

Антицитокиновая активность и продукция цитокиноподобных веществ грамотрицательными бактериями, выделенными от больных с инфекционно-воспалительными послеоперационными осложнениями

О.А. Пашина¹, Т.М. Пашкова¹, О.Л. Карташова¹, Л.О. Фомина², В.А. Гриценко¹

¹ Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения, Оренбург, Россия;

² Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения, Екатеринбург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. На течение и исход любого инфекционно-воспалительного процесса влияют цитокины, которые обеспечивают регуляцию иммунного ответа макроорганизма при внедрении возбудителя. В то же время установлено, что микроорганизмы разных видов обладают антицитокиновой активностью (АЦА), т.е. способны инактивировать те или иные про- и противовоспалительные цитокины, а также могут продуцировать цитокиноподобные вещества (ЦПВ). Указанные особенности бактериальных патогенов способны повлиять на локальный цитокиновый баланс в инфицированных тканях макроорганизма, повышая риск возникновения инфекционно-воспалительных осложнений.

Цель. Характеристика АЦА и способности к продукции ЦПВ у грамотрицательных бактерий, выделенных от больных с инфекционно-воспалительными послеоперационными осложнениями.

Материалы и методы. В работе использовано 42 клинических изолята грамотрицательных бактерий разных видов (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *C. braakii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*), выделенных от больных с инфекционно-воспалительными послеоперационными осложнениями. Выделение чистых культур бактерий осуществляли бактериологическим методом, а их видовую идентификацию проводили по прямому белковому профилированию с помощью масс-спектрометра MALDI TOF MS серии Microflex LT (BrukerDaltonics, Германия) и программного обеспечения MaldiBioTyper 3.0. АЦА бактерий в отношении интерлейкина-4 (IL-4), IL-8, IL-1Ra, фактора некроза опухоли альфа (TNF-α). Продукцию ЦПВ определяли методом иммуноферментного анализа. Уровни АЦА и продукции ЦПВ рассчитывали с учётом доли инактивации или продукции соответствующих цитокинов в опыте относительно контроля, выражая в пг/мл.

Результаты. Охарактеризованы межродовые, межвидовые и внутривидовые/межштаммовые различия в распространённости и выраженности АЦА в отношении IL-1Ra, IL-4, IL-8 и TNF-α, а также продукции ЦПВ соответствующих цитокинов у клинических изолятов грамотрицательных микроорганизмов (представители семейства *Enterobacteriaceae* и группа неферментирующих бактерий), выделенных при инфекционно-воспалительных осложнениях у больных хирургического профиля.

Выявленная вариабельность по распространённости и выраженности АЦА и способности к продукции определённых ЦПВ вносит существенный вклад в формирование фенотипического разнообразия и, очевидно, патогенного потенциала возбудителей инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов хирургического профиля. Изученные клинические штаммы грамотрицательных бактерий были способны как ингибировать противовоспалительные цитокины (IL-1Ra и IL-4) и провоспалительные иммуномодуляторы (IL-8 и TNF-α), так и продуцировать в среду вещества, сходные по действию с этими регуляторными молекулами. Такое разнообразие цитокин-ассоциированных характеристик патогенов способно внести существенные «помехи» в цитокин-опосредованную регуляцию воспалительного процесса инфекционной этиологии.

Заключение. Результаты проведённого исследования в перспективе могут быть использованы для разработки алгоритмов прогнозирования риска развития инфекционно-воспалительных осложнений при оперативных вмешательствах.

Ключевые слова: послеоперационные осложнения; грамотрицательные бактерии; антицитокиновая активность; продукция цитокиноподобных веществ.

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Пашинина О.А., Пашкова Т.М., Карташова О.Л., Фомина Л.О., Гриценко В.А. Антицитокиновая активность и продукция цитокиноподобных веществ грамотрицательными бактериями, выделенными от больных с инфекционно-воспалительными послеоперационными осложнениями // Цитокины и воспаление. 2024. Т. 21, № 3. С. 00–00. DOI: 10.17816/CI636439 EDN: WXTLEQ

Статья получена: 24.09.2024

Статья одобрена: 29.04.2025

Опубликована online: 19.05.2025

Accepted for publication

Anti-cytokine activity and production of cytokine-like substances by gram-negative bacteria isolated in postoperative complication

Olga A. Pashinina¹, Tatiana M. Pashkova¹, Olga L. Kartashova¹, Lyudmila O. Fomina², Viktor A. Gritsenko¹

¹ Orenburg Federal Research Center of the Ural Branch, Orenburg, Russia;

² Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Yekaterinburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The course and outcome of any infectious and inflammatory process is influenced by cytokines, which provide regulation of the immune response of the macroorganism when the pathogen is introduced. At the same time, it has been established that microorganisms of different species have anti-cytokine activity (ACA), that is, they are capable of inactivating certain pro- and anti-inflammatory cytokines, and can also produce cytokine-like substances (CLS). The above-mentioned features of bacterial pathogens can affect the local cytokine balance in infected tissues of the macroorganism, increasing the risk of infectious and inflammatory complications.

AIM: The aim of the study was to characterize the anti-cytokine activity (ACA) and the ability to produce cytokine-like substances (CLS) in gram-negative bacteria isolated from patients with infectious and inflammatory postoperative complications.

