

Г.Б.Алексамян<sup>1</sup>, Э.А.Ахматова<sup>2</sup>, Н.К.Ахматова<sup>2</sup>,  
Е.А.Курбатова<sup>2</sup>, Д.Н.Панченков<sup>1</sup>, В.В.Зверев<sup>2</sup>

## БАЛАНС Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 ЦИТОКИНОВ В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ У ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ПЕЧЕНИ

<sup>1</sup>Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова, <sup>2</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

*Цель.* Оценка цитокинового статуса у пациентов со злокачественными опухолями печени, перенесшими оперативное вмешательство. *Материалы и методы.* В исследование включены 33 пациента от 35 до 76 лет. Забор крови осуществляли перед операцией и в послеоперационном периоде: через 6, 24 часа и на 7 сутки. Оценивали цитокиновый профиль (IL-1b, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-9, IL-17a, IL-22) с помощью тест-системы Multiplex-13 (Bender MedSystems, Австрия). *Результаты.* Уровень всех исследуемых цитокинов (Th1/Th2/Th9/Th17/Th22) у больных был повышен уже до операции, что свидетельствует о наличии воспалительного процесса, связанного с активацией эффекторов иммунной системы. *Заключение.* Дисбаланс системы цитокинов хелперных клеток, приводящий к функциональным и органическим нарушениям через индукцию «цитокинового шторма», может усугублять состояние этих пациентов. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, направленные на коррекцию системы цитокинов у больных данного профиля.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 66—74

Ключевые слова: цитокины, злокачественные опухоли печени

G.B.Aleksanyan<sup>1</sup>, E.A.Akhmatova<sup>2</sup>, N.K.Akhamtova<sup>2</sup>,  
E.A.Kurbatova<sup>2</sup>, D.N.Panchenkov<sup>1</sup>, V.V.Zverev<sup>2</sup>

## BALANCE OF Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 CYTOKINES IN POST-OPERATION PERIOD IN PATIENTS WITH MALIGNANT TUMOR OF LIVER

<sup>1</sup>Evdokimov Moscow State Medical-Stomatological University, <sup>2</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* Evaluate cytokine status in patients with malignant liver cells after surgery. *Materials and methods.* 33 patients aged 35 to 76 years were included into the study. Blood was obtained before the operation and in the post-operation period: after 6 and 24 hours and at day 7. Cytokine profile (IL-1b, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-9, IL-17a, IL-22) was evaluated using Multiplex-13 system (Bender MedSystems, Austria). *Results.* In patients levels of all the studied cytokines (Th1/Th2/Th9/Th17/Th22) were already increased before the operations, that gives evidence of the presence of an inflammatory process connected with activation of immune system effectors. *Conclusion.* Disbalance of cytokine system helper cells resulting in functional and organic alterations through induction of the “cytokine storm” may aggravate the state of these patients. Further studies on the correction of cytokine system in these patients are thus needed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 66—74

Key words: cytokines, malignant tumors of liver

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в большинстве стран проблемы хирургической гепатологии вышли на первый план. Однако резекции печени по-прежнему ассоциируются с частыми послеоперационными инфекционными осложнениями. Иммунные реакции после резекций печени могут иметь решающее значение в патогенезе послеоперационных осложнений и потенциальной долгосрочной выживаемости. Важнейшую роль в межклеточных взаимодействиях на уровне врожденного иммунитета, регуляции иммунной дифференцировки Т-лимфоцитов и определении направления развития иммунных процессов играют цитокины.

Цитокины, как правило, не обладают ферментативной активностью и проявляют свои биологические эффекты только после связывания с рецепторами на клетках-мишенях, индуцируя специфические внутриклеточные сигнальные пути. Это приводит к экспрессии либо ингибированию определенных групп генов, кодирующих различные функции клеток (метаболическая активация, пролиферация, рост и дифференцировка, ингибирование деления, апоптоз). Активация гепатоцитов, например, ведет к увеличению синтеза белков острой фазы, в том числе сывороточного амилоида А и маннозосвязывающего белка, которые обеспечивают эффективную опсонизацию бактерий, тем самым способствуя их удалению [2].

