбированных на гидроксиде алюминия белков (785,5 пг/мл) и несорбированных (456,5 пг/мл), активность классического индуктора была умеренной (117,1 пг/мл), всего лишь в 1,42 раза превышала уровень IL-17A в супернатантах нДК.

Изучение продукции ДК хемокинов показало высокую активность OprF + aTox + AL и OprF + aTox по сравнению с TNF- α и контролем. Белки синегнойной палочки повышали уровень продукции KC (CXCL1) в 81,8 и 15,36 раза по сравнению с нДК и TNF- α . Сорбированные белки соответственно — в 97,59 и 18,3 раза. Уровень группы CC хемокинов (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) также был существенно выше ($p < 0,05$) в супернатантах OprF+aTox+AL-ДК и OprF+aTox-ДК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка профиля и уровня цитокинов, продуцируемых дендритными клетками мышей, демонстрирует высокую активность зрелых ДК. Под воздействием рекомбинантных белков OprF+aTox как несорбированных, так и сорбированных на гидроксиде алюминия, ДК синтезировали большое количество Th-1 цитокинов: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , Th-2 цитокинов: IL-4, IL-10, IL-13, регуляторных цитокинов: IL-12, IFN- γ , IL-17A и хемокинов: KC (CXCL1), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5). При этом в культуральной жидкости не выявлено уровня других исследованных цитокинов: IL-2, IL-3, IL-5, IL-9, Eotaxin (CCL11), G-CSF, GM-CSF, что подтверждает присутствие в культуре дифференцированных антигенпрезентирующих клеток.

IL-1 и IL-6 являются мощным фактором дифференцировки В- и Т-лимфоцитов, главным индуктором конечного этапа созревания В-клеток и макрофагов, а также цитотоксических лимфоцитов [12]. Действуя синергически с IL-3, они вызывают дифференцировку стволовых клеток костного мозга. Повышение концентрации TNF- α ведет к усилению выработки IL-6 [13].

Повышенная концентрация IL-12 в культуральной среде генерированных клеток индуцирует образование IFN- γ в Т-лимфоцитах, который, в свою очередь, влияет на приобретение Т-лимфоцитами свойств Th-1 типа [1,2]. IL-12 представляет собой 70 кДа гетеродимерный цитокин, состоящий из двух р35 (35 кДа) и р40 (40 кДа) субъединиц, связанных дисульфидной цепочкой. IL-12 в основном продуцируется фагоцитами (моноцитами/макрофагами и нейтрофилами) в ответ на бактериальные продукты и внутриклеточные паразиты. IL-12 способствует иммунной защите, индуцируя Th-1 иммунный ответ, усиливая цитотоксичность естественных киллеров и продукцию IFN- γ [21]. Субъединица р40 секретируется в виде мономера или гомодимера, часто в 10 — 50-кратном избытке над биологически активным IL-12p70. Предполагается, что IL-12p40 является естественным антагонистом IL-12p70, действуя, по крайней мере частично, путем конкурентного связывания с рецептором IL-12 [16].

Несмотря на то, что уровень IL-12 и IFN- γ варьировал в зависимости от внесенных в культуру ДК препаратов, но в то же время был в десятки раз выше по сравнению с уровнем их в культуре незрелых ДК. Высокий уровень и спектр цитокиновой продукции свидетельствуют о приобретении ДК под воздействием белков синегнойной палочки свойств, необходимых для эффективной презентации антигена и примирования иммунного ответа.

В то же время, в культуре ДК было обнаружено повышенное содержание не только Th-1, но и Th-2 противовоспалительных цитокинов, в частности IL-10, IL-13 и в меньшей мере IL-4. Воспаление характеризуется сложным взаимодействием про- и противовоспалительных медиаторов. Оптимальный баланс их поддерживает гомеостаз, тогда как нарушение баланса, связанное с мощным высвобождением провоспалительных цитокинов, приводит к нежелательным последствиям. Провоспалительные цитокины обладают способностью снижать продукцию провоспалительных цитокинов моноцитами/макрофагами, а также влиять на некоторые из их действий [14].