MATERIALS AND METHODS: The study used 42 clinical isolates of gram-negative bacteria of different species (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *C. braakii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*) isolated from patients with infectious and inflammatory postoperative complications. The isolation of pure bacterial cultures was carried out by the bacteriological method, and their species identification was carried out by direct protein profiling using the MALDI TOF MS Microflex LT series mass spectrometer (BrukerDaltonics, Germany) and the MaldiBioTyper 3.0 software. Bacterial ACA for IL-4, IL-8, IL-1RA, TNF α and CLS production were determined by ELISA. The levels of ACA and CLS production were calculated taking into account the proportion of inactivation or production of the corresponding cytokines in the experiment relative to the control, expressed in pg/ml.

RESULTS: Intergenerational, interspecific and intraspecific/interstitial differences in the prevalence and severity of ACA in relation to IL-1RA, IL-4, IL-8 and TNF α , as well as the production of CLS of the corresponding cytokines in clinical isolates of gram-negative microorganisms (representatives of the *Enterobacteriaceae* family and a group of non-fermenting bacteria) isolated in infectious and inflammatory complications in surgical patients, were characterized.

The revealed variability in the prevalence and severity of ACA and the ability to produce certain CLS makes a significant contribution to the formation of phenotypic diversity and, obviously, the pathogenic potential of pathogens of infectious and inflammatory complications in surgical patients. The studied clinical strains of gram-negative bacteria were able, on the one hand, to inhibit both anti-inflammatory cytokines (IL-1RA and IL-4) and pro-inflammatory immunomodulators (IL-8 and TNF α), on the other hand, to produce substances similar to these regulatory molecules in the medium. Such a variety of cytokine-associated characteristics of pathogens can significantly "interfere" with the cytokine-mediated regulation of the inflammatory process of infectious etiology.

CONCLUSION: The results of the study can be used in the future to develop algorithms for predicting the risk of infectious and inflammatory complications during surgical interventions.

Keywords: postoperative complications, gram-negative bacteria, anticytokine activity,

production of cytokine-like substances.

TO CITE THIS ARTICLE:

Pashinina OA, Pashkova TM, Kartashova OL, Fomina LO, Gritsenko VA. Anti-Cytokine Activity and Production of Cytokine-Like Substances by Gram-Negative Bacteria Isolated in Postoperative Complications. *Cytokines and Inflammation*. 2024;21(3):??-??. DOI: 10.17816/CI636439 EDN: WXTLEQ

Submitted: 24.09.2024

Accepted: 29.04.2025

Published online: 19.05.2025

Accepted for publication

ОБОСНОВАНИЕ

Микроорганизмы, в частности грамотрицательные бактерии разной видовой принадлежности (прежде всего, энтеробактерии и неферментирующие бактерии), вызывающие послеоперационные инфекционно-воспалительные осложнения у больных в хирургических стационарах, обладают не только факторами патогенности, но и персистентными свойствами, которые обеспечивают защиту возбудителей от эффекторов иммунитета макроорганизма и способствуют реализации их патогенного потенциала при инфицировании органов и тканей [1]. Кроме того, известно, что на течение и исход любого инфекционно-воспалительного процесса влияют цитокины, которые обеспечивают регуляцию иммунного ответа макроорганизма при внедрении возбудителя [2]. В то же время установлено, что микроорганизмы разных видов обладают антицитокиновой активностью (АЦА), т. е. способны инактивировать те или иные про- и противовоспалительные цитокины [3–5], а также могут продуцировать цитокиноподобные вещества (ЦПВ), которые детектируются в супернатантах бульонных культур бактерий с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа по определению в исследуемом биоматериале цитокинов человека и животных [6]. Природа таких ЦПВ в настоящее время пока не известна, а расшифровка их молекулярной структуры находится в фазе активного изучения, в т. ч. авторами настоящей работы. Что касается АЦА бактерий, то она может быть связана как со способностью некоторых из них связывать цитокины хозяина и реагировать на них, ускоряя свой рост и образование биопленки, а также изменяя выраженность у патогенов вирулентных свойств [7–9], так и с продукцией микроорганизмами пептидаз, специфически или неспецифически расщепляющих белковые молекулы отдельных цитокинов [10].

Как бы то ни было, нельзя исключить, что указанные особенности бактериальных патогенов способны повлиять на локальный цитокиновый баланс в инфицированных тканях макроорганизма, повышая риск возникновения инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов хирургического профиля.

ЦЕЛЬ

Характеристика АЦА и способности к продукции ЦПВ у грамотрицательных бактерий разных видов, выделенных при послеоперационных осложнениях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименты *in vitro* были включены клинические штаммы грамотрицательных бактерий следующих видов: *Escherichia coli* (n=6), *Klebsiella pneumoniae* (n=6), *Citrobacter freundii* (n=6), *C. braakii* (n=6), *Pseudomonas aeruginosa* (n=6), *P. putida* (n=6), *Stenotrophomonas maltophilia* (n=6), изолированных от больных с послеоперационными осложнениями.

Выделение чистых культур бактерий осуществляли бактериологическим методом, а их видовую идентификацию проводили по прямому белковому профилированию с помощью масс-спектрометра MALDI TOF MS серии Microflex LT (BrukerDaltonics, Германия) и программного обеспечения MaldiBioTyper 3.0.

