

УДК 616.24-008.8-074

DOI 10.17021/2020.15.4.89.97

© Ю.А. Тюрин, Г.Ш. Исаева,

Р.З. Хайруллин, А.А. Шарифуллина, 2020

СТИМУЛИРУЮЩАЯ РОЛЬ *SplA*-ПРОТЕИНАЗЫ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* В РАЗВИТИИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ТИПА ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ У БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ

Тюрин Юрий Александрович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, заведующий научно-исследовательской лабораторией иммунологии и разработки аллергенов, ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Россия, 420015, г. Казань, Республика Татарстан, ул. Большая Красная, д. 67, тел.: +7-903-314-07-02, e-mail: tyurin.yurii@yandex.ru.

Исаева Гузель Шавхатовна, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по инновационной работе, ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Россия, 420015, г. Казань, Республика Татарстан, ул. Большая Красная, д. 67; заведующая кафедрой микробиологии имени академика В.М. Аристовского, ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 420012, г. Казань, Республика Татарстан, ул. Булгера, д. 49, тел.: +7-917-293-77-23, e-mail: guzelleisaeva@yandex.ru.

Хайруллин Руслан Зуфарович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории иммунологии и разработки аллергенов, ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Россия, 420015, г. Казань, Республика Татарстан, ул. Большая Красная, д. 67, тел.: +7-917-938-36-38, e-mail: khayrullinrz@gmail.com.

Шарифуллина Алсу Акрамовна, кандидат медицинских наук, врач-аллерголог специализированной поликлиники инфекционно-аллергических заболеваний, ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Россия, 420015, г. Казань, Республика Татарстан, ул. Большая Красная, д. 67, тел.: +7-917-255-26-32, e-mail: alsusha74@mail.ru.

Среди аллергенов, участвующих в развитии аллергического ринита, выделяют гликопротеины, содержащиеся не только в частицах вдыхаемого воздуха, но и в продуктах жизнедеятельности назальной микробиоты, колонизирующей слизистую носа пациентов с аллергическим ринитом. Среди протеолитических ферментов существенный интерес представляет группа секретируемых бактериальных сериновых *Spl* протеиназ *Staphylococcus aureus*. Целью исследования стало изучение потенцирования Th2 профиля иммунного ответа на *SplA*-сериновую протеиназу *Staphylococcus aureus* как значимого представителя микробиоты слизистых оболочек верхних дыхательных путей у пациентов с аллергическим ринитом. Гены *spl*-оперона транскрибируются на участке генома размером 5,5 kb. Установлено, что у пациентов с аллергическим ринитом доминируют изоляты *Staphylococcus aureus*, содержащие от 2 до 4 генов *spl*-оперона, а также изоляты, содержащие 1 ген *spl*-оперона (*splA*). Показано, что полученная рекомбинантная *SplA*-протеиназа *Staphylococcus aureus* способна индуцировать высокие уровни цитокинов Th2-типа у пациентов с аллергическим ринитом. *Spl*-протеиназы секрета *Staphylococcus aureus*, идентифицированные масс-спектрометрическим методом, способны связываться с реактивами (IgE-антителами) сыворотки крови пациентов с аллергическим ринитом.

Ключевые слова: *аллергический ринит, Staphylococcus aureus, spl-оперон, SplA-протеиназа, 2D-иммуноблоттинг, протеом.*

STIMULATING ROLE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS *SplA*-PROTEINASE IN THE DEVELOPMENT OF ALLERGIC TYPE OF IMMUNE REACTIONS IN BACTERIOUS CARRIERS WITH ALLERGIC RHINITIS

Tyurin Yuriy A., Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Head of Laboratory, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 67 Bol'shaya Krasnaya St., Kazan, 420015, Russia, Republic of Tatarstan, tel.: +7-903-314-07-02, e-mail: tyurin.yurii@yandex.ru.

Isaeva Guzel Sh., Dr. Sci. (Med.), Professor, Deputy Director, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 67 Bol'shaya Krasnaya St., Kazan, 420015, Russia, Republic of Tatarstan; Head of Department, Kazan State Medical University, 49 Butlerova St., Kazan, 420012, Russia, Republic of Tatarstan, tel.: +7-917-293-77-23, e-mail: guzelleisaeva@yandex.ru.

Khayrullin Ruslan Z., Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 67 Bol'shaya Krasnaya St., Kazan, 420015, Russia, Republic of Tatarstan, tel.: +7-917-938-36-38, e-mail: khayrullinz@gmail.com.

Sharifullina Alsu A., Cand. Sci. (Med.), allergologist, Specialized clinic for infectious and allergic diseases, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 67 Bol'shaya Krasnaya St., Kazan, 420015, Russia, Republic of Tatarstan, tel.: +7-917-255-26-32, e-mail: alsusha74@mail.ru.

Among the allergens involved in the development of allergic rhinitis, glycoproteins are found that are contained not only in the particles of inhaled air, but also in the vital products of the nasal microbiota, which colonizes the nasal mucosa in patients with allergic rhinitis. Among proteolytic enzymes, secreted bacterial serine Spl proteinase of *Staphylococcus aureus* are of significant interest. The study aimed to study the potentiation of the Th2 profile of the immune response to Spl serine proteinase of *Staphylococcus aureus*, as an important representative of the microbiota of the mucous membranes of the upper respiratory tract in patients with allergic rhinitis. Results and discussion. The spl operon genes are transcribed at a 5,5 kb genome site. It has been established that in patients with allergic rhinitis, *Staphylococcus aureus* isolates containing from 2 to 4 spl-operon genes, as well as isolates containing one spl-operon (splA) gene, dominate. It was shown that the resulting recombinant *Staphylococcus aureus* SplA proteinase can induce high levels of Th2-type cytokines in patients with allergic rhinitis. *Staphylococcus aureus* secretoma Spl-proteinases, identified by mass spectrometry, can bind to serum reactins (IgE antibodies) in patients with allergic rhinitis.