Однако защитная роль провоспалительных цитокинов значительно снижается при повреждении уже морфологически измененной печени. Сравнение печени здоровых крыс и крыс, повергнутых хроническому воздействию этанола, выявило у последних уязвимость к летальным сигналам, которые запускаются активацией I типа рецепторов TNF- $\alpha$ . Опосредуемое TNF- $\alpha$  усиление продукции гепатоцитами активных кислородных радикалов приводит к их повреждению [13].

Увеличение продукции острофазных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) необходимо лишь на короткий период, чтобы инициировать рост клеток. Бесконтрольность процесса приводит к стадии острофазового ответа со стимуляцией выработки амилоидных пептидов, угнетению синтеза белка гепатоцитами, ингибированию глюконеогенеза, нарушению митохондриального дыхания и индукции гепатоцеллюлярного апоптоза. Более того, стойкое увеличение уровня провоспалительных цитокинов может приводить к прогрессированию течения цирроза печени и конвертированию звездчатых клеток в коллаген-продуцирующие клетки пораженной ткани либо хронизации процесса при нарушении регуляции [16].

Цитокины регулируют слаженное функционирование практически всех систем в организме — свертывающей, нервной, иммунной, эндокринной, соединительной, костной и мышечной тканей, что обеспечивает удаление микробных антигенов из циркуляции, ограничение очага воспаления и последующую регенерацию. Одним из самых драматичных свойств цитокинов является их плеiotропия, т.е. способность одновременно влиять на несколько признаков [5].

Нормальный ответ на инфекцию либо другой стрессовый фактор является самолимитирующимся процессом, который благодаря преходящей экспрессии регуляторов и эффекторных молекул способствует ликвидации иницирующего сигнала. Неспособность разрешить причинное событие или восстановить баланс провоспалительных и противовоспалительных агентов

приводит к поражению и деструкции тканей, что характеризует хроническое воспаление [18].

Исследования по изучению роли цитокинов в повреждении, поддержании активности воспалительного процесса и регенерации измененной печени в настоящее время немногочисленны.

Целью работы является оценка цитокинового статуса пациентов со злокачественными опухолями печени, перенесшими оперативное вмешательство, в сравнении с контрольной группой.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование осуществлялось на базе Московского клинического научно-практического центра Департамента здравоохранения города Москва и НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова. В исследование включены 17 пациентов с опухолями печени различных локализаций от 35 до 76 лет. В контрольную группу вошли 16 практически здоровых лиц. Все исследования выполнены с информативного согласия пациентов.

Забор крови осуществляли натощак в утренние часы в контрольной группе. В основной группе забор крови выполнялся перед операцией и в послеоперационном периоде: через 4 — 6 часов после вмешательства, 24 часа и на 7 сутки соответственно. Цитокиновый профиль оценивали по содержанию про- и противовоспалительных цитокинов: IL-1b, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-9, IL-17a, IL-22.

Уровень цитокинов в крови определяли методом проточной цитометрии (Cytomix FC-500, Beckman Coulter, США) с помощью тест-системы Multiplex-13 (Bender MedSystems, Австрия). Анализ результатов проводили с использованием программы Statistica 10. Статистическая значимость различий уровня цитокинов между группами оценивали непараметрическими методами исследования с помощью критерия Манна-Уитни. Статистически достоверными считали различия при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень всех цитокинов (за исключением IL-12 и IL-4) у больных как до операции, так и после нее был статистически значимо повышен по сравнению с показателями здоровых лиц.

Уровень IL-1b у больных до операции был повышен в 4,5 раза ( $p < 0,05$ ) сравнительно нормативных значений, после операции содержание данного цитокина постепенно повышалось и достигало уровня  $963 \pm 209$  пкг/мл ( $p < 0,05$ ), что было выше нормы в 7,5 раза, а исходных значений в 1,7 раза ( $p > 0,05$ ).

Концентрация IL-2, обеспечивающего пролиферацию и дифференцировку Th1 клеток, у больных была выше нормы в 1,34 раза (соответственно  $556 \pm 68$  и  $114 \pm 35,3$  пкг/мл). Лапаротомия вызывала кратковременное снижение этого показателя на 6 часов (до  $502 \pm 101,7$  пкг/мл) с последующим повышением уровня IL-2 через 1 и 7 сутки (соответственно  $584 \pm 136$  и  $745 \pm 92$  пкг/мл).