АЦА бактерий в отношении ряда цитокинов — противовоспалительных [интерлейкин-1 рецепторный антагонист (IL-1Ra) и IL-4] и провоспалительных [IL-8 и фактор некроза опухоли альфа (TNF-α)] — определяли методом иммуноферментного анализа по известной методике [7] с использованием наборов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Для этого в центрифужные пробирки вносили по 150 мкл в соотношении 1:1 взвеси бактерий (по стандарту мутности МакФарланда — 0,5 ед.), культивируемых на мясопептонном агаре в течение 24 ч при 37 °С, и растворы соответствующих цитокинов; пробы инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. После инкубации реакцию останавливали на холоде (+4 °С), центрифугировали с охлаждением при 3000 об/мин в течение 15 мин при +4 °С и отбирали супернатанты. В качестве контроля использовали растворы цитокинов с добавлением физиологического раствора NaCl. Конечная концентрация цитокинов в опытных и контрольных пробах составляла для IL-1Ra — 416,6 пг/мл, IL-4 — 28,6 пг/мл, IL-8 — 62,5 пг/мл и TNF-α — 41,6 пг/мл. Результаты учитывали на фотометре StatFax 2100 (США) при длине волны 450 нм. Уровни АЦА и продукции ЦПВ рассчитывали с учётом доли инактивации или продукции соответствующих цитокинов в опыте относительно контроля, выражая в пг/мл. Наличие у бактерий данных признаков регистрировали, если их выраженность превышала 5 пг/мл.

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью критерия Стьюдента (Statistica 6.0; StatSoft, Inc.). Результаты представлены в виде средних значений и ошибок средних ($M \pm m$), полученных не менее чем в трёх независимых экспериментах. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные экспериментальные данные свидетельствовали о том, что отдельные изученные штаммы микроорганизмов двух групп (энтеробактерии и неферментирующие грамотрицательные бактерии — НГОБ), выделенные от больных с послеоперационными осложнениями, были способны инактивировать цитокины — IL-1Ra, IL-4, IL-8 и TNF- α (табл. 1), а также продуцировать цитокиноподобные вещества, соответствующие указанным цитокинам (табл. 2). При этом наблюдалась межродовая и межвидовая, а также внутривидовая (межштаммовая) вариабельность изученных грамотрицательных бактерий как по частоте встречаемости, так и по выраженности указанных свойств.

Табл. 1. Распространённость и выраженность антицитокиновой активности у штаммов грамотрицательных бактерий разных видов, выделенных при послеоперационных осложнениях

Table 1. Prevalence and severity of anti-cytokine activity in gram-negative bacterial strains of various species isolated during postoperative complications

Группа и вид бактерий (n — количество штаммов)	Частота встречаемости (абс/%) и выраженность АЦА (пг/мл) у грамотрицательных бактерий в отношении определённых цитокинов*			
	IL-1Ra	IL-4	IL-8	TNF- α
Энтеробактерии (n=24), в т. ч.:	6/25,0 356,2 $\pm$ 7,9	16/66,7 25,9 $\pm$ 2,2	4/16,7 61,3 $\pm$ 2,6	8/33,3/ 31,7 $\pm$ 3,1
<i>Escherichia coli</i> (n=6)	2/33,3 303,3 $\pm$ 10,4	2/33,3 25,5 $\pm$ 2,4	2/33,3 62,0 $\pm$ 1,4	4/66,7 25,4 $\pm$ 3,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6)	4/66,7 409,1 $\pm$ 5,5	4/66,7 26,6 $\pm$ 1,8	н/в	н/в
<i>Citrobacter freundii</i> (n=6)	н/в	4/66,7 24,8 $\pm$ 2,5	н/в	2/33,3 40,5 $\pm$ 4,4
<i>Citrobacter braakii</i> (n=6)	н/в	6/100,0 26,7 $\pm$ 2,2	2/33,3 60,7 $\pm$ 3,9	2/33,3 25,6 $\pm$ 2,6
НГОБ** (n=18), в т. ч.:	2/11,1 329,5 $\pm$ 6,8	16/88,9 27,2 $\pm$ 2,1	7/38,9 45,3 $\pm$ 3,1	10/55,6 39,3 $\pm$ 3,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=6)	н/в	6/100,0 26,2 $\pm$ 2,2	3/50,0 38,7 $\pm$ 2,8	6/100,0 38,9 $\pm$ 2,4
<i>Pseudomonas putida</i> (n=6)	2/33,3 329,5 $\pm$ 6,8	6/100,0 28,0 $\pm$ 2,4	н/в	2/33,3 40,9 $\pm$ 3,4
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=6)	н/в	4/66,7 25,5 $\pm$ 1,7	4/66,7 51,9 $\pm$ 3,4	2/33,3 38,2 $\pm$ 4,2
Всего (n=42)	8/19,0 342,8 $\pm$ 7,3	32/76,2 26,5 $\pm$ 2,1	11/26,2 53,3 $\pm$ 2,8	18/42,9 35,5 $\pm$ 3,2

Примечание здесь и в табл. 2. * В числителе указана частота встречаемости штаммов с данным признаком (абс/‰); в знаменателе — уровень выраженности данного признака (пг/мл); н/в — признак не выявлен; ** НГОБ — неферментирующие грамотрицательные бактерии; АЦА — антицитокиновая активность.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что отдельные клинические штаммы микроорганизмов изученных родов/видов из обеих групп (энтеробактерии и НГОБ) были способны инактивировать те или иные цитокины. Чаще всего они проявляли АЦА в отношении противовоспалительного цитокина IL-4 (76,2%), причём распространённость этого признака среди неферментирующих грамотрицательных бактерий (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *S. maltophilia*) была несколько выше, чем у энтеробактерий — *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii* и *C. braakii* (88,9 против 66,7%, $p < 0,05$). Способность инактивировать другие цитокины (IL-1Ra, IL-8 и TNF- α) у клинических изолятов грамотрицательных бактерий встречалась значительно реже с градиентом: 19,0–26,2–42,9% соответственно. При этом у штаммов бактерий определённых видов/родов в анализируемых выборках отсутствовала АЦА в отношении некоторых цитокинов. Так, например, у изолятов микроорганизмов рода *Citrobacter*, а также видов *P. aeruginosa* и *S. maltophilia* не выявлена АЦА в отношении IL-1Ra, у штаммов *K. pneumoniae*, *C. freundii* и *P. putida* не обнаружена способность инактивировать IL-8, а в выборке *K. pneumoniae* отсутствовали культуры с АЦА в отношении TNF- α .