Key words: allergic rhinitis, *Staphylococcus aureus*, spl-operon, SplA-proteinase, 2D-immunoblot, proteome.

Введение. Аллергический ринит (АР) является одним из распространенных аллергических заболеваний человека, которое характеризуется наличием клинических симптомов: существенное нарушение носового дыхания, ринорея (слизистые выделения из полости носа), чихание и зуд [6].

В патогенезе АР первоначальное воздействие аллергенов и сенсибилизация запускают клеточный каскад из антигенпрезентирующих клеток (АПК), Т- и В-лимфоцитов, что приводит к формированию пула аллерген-специфических Т-клеток памяти и аллерген-специфических IgE антител (реагинов). В классическом виде повторное воздействие аллергенов приводит к связыванию IgE на тучных клетках, запуская каскад реакций, приводящих к выделению важнейшего медиатора гиперчувствительности – гистамина, и развитию острых симптомов ринита.

Однако среди распространенных аллергенов, участвующих в развитии АР, выделяют гликопротеины, содержащиеся не только в частицах вдыхаемого воздуха, но и в продуктах жизнедеятельности назальной микробиоты, колонизирующей слизистую носа у таких пациентов. Существенную роль в процессе начальной сенсибилизации при АР могут играть протеазы, которые облегчают доступ других аэроаллергенов к АПК слизистой оболочки носа путем расщепления плотных соединений в эпителии дыхательных путей и активации эпителиальных клеток [12].

Среди таких протеолитических ферментов существенный интерес представляют секретируемые бактериальные сериновые Spl протеиназы *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), который является одним из доминирующих таксонов в составе микробиоты слизистой носа у пациентов с различными формами АР.

В ряде экспериментальных исследований было установлено, что сериновые протеиназы Spl-типа могут индуцировать Th2-иммунный ответ (на мышинной модели) при внутритрахеальном введении. При этом происходило развитие аллергического воспаления в легочной ткани и продукция в дренирующих лимфатических узлах специфических IgE и цитокинов Th2-профиля [16, 18].

Многие неизученные компоненты бактериальной микробиоты верхних дыхательных путей могут выступать потенциальными триггерами сдвига иммунного ответа по Th2-типу и, вероятно, способствовать хроническому течению аллергических заболеваний дыхательных путей [11]. Однако роль белков компонентов микробиоты, в частности, протеиназ *Staphylococcus aureus*, в потенцировании Th2-типа иммунного ответа у пациентов с проявлениями респираторной аллергии не изучена.

Цель: изучить потенцирование профиля Th2-типа иммунного ответа на Spl-протеиназы *Staphylococcus aureus* как значимого представителя микробиоты слизистых оболочек верхних дыхательных путей у пациентов с аллергическим ринитом.

Материалы и методы исследования. В исследование вошли 65 пациентов с диагнозом «круглогодичный аллергический ринит» (при сенсибилизации к бытовым аллергенам – клещи домашней пыли, и эпидермальным – перхоть животных) и 65 человек с сезонным АР. В возрастной структуре пациентов с АР преобладали взрослые и подростки (всего 65,7 %), дети составили 34,3 %. Пациенты были разделены также на 2 группы – бактерионосителей с преимущественно интермиттирующим АР (ИАР) (сезонный, острый) и персистирующим АР (ПАР) (круглогодичный, хронический, длительный). Группу контроля составили здоровые бактерионосители *S. aureus* (n = 50 человек) и здоровые *S. aureus*-негативные лица (n = 20 человек), у которых в слизистой носа этот микроорганизм не обнаружен.

Исследованы образцы сыворотки и клетки крови, биоматериал со слизистой носа пациентов с АР и здоровых бактерионосителей *S. aureus* и здоровых лиц – не носителей *S. aureus*.

Работа одобрена Локальным этическим комитетом ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора. Все пациенты дали письменное информированное согласие.

Изучены 180 изолятов *S. aureus*, выделенные со слизистой носа и носоглотки от бактерионосителей: 1) больных АР, 2) здоровых лиц. Титр выделения *S. aureus* составил от 10^4 – 10^6 КОЕ/тампон.

Бактериологическое исследование. Проведено на базе лаборатории микробиологии ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора. Мазки со слизистой носа засеивали на питательные среды: 5 % кровяной агар, желточно-солевой агар и среду Сабуро согласно рекомендациям [3]. Идентификацию штаммов осуществляли программно-аппаратным методом MALDI BioTyrer («BrukerDaltonics», США) при значениях параметра Score 2,3–3,0.

Детекция генов *Spl*-оперона в геноме *S. aureus*. Осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием набора специфических праймеров, представленных для детекции генов секретируемых *Spl*-протеиназ (*splA*–*splF*) по последовательностям и протоколу проведения ПЦР, как указано в работе М. Zdzaliki соавторов (2012) [20]. Праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол» (Россия).

Получение белковых экстрактов *S. aureus*. 2D-электрофорез. Изоляты *S. aureus* культивировали 12 часов в среде 199 с добавлением 1 % глюкозы при 37° С. Культуральную жидкость (КЖ) центрифугировали при 7 000 об/мин для осаждения основной массы клеток при 4° С.