У больных в дооперационном периоде отмечалось умеренное ( $p < 0,05$ ) повышение IFN- $\gamma$  (до  $87 \pm 12$  пкг/мл) в сравнении со здоровыми лицами ( $55 \pm 4,6$  пкг/мл) и резкое повышение (в 4 раза) уже через 6 часов до  $356 \pm 162$  пкг/мл с последующим достижением максимальных значений ( $460 \pm 213$  пкг/мл) на 7 сутки наблюдения.

В отношении IL-12 наблюдалась несколько иная картина. Уровень его у больных в предоперационном периоде незначительно ( $p > 0,05$ ) отличался от

нормальных показателей. Но после хирургического вмешательства резко повышался на 6 час (в 2,3 раза,  $236,7 \pm 26,3$  пкг/мл), затем медленно снижался практически до исходного уровня. Таким образом, у больных изначально отмечалось повышение концентраций всех Th1 цитокинов (кроме IL-12). Лапаротомические операции индуцировали повышение этих цитокинов в динамике, которые достигали максимального уровня к концу наблюдения (7 сутки).

Аналогичная картина наблюдалась в отношении Th2 цитокинов. Уровень IL-4 в предоперационном периоде незначимо отличался от показателей здоровых лиц, но после операции происходило постепенное его повышение, которое на 7 сутки наблюдения достигало максимального значения (повышение в 3,9 раза,  $589,7 \pm 191$  пкг/мл против  $151,3 \pm 72$  пкг/мл до операции).

IL-5 у больных изначально был повышен в 2 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со здоровыми. Спустя 6 часов после оперативного вмешательства уровень этого цитокина повышался в 1,95 раза (до  $1784,6$  пкг/мл), а через 7 суток — в 2,4 раза (до  $2231,6$  пкг/мл).

Исходный уровень IL-6 у больных был выше уровня ( $p < 0,05$ ) нормальных показателей в 3,4 раза (соответственно  $734 \pm 176$  пкг/мл против  $216,4 \pm 16,8$  пкг/мл). Через 6 часов после операции уровень данного интерлейкина повышался в 1,4 раза и был стабильно высоким в течение всего периода наблюдения ( $978 \pm 150$  пкг/мл — 24 ч,  $1031,6$  пкг/мл — 7 сут).

В отношении другого противовоспалительного цитокина IL-10 также отмечался его высокий уровень в дооперационный период ( $563,5 \pm 139,5$  пкг/мл против  $129,9 \pm 14,5$  пкг/мл в контроле) и значительно высокая концентрация в послеоперационный период ( $649 \pm 138,7$  пкг/мл — 6 ч,  $793,4 \pm 177,6$  пкг/мл — 24 ч,  $1215,8 \pm 499$  пкг/мл — 7 сут).

То есть, у больных синтез Th2 цитокинов (IL-5, IL-6 и IL-10) в крови статистически значимо был повышен по сравнению со здоровыми лицами и в динамике наблюдения отмечалось еще более интенсивное его и IL-4 повышение в послеоперационном периоде.

CD4 Т-хелперы — важные медиаторы клеточного иммунного ответа. Предполагается, что эти популяции существуют как дихотомические линии так называемых Th1 и Th2 хелперных клеток. Тип 1 цитокинов включает IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 и TNF- $\alpha$ , в то время как тип 2 — IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13. В настоящее время обнаружены и охарактеризованы также и другие субпопуляции эффекторных Т-клеток хелперов: Th17, Th9 и Th22 [9, 12, 17].

Концентрация IL-9 в дооперационный период повышалась в более чем 3 раза ( $576,5 \pm 37,6$  пкг/мл против  $175,5 \pm 25,7$  пкг/мл в контроле). В последующие сроки постоперационного периода отмечалось ее последовательное повышение до  $643,6 \pm 71,7$  пкг/мл на 7 сутки. Аналогичная картина наблюдалась в отношении IL-22, когда его содержание в крови у больных возрастало в 4,7 раза по сравнению со здоровыми ( $4671 \pm 747,9$  пкг/мл против  $1000 \pm 26,8$  пкг/мл), также существенно повышалось через 6 часов ( $5031$  пкг/мл) и стабильно сохранялось на высоком уровне в последующие сроки наблюдения.

IL-17a в сыворотке крови в предоперационный период у больных был также повышен в 3,8 раза по сравнению с контрольной группой ( $236 \pm 83,7$  пкг/мл против  $62,2 \pm 5,5$  пкг/мл). После операции его уровень повышался в 2,2 — 2,8 раза ( $518$  пкг/мл — 6 ч,  $626,8$  — 24 ч,  $658$  пкг/мл — 7 сут).