Не меньшее разнообразие демонстрировали изученные штаммы грамотрицательных бактерий по уровню выраженности АЦА. У микроорганизмов, проявлявших способность инактивировать цитокины, относительно широкие диапазоны варьирования уровней АЦА наблюдались в отношении инактивации IL-1Ra и IL-8 (303,3–409,1 и 38,7–62,0 пг/мл соответственно), тогда как в отношении ингибирования IL-4 и TNF- α уровни АЦА были более гомогенными (24,8–28,0 и 25,4–40,9 пг/мл соответственно).

Анализ выраженности способности к инактивации цитокинов у грамотрицательных микроорганизмов изученных групп выявил более высокие значения АЦА у энтеробактерий, чем у НГОБ в отношении IL-1Ra (356,2 $\pm$ 7,9 против 329,5 $\pm$ 6,8 пг/мл, $p < 0,05$) и IL-8 (61,3 $\pm$ 2,6 против 45,3 $\pm$ 3,1 пг/мл; $p < 0,01$); по другим иммуномодуляторам межгрупповые отличия АЦА указанных бактерий были не достоверны.

Среди энтеробактерий и НГОБ наблюдались межродовые и межвидовые различия по отдельным вариантам АЦА. Так, у *K. pneumoniae* в сравнении с *E. coli* существенно выше была АЦА в отношении IL-1Ra (409,1 $\pm$ 5,5 против 303,3 $\pm$ 10,4 пг/мл; $p < 0,01$), у *C. freundii* выше был уровень АЦА в отношении TNF- α , чем у *C. braakii* (40,5 $\pm$ 4,4 против 25,6 $\pm$ 2,6 пг/мл; $p < 0,05$), а *S. maltophilia* проявляли более высокую АЦА в отношении IL-8, чем *P. aeruginosa* (51,9 $\pm$ 3,4 против 38,7 $\pm$ 2,8 пг/мл; $p < 0,05$).

Необходимо подчеркнуть, что представленные в табл. 1 абсолютные значения АЦА указывали на то, что грамотрицательные бактерии способны инактивировать от 61 до 99% цитокинов, находящихся в реакционной смеси с микроорганизмами. Кроме того, следует отметить, что сочетанную АЦА в отношении нескольких цитокинов проявляли 8,0% штаммов энтеробактерий и 22,2% изолятов НГОБ, при этом «ядром» таких комбинаций выступала способность бактерий инактивировать IL-4, а наиболее частыми сочетаниями были АЦА против двух цитокинов — IL-4 + TNF- α (14%) и IL-4 + IL-8 (14%). Ассоциированная АЦА в отношении трёх цитокинов (IL-4 + IL-8 + TNF- α) встречалась только у штаммов *P. aeruginosa* в 50% случаев.

В совокупности эти результаты указывают на значительную внутри- и межвидовую вариабельность грамотрицательных микроорганизмов (энтеробактерии и НГОБ) по частоте встречаемости и уровню выраженности у них способности к инактивации отдельных цитокинов, что, по-видимому, может отражаться на характере течения вызванных ими инфекционно-воспалительных процессов, в т. ч. за счёт изменения локального цитокинового баланса в инфицированных тканях.

При этом нельзя исключить, что определённый вклад в локальный цитокиновый статус могут вносить вегетирующие в поражённых тканях возбудители, способные продуцировать в среду цитокиноподобные вещества. Полученные нами данные указывали на продукцию таких веществ некоторыми клиническими штаммами грамотрицательных бактерий, выделенными от больных с инфекционно-воспалительными осложнениями (табл. 2).

В частности, установлено, что 66,7% изолятов энтеробактерий разных видов (кроме *K. pneumoniae*) и 88,9% штаммов НГОБ являлись продуцентами IL-1Ra-подобных веществ, тогда как в этих же группах удельный вес бактериальных культур, продуцирующих другие ЦПВ (соответствующие IL-4, IL-8 и TNF- α), был значительно меньше (11,1–22,2%) и зависел от их видовой/родовой принадлежности. Так, в группе энтеробактерий среди штаммов *E. coli* отсутствовали продуценты IL-4- и IL-8-подобных веществ, изоляты *C. freundii* не секретировали в среду IL-8- и TNF- α -подобные вещества, а культуры *C. braakii* — ЦПВ, соответствующие всем трём указанным цитокинам (IL-4, IL-8 и TNF- α). Что касается НГОБ, то способность к продукции IL-4-, IL-8- и TNF- α -подобных веществ не обнаруживалась у бактерий вида *P. aeruginosa*, тогда как продуцентами IL-8- и TNF- α -подобных веществ являлись 66,7% штаммов *P. putida*, а 33,3% изолятов *S. maltophilia* секретировали в среду вещества, подобные IL-4.