Для извлечения внеклеточных белков *S. aureus* использовали метод осаждения трихлоруксусной кислотой из КЖ. КЖ пропускали через мембранный фильтр (22 мкм), затем к очищенной фракции КЖ вносили 33 мл холодной 100 % трихлоруксусной кислоты, инкубировали на льду 30 мин, белки отделяли центрифугированием 30 мин при 13,2 000 об/мин. Белковый осадок промывали ацетоном. Полученный осадок растворяли в 300 мкл растворителя белка (8 молярная мочевиная; 3,0 % 3-(3-холамидопропил) диметиламмоний-3-пропансульфонат (CHAPS); 2,0 % NP40; 0,2 % амфолитов, pH 3-10; 50 ммоль дитиотреитола; 10 ммоль трис, pH 8,5).

Отбирали аликвоты, содержащие по 150 мкг белка, в первом направлении проводили изоэлектрофокусирование белков (30 мкг белка на стрип) на коммерческих стрипах (immobilized pH gradient (IPG)) 17 см, pH 4–11 («Bio-Rad», США), далее проводили активную регидратацию (12 часов) и изоэлектрофокусировку (8 часов) на приборе «Protean12 IEFcell» («Bio-Rad», США). Во втором направлении проводили градиентный электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-ПААГ, от 9 до 16 %) в течение 5 часов при температуре 10° С. Белки окрашивали флуоресцентным красителем «Flamingo» («Bio-Rad», США) в соответствии с инструкциями производителя. Гели сканировали с использованием сканера «Typhoon 9500» («GE Healthcare», США).

2D-Иммуноблотинг. После проведения 2D-электрофореза разделенные белковые пятна переносили на мембрану PVDF. После блокировки 5,0 % сухим обезжиренным молоком в Трис-НСl буфере (20 ммоль трис-НСl, 137 ммоль NaCl, 0,1 % объем/объем Твин-20 [pH 7,6]), мембраны обрабатывали сывороточными антителами путем инкубации с пулированной сывороткой пациентов с АР в разведении (1 : 10 000). Иммуноглобулины IgG4, IgE определяли вторичными мышиными антителами против IgG4 человека, конъюгированными с пероксидазой («Abscam», Великобритания) в концентрации 0,2 мкг/мл и мышиными моноклональными антителами против IgE человека в концентрации 0,3 мкг/мл, и визуализировали с помощью хемилюминесцентного субстрата с максимальной чувствительностью Super-Signal West Femto («Thermo Fisher Scientific Inc.», США).

Идентификация белка. Белки *S. aureus*, соответствующие зонам детекции IgG4, IgE антител, идентифицировали путем сопоставления 2D-иммуноблотов с окрашенными 2D-гелями. Соответствующие белковые пятна вырезали из геля и идентифицировали с помощью масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрическую идентификацию проводили с помощью масс-спектрометра «MaXis impact» («Bruker», Германия). Полученные пептиды разделяли на хроматографе «UltiMate 3000 UHPLC» («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Элюированные пептиды ввели в масс-спектрометр с помощью источника ионизации «Captive Spray» («Bruker», Германия), диапазон детектируемых масс 50–2200 m/z, режим autoMS/MS. Масс-спектры анализировали с помощью программы «Data Analysis 4.1» («Bruker Daltonics», Германия), по полученным масс-листам белки идентифицировали с помощью программы «Mascot 2.4.0».

Получение рекомбинантной стафилококковой сериновой протеиназы – rSplA-Strep-tag II.

Для получения экспрессионной конструкции использован плазмидный вектор «pASG-IBA2» («IBA GmbH», Германия). Фрагмент гена *splA*, кодирующий зрелую сериновую *SplA* протеиназу без сигнального пептида (SP), амплифицировали с помощью ПЦР из геномной ДНК референс-штамма *S. aureus* 8325-4 и клонировали по протоколу, представленному в руководстве [13]. После инкубации на чашках с LB-агаром, содержащим 5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозид (X-Gal), отбирали трансформанты в виде белых колоний *E. coli* и выделяли плазмидную ДНК. Белковый профиль рекомбинантных клонов анализировали методом SDS-PAGE электрофореза. Очистку продуцируемого рекомбинантного белка осуществляли коммерческой системой «Strep-tag» по рекомендациям, представленным в протоколе руководства [13].

Выделение мононуклеаров периферической крови и их стимуляция рекомбинантной инактивированной протеиназой rSplA-Strep (tag) и белком A (protein A) *S. aureus*. Выделение мононуклеаров крови (МК) проводили из периферической крови здоровых добровольцев (n = 10) и пациентов с АР (n = 10) после информированного согласия. Кровь забирали в пробирки, содержащие антикоагулянт (гепарин), МК выделяли в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077$ г/мл) по методу А. Воуи. Полученную фракцию МК вносили в питательную среду «RPMI-1640» («Gibco», «Thermo Fisher Scientific Inc.», США) до концентрации 2×10^6 клеток/мл. Оценку жизнеспособности клеток проводили на автоматическом анализаторе в соответствии с методикой производителя. Полученную клеточную массу разводили 10,0 мл питательной среды «RPMI 1640» с L-глутамином («Gibco», «Thermo Fisher Scientific Inc.», США), содержащей 200 ед/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина, 1,0 ммоль пирувата натрия, 50 нмоль β -меркаптоэтанола и 5 % человеческой сыворотки. Клетки инкубировали в течение 3 суток во флаконах для культивирования, 75 см³ («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) при 37° С в газовой среде, содержащей 5 % CO₂ при 95 % влажности [2]. В качестве стимуляторов применяли полученную рекомбинантную термоинактивированную *SplA*-протеиназу и белок А (protein A) *S. aureus* («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 5 мкг/мл. Контрольные культуры МК инкубировали в отсутствие бактериальных антигенов. После окончания инкубации МК отделяли центрифугированием, а полученные супернатанты отбирали в объеме 250,0 мкл и сохраняли при температуре -70° С.