IL-17A играет центральную роль в защите хозяина от различных патогенов. Он продуцируется не только активированными Т-клетками, но и определенными типами клеток врожденной иммунной системы [8]. В нашем исследовании ДК, созревшие под воздействием рекомбинантных белков OrgF и aTox P. aeruginosa, в 5,5-9,4 раза интенсивнее продуцировали IL-17A, по сравнению с незрелыми ДК.

Активный белок IL-17A функционирует как гомодимер с другими членами семейства IL-17, сигналы, передаваемые через рецептор IL-17, способны индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов. IL-17A регулирует активность NF-карраВ и митоген-активированных протеинкиназ. Этот цитокин может стимулировать экспрессию IL-6 и циклооксигеназы-2 (PTGS2/COX-2), а также усилить образование оксида азота (NO) [20].

Было доказано, что IL-17A в основном играет роль в защите от инфекций, вызванных внеклеточными бактериями и грибами. Первичная функция Th-17 клеток, по-видимому, заключается в контроле микробиоты кишечника, предотвращающей заражение внеклеточными патогенами, такими как

Klebsiella pneumoniae, *Mycoplasma pneumoniae*, *Candida albicans*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* [5]. Также было выявлено, что IL-17A подавляет вирусную инфекцию, в частности грипп, путем стимулирования нейтрофильного воспаления [7].

Было также показано, что антигенспецифические клетки Th-17 распознают консервативные белковые антигены среди различных штаммов *K. pneumoniae* и обеспечивают защиту от серотипа с широким спектром [6]. Кроме того, также было выявлено, что иммунизация пневмококковым антигеном обеспечивала опосредованную IL-17, но не зависящую от антител защиту от *S. pneumoniae* [15]. Функцией этих Т-хелперов является защита от внеклеточных патогенов, которые не могут эффективно элиминироваться Т-хелперами 1 и 2 типов. Кроме того, Th-17 часто ассоциированы с различными аутоиммунными процессами, в том числе и с аллергическими реакциями. В настоящее время накопилось много свидетельств в участии Th-17 в регуляции противоопухолевого иммунного ответа [4, 18].

В наших исследованиях ДК экспрессировали большое количество хемокинов: KC(CXCL1), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5).

Хемокиновый (СХС мотив) лиганд 1 (CXCL1) представляет собой небольшой цитокин, принадлежащий к семейству хемокинов СХС [22, 23]. CXCL1 экспрессируется макрофагами, нейтрофилами и эпителиальными клетками и хемоаттрактантом для нейтрофилов [17]. CXCL1 играет роль в развитии спинного мозга за счет ингибирования миграции предшественников олигодендроцитов и участвует в процессах ангиогенеза, артериогенеза, воспаления, заживления ран и опухолевого генеза [10]. Этот хемокин вызывает его эффекты посредством передачи сигнала через хемокиновый рецептор CXCR2 [19]. Исследования на мышах показали, что CXCL1 уменьшает тяжесть рассеянного склероза и может оказывать нейрозащитную функцию [11].

Все три изоформы связанные с ростом белка, growth-related protein (GRO), представляют собой хемокины СХС, которые могут сигнализировать через хемокиновые рецепторы С-Х-С 1 или 2 (CXCR1/2). GRO-белки — хемоаттрактанты, активирующие нейтрофилы и базофилы. Их основная роль — защита хозяина от полимикробного сепсиса, повышение активности межклеточной адгезионной молекулы 1 (ICAM-1) и миграции нейтрофилов. Белок также активирует митоген-активированные протеинкиназы (МАРК), провоспалительные белки и NF- κ B [9].