Таблица 2. Распространённость и выраженность способности к продукции цитокиноподобных веществ у штаммов грамотрицательных бактерий разных видов, выделенных при инфекционно-воспалительных послеоперационных осложнениях

Table 2. Prevalence and severity of the ability to produce CLV in gram-negative bacterial strains of various species isolated from infectious and inflammatory postoperative complications

Группа и вид бактерий (n — количество штаммов)	Частота встречаемости (абс/%) и уровень выраженности (пг/мл) способности к продукции ЦПВ у грамотрицательных бактерий*			
	IL-1-Ra	IL-4	IL-8	TNF- α
Энтеробактерии (n=24), в т. ч.:	16/66,7	4/16,7	6/25,0	8/33,3
	165,7 $\pm$ 5,2	11,5 $\pm$ 0,5	14,2 $\pm$ 1,2	16,1 $\pm$ 0,9

<i>Escherichia coli</i> (n=6)	4/66,7 364,5±11,5	н/в	н/в	2/33,3 26,3±1,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6)	н/в	2/33,3 8,3±0,6	6/100 14,2±1,2	6/100 5,9±0,3
<i>Citrobacter freundii</i> (n=6)	6/100,0 55,0±1,8	2/33,3 14,7±0,4	н/в	н/в
<i>Citrobacter braakii</i> (n=6)	6/100 77,5±2,4	н/в	н/в	н/в
НГОБ** (n=18), в т. ч.:	16/88,9 62,6±4,3	2/11,1 7,9±0,5	4/22,2 28,7±1,3	4/22,2 11,9±0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=6)	6/100,0 58,9±3,4	н/в	н/в	н/в
<i>Pseudomonas putida</i> (n=6)	4/66,7 67,1±5,2	н/в	4/66,7 28,7±1,3	4/66,7 11,9±0,7
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=6)	6/100,0 61,7±4,2	2/33,3 7,9±0,5	н/в	н/в
Всего (n=42)	32/76,2 114,15±4,7	6/14,3 9,7±0,5	10/23,8 21,5±1,2	12/28,6 12,1±0,7

Выраженность способности к продукции отдельных ЦПВ грамотрицательными бактериями существенно колебалась в зависимости от групповой и видовой принадлежности микроорганизмов (см. табл. 2). Так, средний уровень продукции IL-1Ra-подобных веществ у энтеробактерий в два раза превышал таковой у НГОБ (165,7±5,2 против 62,6±4,3 пг/мл соответственно; $p < 0,05$) и был максимальным у штаммов *E. coli* (364,5±11,5 пг/мл), в то время как у изолятов *C. freundii* и *C. braakii* он составлял 55,0±1,8 и 77,5±2,4 пг/мл соответственно ($p < 0,05$), а у штаммов НГОБ разных видов/родов он варьировал в относительно узком диапазоне — 58,9–67,1 пг/мл ($p > 0,05$).

Эти данные указывают на межродовую/межвидовую и внутривидовую (межштамбовую) вариабельность грамотрицательных микроорганизмов (энтеробактерии, НГОБ) по распространённости и выраженности у них способности к продукции определённых ЦПВ, соответствующих таким цитокинам человека, как IL-1Ra, IL-4, IL-8 и TNF- α , что, наряду с описанной выше вариабельностью этих бактерий по АЦА, вносит существенный вклад в формирование фенотипического разнообразия и, очевидно, патогенного потенциала возбудителей инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов хирургического профиля.

ОБСУЖДЕНИЕ

Если взглянуть на всю совокупность представленных данных, то можно обнаружить, что в структуру клинических штаммов энтеробактерий и НГОБ входили изоляты, проявляющие АЦА по отношению к определённому цитокину или продуцирующие ЦПВ, соответствующие ему, а также культуры, не обладавшие указанными признаками (рис. 1). Причём удельный вес таких вариантов бактериальных штаммов зависел как от их групповой принадлежности (энтеробактерии/НГОБ), так и от варианта анализируемого цитокина.

Кроме того, следует отметить, что изученные клинические штаммы грамотрицательных бактерий были способны, с одной стороны, ингибировать как противовоспалительные цитокины (IL-1Ra и IL-4), так и провоспалительные иммуномодуляторы (IL-8 и TNF- α), с другой стороны — продуцировать в среду вещества, подобные этим регуляторным молекулам. Можно предположить, что такое разнообразие цитокин-ассоциированных характеристик патогенов способно внести существенные «помехи» в цитокин-опосредованную регуляцию воспалительного процесса инфекционной этиологии.

Грамотрицательные бактерии (прежде всего, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter spp.* и *P. aeruginosa*) относятся к группе приоритетных возбудителей послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений [11, 12]. В этой связи всестороннее изучение их патогенных биопрофилей как на фено-, так и генотипическом уровнях является актуальной задачей медицинской микробиологии. Особый интерес вызывает вопрос о взаимодействии бактерий с иммунорегуляторными факторами и, в частности, про- и противовоспалительными цитокинами, которые принимают непосредственное участие в развитии патологического процесса в инфицированных органах и тканях [2].