Концентрация цитокинов ИЛ-17, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ИНФ- γ , TGF- β , TNF- α . Определяли методом мультиплексного анализа на автоматическом анализаторе «Bio-Plex 200», («Bio-Rad», США) с помощью программы «Bio-PlexManager 5.0» («Bio-Rad», США).

Изменение концентрации цитокинов в супернатантах КЖ культуры клеток (ΔКс) рассчитывали как разницу между концентрацией цитокинов в культуре стимулированных бактериальным антигеном клеток и концентрацией цитокинов в культуре нестимулированных клеток.

Статистическая обработка. Использовали средства параметрической и непараметрической статистики. Статистический анализ проводили в программе «GraphPadPrism 5.0» (2007) («GraphPad Software», США). Расчет 95 % доверительного интервала (95 % CI) осуществляли по методу Р. Ньюкомба (1998) с помощью бесплатного веб-ресурса для статистических вычислений «VassarStats».

Биоинформативный анализ. Поиск гомологичных *SplA*-протеиназе белков проводили, используя ресурс, представляющий собой инструмент для выравнивания и поиска последовательностей на основе базы данных Universal Protein Resource (UniProt) [19].

Результаты исследования и их обсуждение. По клинико-анамнестическим данным установлено, что в группе пациентов с ПАР выявлено преобладание наследственной отягощенности по материнской линии и линиям обоих родителей по сравнению с группой пациентов с ИАР. Результаты исследования иммунологического статуса, включающего в себя цитокиновый профиль, а также клеточный состав риноцитограммы в группах пациентов с АР, представлен в таблице 1.

Таблица 1

Иммунологические особенности пациентов с АР

Критерий	ПАР (n = 66)	ИАР (n = 65)	p
Эозинофилы по риноцитограмме, %	27,65 ± 4,54*	19,5 ± 3,32	0,035
Нейтрофилы по риноцитограмме, %	14,82 ± 2,5	15,9 ± 2,6	0,15
Эозинофилы в периферической крови, %	4,9 ± 0,8	6,3 ± 1,1	0,06
Концентрация иммуноглобулина Е (IgE) в сыворотке периферической крови, МЕ/мл	103,65 ± 12,3*	75,3 ± 6,91	0,025
Концентрация ИЛ-4 в сыворотке крови, пг/мл	0,73 ± 0,03*	0,4 ± 0,05	0,038
Концентрация ИЛ-10 в сыворотке крови, пг/мл	0,58 ± 0,04*	0,36 ± 0,04	0,039
Концентрация TGF-β в сыворотке крови, пг/мл	17000,0 ± 306,0	35900,0 ± 471,0**	0,028

Примечание: M ± SD, t-критерий, различия достоверны: * при p ≤ 0,05 и ** при p ≤ 0,01

Особенностью, выявленной в данном исследовании, является высокий уровень трансформирующего ростового фактора бета-цитокина (TGF-β) с провоспалительной активностью, участвующего в пролиферации, дифференцировке и модуляции иммунного ответа у пациентов с ИАР (сезонный). Установлено, что TGF-β в кооперации с ИЛ-10 способствует развитию T_{рег} лимфоцитов [1]. Уровень TGF-β обратно коррелировал с возрастом пациентов. Чем старше возраст пациентов, тем менее выражен уровень этого цитокина в сыворотке при развитии аллергического воспаления у пациентов с ИАР. TGF-β – один из цитокинов, который обеспечивает подавление иммунных реакций, что особенно выражено при ИАР [4].

У пациентов с ПАР отмечен высокий уровень ИЛ-4 и ИЛ-10 в сыворотке крови по сравнению с ИАР. При ПАР характерен более высокий уровень общего IgE в сыворотке крови.

Распространенность генов *spl*-оперона, кодирующих протеазы в изолятах *S. aureus*. Учитывая, что у 90,6 % пациентов с ПАР и у 68,9 % с ИАР слизистая оболочка носа колонизируется штаммами *S. aureus*, изучили распространенность генов *spl*-оперона, кодирующего протеазы в выделенных штаммах (табл. 2).

Таблица 2

Распространенность генов *spl*-оперона в изолятах *S. aureus*, выделенных от бактерионосителей

Целевые гены <i>spl</i> -оперона	(Абс.ч), % (95 % CI) изолятов <i>S. aureus</i> бактерионосителей		
	Изоляты от пациентов с ПАР (n = 65)	Изоляты от пациентов с ИАР (n = 65)	Изоляты от здоровых бактерионосителей (n = 50)
<i>splA</i>	(50) 77,0 (64,5–86,1)*	(2) 3,0 (0,5–11,6)*	(6) 12,0 (5–25,0)
<i>splB</i>	(35) 54,0 (41,1–61,1)*	(1) 2,0 (0,08–9,4)	(3) 6,0 (1,5–17,5)
<i>splF</i>	(15) 23,0 (14,0–35,5)	н. о.	н. о.
<i>splD-splE</i>	(34) 52,0 (40,0–65,0)*	(13) 20,0 (11,5–32,1)	(13) 25,0 (15,0–41,0)
<i>splB-splC-splE-splF</i>	(37) 57,0 (44,1–69,0)*	(16) 25,0 (15,1–37,1)	н. о.
<i>splA-splF-splC-splB</i>	(51) 79,0 (66,2–87,3)*	(18) 28,0 (18,0–40,4)	н. о.
<i>Spl</i> -негативные	(14) 22,0 (13,0–34,0)	(15) 23,0 (14,0–35,5)	(28) 56 (41,4–70,0)*

Примечание: н.о. – праймер-специфические участки генов не определялись; * – различия достоверны между группами по χ² – тесту

Установлено, что назальные штаммы, содержащие только 1 ген *spl*-оперона (*splA*), доминируют при ПАР, на втором месте по распространенности выявлены изоляты, содержащие только 1 ген *splB*, и на третьем по частоте распространенности – изоляты, содержащие *splF* (табл. 2).