Таким образом, ДК, обработанные белками синегнойной палочки, синтезируют широкий набор цитокинов *in vitro*, которые могут индуцировать активацию сложных механизмов межклеточных взаимодействий. В наших исследованиях продемонстрирована возможность получения культуры клеток, состоящей как из зрелых ДК, так и макрофагов из костномозговых предшественников мышей при цитокиновой стимуляции с использованием в качестве индуктора созревания ДК комплекса антигенов *P. aeruginosa*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину. М., Медицина, 2004.
2. Семенов Б.Ф., Ахматова Н.К., Киселевский М.В. и др. Клеточные и молекулярные события при введении поликомпонентной бактериальной вакцины и заражении *S. typhimurium*. Молек. мед. 2005, 4: 48-54.
3. Aliyari S.Z., Ebrahimi K.A., Mehdipour A. et al. Regulation and roles of CD26/DPPIV in hematopoiesis and diseases. Biomed. Pharmacother. 2017 Apr 24; 91: 88-94. doi: 10.1016/j.biopha.
4. Chang S.H., Mirabolfathinejad S.G., Katta H. et al. T helper 17 cells play a critical patho-

- genic role in lung cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2014, 111 (15): 5664-5669. doi:10.1073/pnas.1319051111.
5. Chen K., Kolls J.K. T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Ann. Rev. Immunol.* 2013, 31: 605-633. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100019.
 6. Chen K., McAleer J.P., Lin Y. et al. Th17 cells mediate clade-specific, serotype-independent mucosal immunity. *Immunity*. 2011, 35 (6): 997-1009. doi:10.1016/j.immuni.2011.10.018.
 7. Crowe C.R., Chen K., Pociask D.A. et al. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J. Immunology*. 2009, 183 (8): 5301-5310. doi:10.4049/jimmunol.0900995.
 8. Cua D.J., Tato C.M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews. Immunology*. 2010, 10 (7): 479-489.
 9. Dorner B.G., Scheffold A., Rolph M.S. et al. MIP-1, RANTES, and ATAC lymphotactin function together with IFN- α type 1 cytokines. *PNAS*. 2002, 99 (9): 6181-6186.
 10. Jakovcevski I., Filipovic R., Mo Z. et al. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front. Neuroanat.* 2009, 3: 5. doi: 10.3389/neuro.
 11. Juszczak M., Głabiński A. Th17 cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*. 2009 Oct 23; 63: 492-501.
 12. Ketko A.K., Lin C., Moore B.B. et al. Surfactant protein A binds flagellin enhancing phagocytosis and IL-1 β production. *PLoS One*. 2013, 8 (12): e82680. doi: 10.1371/journal.pone.0082680.
 13. Khan R., Basha A., Goverdhanam R. et al. Attenuation of TNF- α secretion by L-proline-based cyclic dipeptides produced by culture broth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, 25 (24): 5756-5761. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.10.075.
 14. Kumagai J., Hirahara K., Nakayama T. Pathogenic Th cell subsets in chronic inflammatory diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2016, 39 (2):114-123. doi: 10.2177/jsci.39.114.
 15. Lu Y.J., Gross J., Bogaert D. et al. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathogens*. 2008, 4 (9): e1000159. doi:10.1371/journal.ppat.100015.
 16. Moutsopoulos N.M., Zerbe C.S., Wild T. et al. Interleukin-12 and Interleukin-23 blockade in leukocyte adhesion deficiency type 1. *New Engl. J. Med.* 2017 Mar 23; 376 (12):1141-1146. doi: 10.1056/NEJMoal612197.
 17. Planagumà A., Domènech T., Pont M. et al. Combined anti CXC receptors 1 and 2 therapy is a promising anti-inflammatory treatment for respiratory diseases by reducing neutrophil migration and activation. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2015, 34:37-45. doi: 10.1016/j.pupt.2015.08.002.
 18. Shekhar S., Peng Y., Wang S. et al. CD103+ lung dendritic cells (LDCs) induce stronger Th1/Th17 immunity to a bacterial lung infection than CD11b^{hi} LDCs. *Cell Mol. Immunol.* 2017 Feb 13. doi: 10.1038/cmi.2016.68.
 19. Silva R.L., Lopes A.H., Guimarães R.M. et al. CXCL1/CXCR2 signaling in pathological pain: Role in peripheral and central sensitization. *Neurobiol. Dis.* 2017 Jun 3; 105: 109-116. doi: 10.1016/j.nbd.2017.06.001.
 20. Varelias A., Ormerod K.L., Bunting M.D. et al. Acute graft-versus-host disease is regulated by an IL-17-sensitive microbiome. *Blood*. 2017, 129 (15): 2172-2185. doi: 10.1182/blood-2016-08-732628.
 21. Wang Y., Fan K.T., Li J.M. et al. The regulation and activity of interleukin-12. *Front. Biosci. (Schol Ed)*. 2012 Jan 1, 4: 888-899.
 22. Zlotnik A., Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012 May 25; 36 (5): 705-716. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.008.
 23. Zlotnik A., Yoshie O., Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol.* 2006, 7: 243.