Следует отметить, что уровень всех цитокинов — Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 у больных был повышен уже до операции, что свидетельствует о наличии воспалительного процесса, связанного с активацией эффекторов иммунной си-

Таблица 1. Коэффициенты баланса Th1/Th2, Th1/Th9, Th1/Th17 и Th1/Th22 у больных, перенесших оперативные вмешательства по поводу злокачественных опухолей печени

Время забора крови	IL-1b/ IL-4	IL-1b/ IL-5	IL-1b/ IL-6	IL-1b/ IL-10	IL-1b/ IL-17a	IL-1b/ IL-22	IL-1b/ IL-9
Контроль	0,6	0,3	0,6	0,9	2,0	0,1	0,7
0 ч	0,8 ↑	0,6 ↑	0,8 ↑	1 ↑	2,4	0,1	1 ↑
6 ч	0,7 ↑	0,4 ↑	0,7 ↑	1,1 ↑	1,4 ↓	0,1	1 ↑
24 ч	0,9 ↑	0,3	0,9	1,1 ↑	1,3 ↓	0,2 ↑	1,1 ↑
7 сут	0,9 ↑	0,4 ↑	0,9	0,8 ↓	1,4 ↓	0,2 ↑	1,5 ↑
Время забора крови	IL-2/ IL-4	IL-2/ IL-5	IL-2/ IL-6	IL-2/ IL-10	IL-2/ IL-17a	IL-2/ IL-22	IL-2/ IL-9
Контроль	1,9	0,9	1,9	3,2	6,6	0,4	6,6
0 ч	0,7 ↓	0,6 ↓	0,7 ↓	0,9 ↓	2,3 ↓	0,1 ↓	2,3 ↓
6 ч	0,4 ↓	0,3 ↓	0,5 ↓	0,7 ↓	0,9 ↓	0,1 ↓	0,9 ↓
24 ч	0,6 ↓	0,3 ↓	0,6 ↓	0,7 ↓	0,9 ↓	0,1 ↓	0,9 ↓
7 сут	0,7 ↓	0,3 ↓	0,7 ↓	0,6 ↓	1,1 ↓	0,1 ↓	1,1 ↓
Время забора крови	TNF-α/ IL-4	TNF-α/ IL-5	TNF-α/ IL-6	TNF-α/ IL-10	TNF-α/ IL-17a	TNF-α/ IL-22	TNF-α/ IL-9
Контроль	0,7	0,3	0,7	1,2	2,4	0,1	0,9
0 ч	1,6 ↑	1,3 ↑	1,6 ↑	2,1 ↑	5 ↑	0,2 ↑	2 ↑
6 ч	1,3 ↑	0,7 ↑	1,3 ↑	2,1	2,7 ↑	0,3 ↑	1,9 ↑
24 ч	1,3 ↑	0,6 ↑	1,3 ↑	1,6 ↑	2,1 ↓	0,3 ↑	1,7 ↑
7 сут	1,6 ↑	0,7 ↑	1,6 ↑	1,4 ↑	2,5 ↑	0,3 ↑	2,6 ↑
Время забора крови	IFN-γ/ IL-4	IFN-γ/ IL-5	IFN-γ/ IL-6	IFN-γ/ IL-10	IFN-γ/ IL-17a	IFN-γ/ IL-22	IFN-γ/ IL-9
Контроль	0,2	0,1	0,2	0,4	0,9	0,05	0,3
0 ч	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,01	0,1
6 ч	0,3 ↑	0,12 ↑	0,3 ↑	0,5 ↑	0,7 ↑	0,1 ↑	0,5 ↑
24 ч	0,5 ↑	0,2 ↑	0,5 ↑	0,6 ↑	0,8 ↑	0,1 ↑	0,6 ↑
7 сут	0,4 ↑	0,2 ↑	0,4 ↑	0,4 ↑	0,7 ↑	0,1 ↑	0,7 ↑
Время забора крови	IL-12p70/ IL-4	IL-12p70/ IL-5	IL-12p70/ IL-6	IL-12p70/ IL-10	IL-12p70/ IL-17a	IL-12p70/ IL-22	IL-12p70/ IL-9
Контроль	0,4	0,2	0,4	0,6	1,3	0,08	0,5
0 ч	0,1 ↓	0,1 ↓	0,1 ↓	0,2 ↓	0,4 ↓	0,02 ↓	0,2 ↓
6 ч	0,2 ↓	0,1 ↓	0,2 ↓	0,4 ↓	0,4 ↓	0,05 ↓	0,3 ↓
24 ч	0,2 ↓	0,1 ↓	0,2 ↓	0,2 ↓	0,3 ↓	0,04 ↓	0,2 ↓
7 сут	0,1 ↓	0,1 ↓	0,1 ↓	0,1 ↓	0,2 ↓	0,03 ↓	0,2 ↓