Другая часть изолятов, выделяемых от пациентов с АР, содержала 2 или 4 гена *spl*-оперона. Изолятов, содержащих по 4 гена *spl*-оперона (*splB*, *splC*, *splE*, *splF*), было выделено больше при ПАР, чем при ИАР. Еще одной важной особенностью изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов с АР, была меньшая (почти в 2 раза) частота встречаемости штаммов негативных по генам *spl*-оперона по сравнению со здоровыми бактерионосителями (табл. 2).

Для идентификации *Spl*-протеиназ *S. aureus* были отобраны 2 штамма от бактерионосителей. Связывание сывороточных *IgE* и *IgG4*-антител с внеклеточным протеомом двух изолятов *S. aureus* анализировали с помощью 2D-иммуоблоттинга. Для этого использовали пулированную сыворотку, полученную от 5 пациентов с ПАР и 5 пациентов с ИАР, в которой концентрации сывороточного *IgE* была выше 95 МЕ/мл. Выявлено, что *IgE*-связывание с достаточно выраженным сигналом было расположено в областях, содержащих *Spl*-сериновые протеиназы *S. aureus*. При использовании конъюгата к *IgG4* также установлено связывание иммуноглобулинов этого класса сывороток пациентов к областям, содержащим *Spl*-протеиназы, с таким же выраженным сигналом.

В результате создания генетических конструкций на основе плазмидного вектора, трансформации компетентных клеток *Escherichia coli* был отобран один клон, продуцирующий рекомбинантную протеиназу *SplA* (*rSplA*) с синтетическим пептидом из 8 аминокислот (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), представляющий собой специальный тэг (Strep-tag II). Этот тэг проявляет высокое сродство к специально сконструированному стрептавидину и необходим для очистки и выделения фермента. Молекулярная масса полученной рекомбинантной *SplA*-протеиназы со Strep-tagII по данным SDS-PAGE электрофореза составила 24,0 кДа, расчетная *pI* = 8,0. Проведенный биоинформатический поиск гомологичных *SplA*-протеиназе белков у других бактериальных таксонов показал, что гомологичные в разной степени сериновые протеиназы выявлены у таких бактерий, как *Enterobacter hormaechei* (гомология 80,0 %), *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* (гомология 60,4 %), *Staphylococcus hyicus* (гомология 50,2 %), *Coralloccoccus sp.* (гомология 46,8 %), *Staphylococcus saccharolyticus* (гомология 44,3 %) и *Staphylococcus saprophyticus* (гомология 41,9 %), многие из которых являются секретруемыми и относятся к группе Peptidase_S1B. У вида *Enterobacter hormaechei* выявлен фрагмент сериновой протеазы гомологичный на 80 % (на участке 54 а.о.) *SplA*-протеиназе *S. aureus*. Гомология между *Spl*-протеиназами *S. aureus* составляет от 94,0 до 43,9 % [17].

Особенности цитокинового профиля культур МК периферической крови при стимуляции полученной *rSplA*-протеиназой у пациентов с АР. В ответ на стимуляцию белком А *S. aureus* культуры МК периферической крови здоровых лиц значимо усиливали продукцию Th1/Th17 цитокинов (ИНФ- γ , ИЛ-17) по сравнению со стимуляцией рекомбинантной *Spl*-протеиназой *S. aureus*. Так, концентрация ИНФ- γ при стимуляции культуры МК клеток крови от здоровых доноров рекомбинантной *SplA*-протеиназой составила $46,7 \pm 7,6$ пг/мл, от больных с АР – $8,9 \pm 1,2$ пг/мл. При стимуляции белком А *S. aureus* культуры МК от здоровых лиц продукция ИНФ- γ составила $150,0 \pm 9,6$ пг/мл, а при стимуляции от больных АР – $63,9 \pm 5,6$ пг/мл ($p < 0,05$). Такая же закономерность характерна для концентрации ИЛ-17 в культуре МК. Так, при стимуляции *rSplA*-протеиназой культуры МК здоровых доноров концентрация ИЛ-17 составила $75,0 \pm 4,6$ пг/мл, а при стимуляции МК от больных АР – $23,4 \pm 3,6$ пг/мл. При стимуляции белком А *S. aureus* концентрация ИЛ-17 в стимулированной культуре МК от здоровых лиц достигала $165,0 \pm 5,6$ пг/мл, а в стимулированной культуре МК от больных АР – $68,4 \pm 9,6$ пг/мл. Таким образом, установлено, что стимуляция МК периферической крови пациентов с АР рекомбинантной *Spl*-протеиназой *S. aureus* по сравнению с белком А вызывает значимо меньший Th1/Th17-цитокиновый ответ.

Рекомбинантная *SplA*-протеиназа со Strep-tag II *S. aureus*, в отличие от белка А *S. aureus*, менее активно стимулировала продукцию Th1/Th17 цитокинов в культуре МК периферической крови здоровых лиц, чем белок А, при этом продукцию Th2-цитокинового профиля она активировала в МК клетках более активно (ИЛ-5, ИЛ-13).

При стимуляции культуры МК периферической крови, полученных от больных с АР, рекомбинантной *Spl*-протеиназой установлена продукция преимущественно Th2-цитокинов (ИЛ-13, ИЛ-5, ИЛ-4), чем при стимуляции этих клеток белком А *S. aureus*.