В настоящее время накапливается всё больше данных о том, что клинические штаммы микроорганизмов разной таксономической принадлежности способны инактивировать/нейтрализовать различные цитокины, а также продуцировать во внеклеточное пространство ЦПВ. Сегодня известно, что клинические штаммы грамположительных кокков (стафилококки [6] и энтерококки [3]) и грибов рода *Candida* [4] обладают АЦА в отношении ряда

про- и противовоспалительных цитокинов, а также способны продуцировать в среду культивирования различные ЦПВ, т. е. обладают «процитокиновой активностью». Кроме того, АЦА была выявлена и у грамотрицательных бактерий, в частности у клинических уроизолятов *E. coli*, выделенных из мочи пациентов с мочекаменной болезнью [5]. Так, было установлено, что все уроштаммы *E. coli*, изолированные от больных с послеоперационными инфекционно-воспалительными осложнениями, характеризовались широкой распространённостью и выраженной экспрессией АЦА в отношении провоспалительных (IL-6, IL-8 и TNF- α) и/или противовоспалительных (IL-2, IL-10) цитокинов. При анализе у кишечных микросимбионтов способности к инаktivации цитокинов было выявлено, что фекальные штаммы *K. pneumoniae* проявляли высокую АЦА в отношении IL-10 и менее выраженную в отношении TNF- α и IFN- γ , тогда как экзометаболиты псевдомонад проявляли высокую способность снижать в культуральной среде уровни оппозитных цитокинов TNF- α , IFN γ и IL-10 [13].

Антицитокиновая активность грамотрицательных бактерий в отношении ряда цитокинов может быть связана с продукцией ими различных цитокин-связывающих белков. Так, например, бактерии вида *P. aeruginosa* способны синтезировать каналобразующий белок — неспецифический порин OprF, который специфически связывается с интерфероном гамма (IFN- γ). Это, в свою очередь, приводит к увеличению экспрессии бактериями лектина типа I *P. aeruginosa* (PA-I) — одного из основных факторов их вирулентности. Данный лектин участвует в адгезии микроорганизмов к эпителиальным клеткам лёгких человека, развитии биопленок и восприятию сигналов межклеточной коммуникации бактерий (quorum sensing, QS) [14–16]. У некоторых грамотрицательных бактерий выявлены так называемые белки, ориентированные во внеклеточное пространство. В частности, у *E. coli* охарактеризован секретируемый в среду растворимый миметический белок А рецептора интерлейкинов (IgmA), обладающий структурным сходством с внеклеточными лиганд-связывающими доменами рецепторов цитокинов человека IL-2R и IL-4R, а также в меньшей степени — с IL-10R, и способный взаимодействовать с этими цитокинами (IL-2, IL-4 и IL-10) [17]. Третью группу молекулярных кандидатов на инаktivацию микроорганизмами цитокинов составляют бактериальные белки, сходные с рецепторами цитокинов человека и в ряде случаев проявляющие цитокиноподобную активность [18]. Авторами с помощью биоинформатического анализа обнаружено определённое их структурное и функциональное сходство с цитокинами человека и животных. Позже было показано, что у *E. coli* С-концевой периплазматический домен OprF35 демонстрировал некоторое структурное сходство с фактором ингибирования миграции макрофагов (MIF), который представляет собой широко экспрессируемый провоспалительный цитокин [19].

Здесь следует отметить, что бактериальные белки из последней группы могут иметь отношение к регистрируемым в супернатантах бактериальных культур цитокиноподобным веществам. Однако степень их структурного и функционального сходства/тождества предстоит определить в дальнейших исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе проведён своеобразный скрининг и охарактеризованы межродовые, межвидовые и внутривидовые/межштаммовые различия в распространённости и выраженности АЦА в отношении IL-1Ra, IL-4, IL-8 и TNF- α , а также продукции ЦПВ соответствующих цитокинов у клинических изолятов грамотрицательных микроорганизмов (представители семейства *Enterobacteriaceae* и группа неферментирующих бактерий), выделенных при инфекционно-воспалительных осложнениях у больных хирургического профиля. При этом следует признать, что патогенетическое значение наличия и экспрессии указанных свойств у возбудителей послеоперационных осложнений пока не имеет весомой доказательной базы, что требует проведения модельных и клинко-лабораторных исследований, в т. ч. направленных на выявление взаимосвязей анти- и процитокиновых характеристик бактериальных изолятов с клиническими проявлениями патологического процесса, характером его течения и вариантами исхода.

Результаты таких исследований могут быть перспективны для разработки алгоритмов диагностики и прогнозирования риска развития послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений при хирургических вмешательствах.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. О.А. Пашина — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста и редактирование; Т.М. Пашкова — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста и редактирование; О.Л. Карташова — написание текста и редактирование; Л.О. Фомина — сбор и обработка материала; В.А. Гриценко — написание текста и редактирование. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Протокол исследования был одобрен на заседании локального комитета по биоэтике Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (выписка № 4 от 14.06.2022).

Источники финансирования. Исследования были проведены в рамках госзадания FUUG — 2022-0007 «Исследование симбиотических систем про- и эукариот в биологии и медицине».

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Редакционная политика в отношении совместного использования данных к настоящей работе не применима, новые данные не собирали и не создавали.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions. Pashinina Olga A. - concept and design of research, collection and processing of material, writing and editing, Pashkova Tatiana M. - concept and design of research, collection and processing of material, writing and editing, Kartashova Olga L. - writing and editing; Fomina Lyudmila O. - collection and processing of material, Gritsenko Viktor A. - writing and editing. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Ethics approval. The research protocol was approved at the meeting of the local bioethics committee of the Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Extract No. 4 dated 14.06.2022).

Funding sources. The research was carried out within the framework of the state task FUUG - 2022-0007 “Study of symbiotic systems of pro- and eukaryotes in biology and medicine”.

Disclosure of interests. The authors have no relationships, activities or interests for the last three years related with for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality. In creating this work, the authors did not use previously published information (text, illustrations, data).

Data availability statement. The editorial policy regarding data sharing does not apply to this work, and no new data was collected or created.

Generative AI. Generative AI technologies were not used for this article creation.