Поступила 21.11.17

Контактная информация: Ахматова Н.К.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

А.Г.Киреева^{1,2}, О.В.Калинина^{3,4}, А.М.Киселев³,
Н.И.Брико⁵, Е.В.Глушкова⁵, А.В.Дмитриев^{1,2}

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЭЛЕМЕНТА ICE-emm12, СОДЕРЖАЩЕГО ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ tetM И ermB, СРЕДИ РОССИЙСКИХ И ВЬЕТНАМСКИХ ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ А

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский государственный университет; ³Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова, Санкт-Петербург; ⁴Санкт-Петербургский государственный технологический институт «Технический университет»; ⁵Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Цель. Характеристика и изучение распространенности генетического элемента ICE-emm12, ассоциированного со вспышками стрептококковых заболеваний в Юго-Восточной Азии, среди российских и вьетнамских штаммов СГА. *Материалы и методы.* Изучены 96 штаммов, выделенных в 2007 — 2014 гг. Молекулярно-генетические эксперименты проводили по опубликованным методикам. Полногеномное секвенирование осуществляли по технологии MiSeq. *Результаты.* На основе анализа данных высокопроцессивного секвенирования в геноме вьетнамского штамма V31 идентифицирован фрагмент (61028 п.н.), гомологичный интегративно-конъюгативному элементу ICE-emm12 и содержащий гены устойчивости к MLS-антибиотикам (ermB) и тетрациклину (tetM). Этот элемент обнаружен у 12 (26,1%, типы emm12.0, emm12.22) из 46 вьетнамских штаммов и у 2 (4,0%, типы emm12.0, emm88.2) из 50 российских штаммов. У 13 из 14 штаммов ICE-emm12 интегрирован в структурную область гена РНК-метилтрансферазы, являющегося «горячей точкой» рекомбинаций. Во всех штаммах ICE-emm12 обнаруживался в линейной интегрированной форме и в замкнутой циклической форме, что указывает на возможность его дальнейшего горизонтального переноса. *Заключение.* Обнаружение у российских штаммов ICE-emm12 элемента, способного к переносу генов устойчивости к антибиотикам с учетом активного развития туризма в страны Юго-Восточной Азии указывают на необходимость постоянного молекулярно-эпидемиологического надзора за циркуляцией клонов-возбудителей стрептококковых заболеваний в России.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 23—30

Ключевые слова: стрептококки группы А, мобильные генетические элементы, устойчивость к антибиотикам

A.G.Kireeva^{1,2}, O.V.Kalinina^{3,4}, A.M.Kiselev³,
N.I.Briko⁵, E.V.Glushkova⁵, A.V.Dmitriev^{1,2}

AN OCCURRENCE OF ICE-emm12 GENETIC ELEMENT CONTAINING tetM AND ermB RESISTANCE GENES AMONG RUSSIAN AND VIETNAMESE GROUP A STREPTOCOCCAL STRAINS

¹Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg; ²Saint-Petersburg State University; ³Almazov North-West Federal Medical Research Centre, Saint-Petersburg; ⁴Saint-Petersburg State Technological Institute (Technical University); ⁵Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. Goal of the study is characterization and analysis of an occurrence of ICE-emm12 genetic element associated with streptococcal outbreaks, among Vietnamese and Russian GAS strains. *Materials and methods.* A total of 96 strains isolated in 2007 — 2014 in Moscow, Saint-Petersburg and different provinces of Vietnam were studied. Molecular genetic experiments were done as previously described. Whole genome sequencing was done using MiSeq technology. *Results.* Complete genome sequencing of Vietnamese strain V31 revealed the presence of 61028 bp fragment homologous to integrative and conjugative element ICE-emm12 containing resistance genes