Заключение. Гены *spl*-оперона транскрибируются на участке генома размером 5,5 kb. Экспрессия генов этого оперона у *S. aureus* контролируется системой регуляторных генов *agr*, которая регулирует образование факторов вирулентности. В ранее проведенных исследованиях показано, что для штаммов *S. aureus*, выделенных от человека, характерно наличие в геноме расщепленного *spl*-оперона, в котором могут быть 1–2 гена этих протеаз [8, 17]. В данном исследовании установлено, что при аллергическом рините преобладают изоляты, содержащие от 2 до 4 генов *spl*-оперона,

а также изоляты, содержащие 1 ген *spl*-оперона (*splA*), например, выделенные у пациентов с персистирующим аллергическим ринитом. Многие из бактерий, имеющих гомологичные *SplA*-протеиназные ферменты, относящиеся к группе Peptidase_S1B, являются условно-патогенными для человека, а роль других в патологии пока не изучена, некоторые из них встречаются в почве и окружающей среде.

Открытие того факта, что *spl*-протеазы как белки секрета *S. aureus* могут вызывать аллергические реакции, является особо примечательным свойством, поскольку естественный адаптивный иммунный ответ к большинству антигенов стафилококков в основном имеет Th1/Th17-направленность [14, 21]. Белок А *S. aureus* является типичным антигеном в этом отношении, как было подтверждено в данном исследовании. Цитокин ИЛ-17 имеет важное значение для бактериального клиренса *S. aureus* у бактерионосителей. Отмечено, что пациенты с генетическими дефектами, ухудшающими Th17-ответ, имеют рецидивирующие тяжелые инфекции, вызванные *S. aureus*, следовательно, отклонение иммунного ответа от Th1/Th17 в сторону Th2-цитокинного ответа может способствовать бактериальной персистенции *S. aureus* [7, 9, 10, 15].

Многие бактерии выделяют протеиназы, которые участвуют в расщеплении белка хозяина для получения питательных веществ. Открытие аллергенной природы *Spl*-протеиназ *S. aureus* ставит вопрос о том, может ли индуцируемое ими отклонение иммунного ответа от защитного Th1/Th17-типа и смещение его у пациентов с аллергическим ринитом в сторону Th2-иммунного ответа способствовать реализации дополнительной функции этих ферментов, заключающейся в перенастройке местного иммунного ответа для повышения выживаемости и персистенции. Данный механизм манипуляций иммунным ответом показан при изучении антигенов *Aspergillus fumigatus*, известного аллергена дыхательных путей человека [5].

До представленного исследования систематическое изучение потенциально аллергенных белков *S. aureus* на группе пациентов с аллергическими ринитами не проводилось. В данной работе показано, что *Spl*-протеиназы *S. aureus* выступают в роли бактериальных аллергенов у пациентов с аллергическим ринитом и обладают аллергенными свойствами, потому что они могут индуцировать синтез IgE и способны вызывать Th2-тип цитокинового ответа в человеческих мононуклеарах, а изоляты, выделенные от бактерионосителей со слизистой носоглотки, в составе генома содержат вариабельное количество генов *spl*-оперона.

Список литературы

1. Просекова, Е. В. Структура цитокинового профиля назального секрета при аллергическом рините у детей / Е. В. Просекова, С. Ю. Нетесова, Н. Р. Забелина, В. А. Сабыныч // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2014. – № 1. – С. 38–41.
2. Семикина, Е. Л. Методические возможности оценки активации лимфоцитов *in vitro* / Е. Л. Семикина, Т. В. Родионова, Р. Ш. Закиров, Е. Г. Филянская, Н. А. Маянский // Иммунология. – 2014. – Т. 35, № 2. – С. 85–88.
3. Степанова, Э. Д. Модификация питательных средств для выделения и идентификации условно патогенных микроорганизмов / Э. Д. Степанова, Ю. Р. Юносова, М. М. Меджидов, В. Г. Горелова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – № 2. – С. 117–119.
4. Тюрин, Ю. А. Клинико-иммунологические особенности пациентов с различными формами аллергических ринитов при сенсibilизации микробными, бытовыми и пыльцевыми аллергенами / Ю. А. Тюрин, И. Д. Решетникова, А. А. Шарифуллина, Е. В. Агафонова, Р. С. Фассахов // Практическая медицина. – 2018. – № 6. – С. 211–217.
5. Balenga, N. A. A fungal protease allergen provokes airway hyper-responsiveness in asthma / N. A. Balenga, M. Klichinsky, Z. Xie, E. C. Chan, M. Zhao, J. Jude, M. Laviolette, R. A. Panettieri Jr, K. M. Druey // Nat. Commun. – 2015. – № 6. – P. 6763. doi: 10.1038/ncomms7763.
6. Bousquet, J. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) / J. Bousquet // Allergy. – 2008. – Vol. 63. – P. 1052–1055. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x.
7. Bröker, B. M. Immune control of *Staphylococcus aureus*-regulation and counter-regulation of the adaptive immune response / B. M. Bröker, S. Holtfreter, I. Bekeredjian-Ding // Int. J. Med. Microbiol. – 2014. – Vol. 304, № 2. – P. 204–214. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.11.008.
8. Gimza, B. D. Mapping the global network of extracellular protease regulation in *Staphylococcus aureus* / B. D. Gimza, M. I. Larias, B. G. Budny, L. N. Shaw // mSphere. – 2019. – Vol. 4, № 5. – P. e00676–19. doi:10.1128/mSphere.00676-19.
9. Cho, J. S. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice / J. S. Cho, E. M. Pietras, N. C. Garcia, R. I. Ramos, D. M. Farzam, H. R. Monroe, J. E. Magorien, A. Blauvelt, J. K. Kolls, A. L. Cheung, G. Cheng, R. L. Modlin, L. S. Miller // J. Clin. Invest. – 2010. – Vol. 120, № 5. – P. 1762–1773. doi: 10.1172/JCI40891.