Provenance and peer-review. This paper was submitted to the journal on an unsolicited basis and reviewed according to the usual procedure. Two external reviewers, a member of the editorial board, and the scientific editor of the publication participated in the review.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Mrugova TM, Gritsenko VA, Ageevets VA, et al. Biological properties and genetic characteristics gram-negative bacteria isolated from patients in a multidisciplinary hospital.

EDN: WXTLEQ

- Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the RAS.* 2019;(3):11. doi: 10.24411/2304-9081-2019-13027 EDN: QOWSGK
2. Simbirtsev AS. Cytokines — classification and biologic functions. *Cytokines and Inflammation.* 2004;3(2):16–22. EDN: HRRMZV
 3. Kochkina E, Sycheva M, Pashkova T, Kartashova O. Anti-cytokine activity of genus enterococcus bacteria isolated from animals. *Bulletin of the BSSA named after V.R. Filippov.* 2019;57(4):25–31. doi: 10.34655/bgsha.2019.57.4.004 EDN: YYELFD
 4. Pashinina OA, Pashkova TM, Kartashova OL, Morozova NV. Anticytokine activity of candida spp. and their ability to produce cytokine-like substances. *Russian Journal of Immunology.* 2023;26(1):57–62. doi: 10.46235/1028-7221-1150-AAO EDN: OLWVPU
 5. Popova LP, Pashkova TM, Morozova NV, et al. Anticytokine activity of e.coli strains, isolated from urine with urolithiasis. *Russian Journal of Immunology.* 2019;13(2–1(22)):474–476. doi: 10.31857/S102872210006935-3 EDN: TBUUHU
 6. Kartashova OL, Pashkova TM, Pashinina OA, Morozova NV. Anticytokine activity and the ability to produce cytokine-like substances of staphylococci isolated from the prostatic secretions in men with symptoms of urogenital infection. *Russian Journal of Immunology.* 2021;24(2):257–260. doi: 10.46235/1028-7221-995-AAA EDN: HNHYJS
 7. Porat R, Clark BD, Wolff SM, Dinarello CA. Enhancement of growth of virulent strains of *Escherichia coli* by interleukin-1. *Science.* 1991;254(5030):430–432. doi: 10.1126/science.1833820 EDN: BKQLMT
 8. Högbom M, Ihalin R. Functional and structural characteristics of bacterial proteins that bind host cytokines. *Virulence.* 2017;8(8):1592–1601. doi: 10.1080/21505594.2017.1363140 EDN: VDYMBG
 9. Mahdavi J, Royer PJ, Sjölander HS, et al. Pro-inflammatory cytokines can act as intracellular modulators of commensal bacterial virulence. *Open Biol.* 2013;3(10):130048. doi: 10.1098/rsob.130048
 10. Bukharin OV, Perunova NB, Chaynikova IN, et al. Anti-cytokine activity of microorganisms. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2011;88(4):56–61. EDN: TLFYYV
 11. Kutsevalova OY, Rozenko DA, Kozel YY, et al. Etiological characteristics in causative agents of infectious complications in cancer patients. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2022;67(5–6):30–38. doi: 10.37489/0235-2990-2022-67-5-6-30-38 EDN: NXHHET
 12. Kutsevalova OYu, Kozel YuYu, Panova NI, Rozenko DA. Pathogens of infectious complications and problems of their resistance today. *Advances in medical mycology.* 2023;24:116–120. (In Russ.) EDN: SUTQJG
 13. Bondarenko TA, Danilova EI, Chainikova IN, et al. Antipeptide activity of intestinal microsymbionts for the state of intestinal homeostasis estimation. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal.* 2018;12(3):222–226. doi: 10.31857/S102872210002385-8 EDN: YYCPET
 14. Wu L, Estrada O, Zaborina O, et al. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science.* 2005;309(5735):774–777. doi: 10.1126/science.1112422
 15. Sugawara E, Nestorovich EM, Bezrukov SM, Nikaido H. *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. *J Biol Chem.* 2006;281(24):16220–16229. doi: 10.1074/jbc.M600680200
 16. Fito-Boncompote L, Chapalain A, Bouffartigues E, et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun.* 2011;79(3):1176–1186. doi: 10.1128/IAI.00850-10
 17. Moriel DG, Heras B, Paxman JJ, et al. Molecular and structural characterization of a novel *escherichia coli* interleukin receptor mimic protein. *mBio.* 2016;7(2):e02046. doi: 10.1128/mBio.02046-15
 18. Dunin-Horkawicz S, Kopec KO, Lupas AN. Prokaryotic ancestry of eukaryotic protein networks mediating innate immunity and apoptosis. *J Mol Biol.* 2014;426(7):1568–1582. doi: 10.1016/j.jmb.2013.11.030
 19. Högbom M, Ihalin R. Functional and structural characteristics of bacterial proteins that bind host cytokines. *Virulence.* 2017;8(8):1592–1601. doi: 10.1080/21505594.2017.1363140 EDN: VDYMBG

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS' INFO

*** Пашина Ольга Александровна**,
канд. биол. наук;
адрес: Россия, 460000, Оренбург, ул.
Пионерская, д. 11;
ORCID: 0000-0001-9944-3095;
eLibrary SPIN: 9638-7336;
e-mail: olga25mikro@mail.ru

Пашкова Татьяна Михайловна, д-р биол.
наук;
ORCID: 0000-0001-8075-8249;
eLibrary SPIN: 5146-6190;
e-mail: pashkova070782@mail.ru

Карташова Ольга Львовна, д-р биол.
наук;
ORCID: 0000-0002-1487-7546;
eLibrary SPIN: 9315-1070;
e-mail: labpersist@mail.ru