10. Cook, M. C. Primary immune deficiencies affecting lymphocyte differentiation : lessons from the spectrum of resulting infections / M. C. Cook, S. G. Tangye // *Int. Immunol.* – 2009. – Vol. 21, № 9. – P. 1003–1011. doi: 10.1093/intimm/dxp076.
11. Davis, M. F. Staphylococcus aureus colonization is associated with wheeze and asthma among US children and young adults / M. F. Davis, R. D. Peng, M. C. McCormack, E. C. Matsui // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2015. – Vol. 135, № 3. – P. 811–813. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.052.
12. Eifan, A. O. Pathogenesis of rhinitis / A. O. Eifan, S. R. Durham // *Clin. Exp. Allergy.* – 2016. – Vol. 46, № 9. – P. 1139–1151. doi: 10.1111/cea.12780.
13. Expression and purification of proteins using Strep-tag and/or 6xHistidine-tag. A comprehensive manual – 2005, Version PR02–0007 / IBA, BioTagnology, Headquarters IBA. – Göttingen : IBA GmbH, 2005. – 62 p.
14. Kolata, J. B. The fall of a dogma? Unexpectedly high T cell memory response to Staphylococcus aureus in humans/ J. B. Kolata, I. Kühbandner, C. Link, N. Normann, C. H. Vu, L. Steil, C. Weidenmaier, B. M. Bröker // *J. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 212, № 5. – P. 830–838. doi: 10.1093/infdis/jiv128.
15. Milner, J. D. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome / J. D. Milner, J. M. Brenchley, A. Laurence, A. F. Freeman, B. J. Hill, K. M. Elias, Y. Kanno, C. Spalding, H. Z. Elloumi, M. L. Paulson, J. Davis, A. Hsu, A. I. Asher, J. O'Shea, S. M. Holland, W. E. Paul, D. C. Douek // *Nature.* – 2008. – Vol. 452, № 7188. – P. 773–776. doi: 10.1038/nature06764.
16. Popowicz, G. M. Functional and structural characterization of Spl proteases from Staphylococcus aureus / G. M. Popowicz, G. Dubin, J. Stec-Niemczyk, A. Czarny, A. Dubin, J. Potempa, T. A. Holak // *Journal of molecular biology.* – 2006. – Vol. 358, № 1. – P. 270–279.
17. Reed, S. B. Molecular characterization of a novel Staphylococcus aureus serine protease operon / S. B. Reed, C. A. Wesson, L. E. Liou, W. R. Trumble, P. M. Schlievert, G. A. Bohach, K. W. Bayles // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69, № 3. – P. 1521–1527. doi: 10.1128/IAI.69.3.
18. Stentzel, S. Spls are pacemakers of allergic airway reactions to Staphylococcus aureus / S. Stentzel, A. Teufelberger, M. Nordengrün, J. Kolata, F. Schmidt, K. van Crombruggen, S. Michalik, J. Kumpfmüller, S. Tischer, T. Schweder, M. Hecker, S. Engelmann, U. Völker, O. Krysko, C. Bachert, B. M. Bröker // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2016. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.045.
19. The Uni Prot Consortium, UniProt: a worldwide hub of protein knowledge // *Nucleic Acids Research.* – 2019. – Vol. 47, Issue D1. – P. D506–D515. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения : 01.04.2020.
20. Zdzalik, M. Prevalence of genes encoding extracellular proteases in Staphylococcus aureus – important targets triggering immune response in vivo / M. Zdzalik, A. Y. Karim, K. Wolski, P. Buda, K. Wojcik, S. Brueggemann, P. Wojciechowski, S. Eick, A. M. Calander, I. M. Jonsson, M. Kubica, K. Polakowska, J. Miedzobrodzki, B. Wladyka, J. Potempa, G. Dubin // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2012. – Vol. 66, № 2. – P. 220–229. doi: 10.1111/j.1574–695X.2012.01005.x.
21. Zielinski, C. E. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β / C. E. Zielinski, F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia, F. Sallusto // *Nature.* – 2012. – Vol. 484 (7395). – P. 514–518. doi: 10.1038/nature10957. PMID: 22466287.

References

1. Prosekova E. V., Netesova S. Yu., Zabelina N. R., Sabynych V. A., Sotnichenko S. A. Struktura tsitokinovogo profilya nazal'nogo sekreta pri allergicheskom rinite u detey [The cytokine profile structure of nasal secretion in children's allergic rhinitis]. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal [Pacific Medical Journal]*, 2014, no. 1, pp. 38–41.
2. Semikina E. L., Rodionova T. V., Zakirov R. Sh., Filyanskaya E. G., Mayanskiy N. A. Metodicheskie vozmozhnosti otsenki aktivatsii limfotsitov in vitro [Methodical possibilities of evaluating the activation of lymphocytes in vitro]. *Immunologiya [Immunology]*, 2014, vol. 35, no. 2, pp. 85–88.
3. Stepanova E. D., Yunosova Yu. R., Medzhidov M. M., Gorelova V. G. Modifikatsiya pitatel'nykh sredstv dlya vydeleniya i identifikatsii uslovnopatogennykh mikroorganizmov [Modifications of nutrient media for the isolation and identification of clinically important opportunistic microorganisms]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*, 2012, no. 2, pp. 117–119.
4. Tyurin Yu. A., Reshetnikova I. D., Sharifullina A. A., Agafonova E. V., Fassakhov R. S. Kliniko-immunologicheskie osobennosti patsientov s razlichnymi formami allergicheskikh rinitov pri sensibilizatsii mikrobnymi, bytovymi i pyl'tsevymi allergenami [Clinical and immunological features of patients with various forms of allergic rhinitis under sensitization by microbial, domestic and pollen allergens]. *Prakticheskaya meditsina [Practical medicine]*, 2018, no. 6, pp. 211–217.
5. Balenga N. A., Klichinsky M., Xie Z., Chan E. C., Zhao M., Jude J., Laviolette M., Panettieri R. A. Jr., Druey K. M. A fungal protease provokes airway hyper-responsiveness in asthma. *Nat Commun*, 2015, no. 6, p. 6763. doi: 10.1038/ncomms7763.
6. Bousquet J. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). *Allergy*, 2008, vol. 63, pp. 1052–1055. doi: 10.1111/j.1398–9995.2007.01620.x.

7. Bröker B. M., Holtfreter S., Bekeredjian–Ding I. Immune control of *Staphylococcus aureus*-regulation and counter-regulation of the adaptive immune response. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2014, vol. 304, no. 2, pp. 204–214. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.11.008.
8. Gimza B. D., Larias M. I., Budny B. G., Shaw L. N. Mapping the global network of extracellular protease regulation in *Staphylococcus aureus*. *mSphere*, 2019, vol. 4, no. 5, pp. e00676-19. doi:10.1128/mSphere.00676-19.
9. Cho J. S., Pietras E. M., Garcia N. C., Ramos R. I., Farzam D. M., Monroe H. R., Magorien J. E., Blauvelt A., Kolls J. K., Cheung A. L., Cheng G., Modlin R. L., Miller L. S. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J. Clin. Invest.*, 2010, vol. 120, no. 5, pp. 1762–1773. doi: 10.1172/JCI40891.
10. Cook M. C., Tangye S. G. Primary immune deficiencies affecting lymphocyte differentiation: lessons from the spectrum of resulting infections. *Int. Immunol.*, 2009, vol. 21, no. 9, pp. 1003–1011. doi: 10.1093/intimm/dxp076.
11. Davis M. F., Peng R. D., McCormack M. C., Matsui E. C. *Staphylococcus aureus* colonization is associated with wheeze and asthma among US children and young adults. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, vol. 135, no. 3, pp. 811–813. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.052.
12. Eifan A. O., Durham S. R. Pathogenesis of rhinitis. *Clin. Exp. Allergy*, 2016, vol. 46, no. 9, pp. 1139–1151. doi: 10.1111/cea.12780.
13. Expression and purification of proteins using Strep-tag and/or 6xHistidine-tag. A comprehensive manual - 2005, Version PR02–0007. IBA, BioTagnology, Headquarters IBA, Göttingen, IBA GmbH, 2005, 62 p.
14. Kolata J. B., Kühbandner I., Link C., Normann N., Vu C. H., Steil L., Weidenmaier C., Bröker B. M. The fall of a dogma? Unexpectedly high T cell memory response to *Staphylococcus aureus* in humans. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 212, no. 5, pp. 830–838. doi: 10.1093/infdis/jiv128.
15. Milner J. D., Brenchley J. M., Laurence A., Freeman A. F., Hill B. J., Elias K. M., Kanno Y., Spalding C., Elloumi H. Z., Paulson M. L., Davis J., Hsu A., Asher A. I., O’Shea J., Holland S. M., Paul W. E., Douek D. C. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*, 2008, vol. 452, no. 7188, pp. 773–776. doi: 10.1038/nature06764.
16. Popowicz G. M., Dubin G., Stec-Niemczyk J., Czarny A., Dubin A., Potempa J., Holak T. A. Functional and structural characterization of Spl proteases from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.*, 2006, vol. 358, no. 1, pp. 270–279.
17. Reed S. B., Wesson C. A., Liou L. E., Trumble W. R., Schlievert P. M., Bohach G. A., Bayles K. W. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, no. 3, pp. 1521–1527. doi: 10.1128/IAI.69.3.
18. Stentzel S., Teufelberger A., Nordengrün M., Kolata J., Schmidt F., van Crombruggen K., Michalik S., Kumpfmüller J., Tischer S., Schweder T., Hecker M., Engelmann S., Völker U., Krysko O., Bachert C., Bröker B. M. Spl proteases are pacemakers of allergic airway reactions to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.045.
19. The UniProt Consortium, UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research.* – 2019, vol. 47, Is. D1, no. 08, pp. D506–D515. Available at : <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049> (accessed 01 April 2020).
20. Zdzalik M., Karim A. Y., Wolski K., Buda P., Wojcik K., Brueggemann S., Wojciechowski P., Eick S., Calander A. M., Jonsson I. M., Kubica M., Polakowska K., Miedzobrodzki J., Wladyka B., Potempa J., Dubin G. Prevalence of genes encoding extracellular proteases in *Staphylococcus aureus* – important targets triggering immune response in vivo. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2012, vol. 66, no. 2, pp. 220–229. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.01005.x.
21. Zielinski C. E., Mele F., Aschenbrenner D., Jarrossay D., Ronchi F., Gattorno M., Monticelli S., Lanzavecchia A., Sallusto F. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature*. 2012, vol. 484 (7395), pp. 514–518. doi: 10.1038/nature10957. PMID: 22466287.

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология
(медицинские науки)

УДК 547.853.3:615.015

DOI 10.17021/2020.15.4.97.107

© А.А. Цибизова, И.Н. Тюренков,

А.А. Озеров, О.А. Башкина, М.А. Самотруева, 2020

РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ХИНАЗОЛИНА С АЛЬФА-НАФТИЛЬНЫМ РАДИКАЛОМ НА УРОВЕНЬ TNF- α , IL-6 И IL-10 В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ

Цибизова Александра Александровна, кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: 8-908-619-88-54, e-mail: sasha3633@yandex.ru.