Фомина Людмила Олеговна;
ORCID: 0000-0001-8130-8979;
eLibrary SPIN: 2678-7689;
e-mail: fomina454@yandex.ru

Гриценко Виктор Александрович, д-р
мед. наук;
ORCID: 0000-0002-2086-5170;
eLibrary SPIN: 7107-1300;
e-mail: vag59@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

*** Olga A. Pashinina**, Cand. Sci. (Biology);
address: 11 Pionerskaya st, Russia, Orenburg,
460000;
ORCID: 0000-0001-9944-3095;
eLibrary SPIN: 9638-7336;
e-mail: olga25mikro@mail.ru

Tatiana M. Pashkova, Dr. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0001-8075-8249;
eLibrary SPIN: 5146-6190;
e-mail: pashkova070782@mail.ru

Olga L. Kartashova, Dr. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-1487-7546;
eLibrary SPIN: 9315-1070;
e-mail: labpersist@mail.ru

Lyudmila O. Fomina;
ORCID: 0000-0001-8130-8979;
eLibrary SPIN: 2678-7689;
e-mail: fomina454@yandex.ru

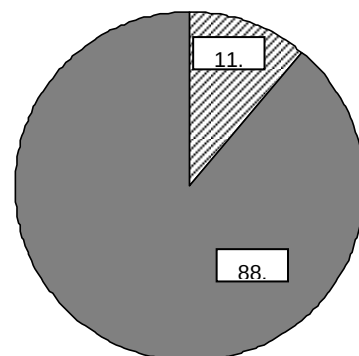
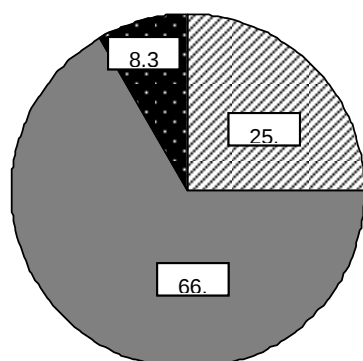
Viktor A. Gritsenko, MD, Dr. Sci.
(Medicine);
ORCID: 0000-0002-2086-5170;
eLibrary SPIN: 7107-1300;
e-mail: vag59@mail.ru

Энтеробактерии

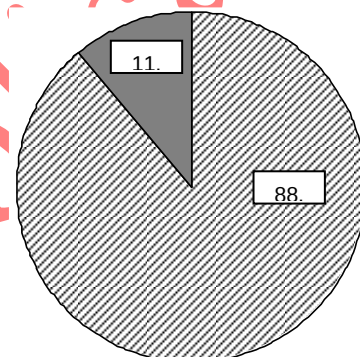
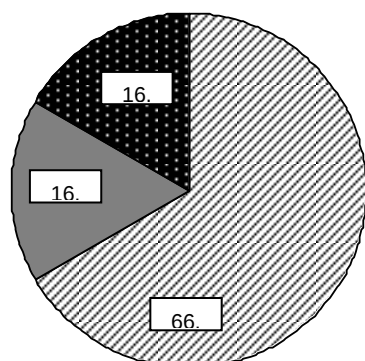
НГОВ

Цитокины

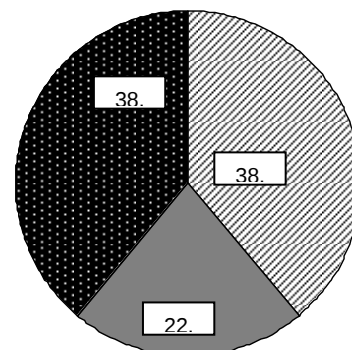
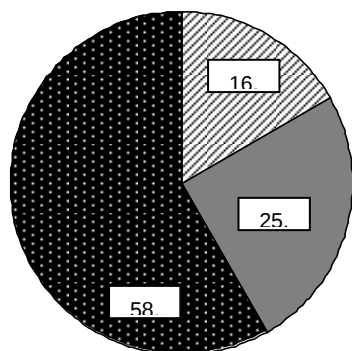
IL-1Ra



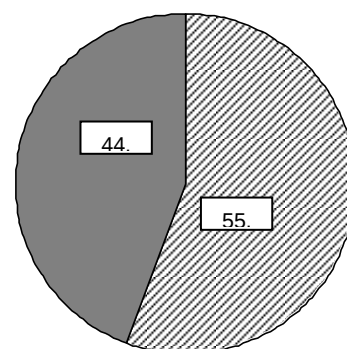
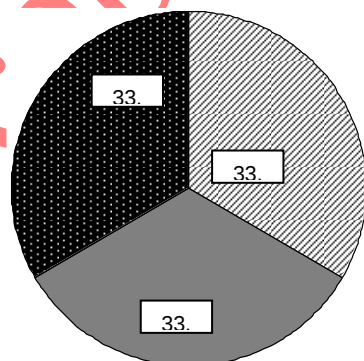
IL-4



IL-8



TNF- α



 штаммы с АЦА
  штаммы-продуценты ЦПВ
  штаммы без данных признаков

Рис. 1. Структура клинических штаммов энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОВ) с учётом наличия у них антицитокиновой активности (АЦА) в отношении отдельных цитокинов и способности к продукции определённых цитокиноподобных веществ (ЦПВ).

Fig. 1. The structure of clinical strains of enterobacteria and non-fermenting gram-negative bacteria (NfGNB), taking into account the presence of ACA in relation to individual cytokines and the ability to produce certain CLV.

Accepted for publication