Примечание. ↑ повышение и ↓ снижение коэффициента баланса Th1/Th2/Th9/Th/17/Th22 цитокинов относительно контроля.

стемы. Оперативное вмешательство более интенсивно индуцировало повышение данных цитокинов, приводя к так называемому «цитокиновому шторму», что усугубляло состояние этих пациентов.

По полученным данным были рассчитаны коэффициенты баланса Th1/Th2/Th9/Th/17/Th22 цитокинов у онкобольных с опухолями печени и обследуемых контрольной группы (табл. 1). Коэффициенты рассчитывались как отношения концентрации Th1 и Th2, Th1 и Th9, Th1 и Th17, Th1 и Th22, а также Th2 и Th9, Th2 и Th17, Th2 и Th22 цитокинов, являющихся агонистами:

IL-1b/IL-4, IL-1b/IL-5, IL-1b/IL-6, IL-1b/IL-10, IL-1b/IL-17a, IL-1b/IL-22, IL-1b/L-9, IL-4/IL-17a, IL-4/IL-22, IL-4/IL-9, IL-5/IL-17a, IL-5/IL-22, IL-5/IL-9, IL-6/IL-17a, IL-6/IL-22, IL-6/IL-9, IL-10/IL-17a, IL-10/IL-22, IL-10/IL-9.

Как видно из табл. 1 и 2, был выявлен дисбаланс соотношения пяти типов Т-хелперных клеток. А данные табл. 2 демонстрируют, что значения коэффициентов баланса Th2/Th9/Th17/Th22 типов цитокинов при оперативных вмешательствах на печени у пациентов меняются разнонаправленно относительно контрольной группы.

Поддержание эффективного иммунного ответа при нарушении цитокинового баланса становится невозможным. Увеличение концентрации провоспалительных цитокинов в крови пациентов служит основой для развития Th1/Th9/Th17/Th22 воспалительной реакции при лапаротомических оперативных

**Таблица 2. Коэффициенты баланса Th2/Th9, Th2/Th17 и Th2/Th22 у больных, перенесших оперативные вмешательства по поводу злокачественных опухолей печени**

Время забора крови	IL-4/IL-17a	IL-4/IL-22	IL-4/IL-9
Контроль	1,2	0,07	0,4
0 ч	0,6 ↓	0,03 ↓	0,3 ↓
6 ч	0,5 ↓	0,05 ↓	0,3 ↓
24 ч	0,5 ↓	0,07	0,4
7 сут	0,9 ↓	0,1 ↑	0,9 ↑

Время забора крови	IL-5/IL-17a	IL-5/IL-22	IL-5/IL-9
Контроль	7,1	0,4	2,5
0 ч	3,9 ↓	0,2 ↓	1,6 ↓
6 ч	3,4 ↓	0,3 ↓	2,4 ↓
24 ч	3,5 ↓	0,5 ↑	2,9 ↑
7 сут	3,4 ↓	0,4	3,5 ↑

Время забора крови	IL-6/IL-17a	IL-6/IL-22	IL-6/IL-9
Контроль	3,5	0,2	1,2
0 ч	3,1 ↓	0,1 ↓	1,3 ↑
6 ч	2 ↓	0,2	1,4 ↑
24 ч	1,6 ↓	0,2	1,3 ↑
7 сут	1,6 ↓	0,2	1,6 ↑

Время забора крови	IL-10/IL-17a	IL-10/IL-22	IL-10/IL-9
Контроль	2,1	0,2	1,2
0 ч	2,4 ↑	0,1 ↓	1,3 ↑
6 ч	1,2 ↓	0,2	1,4 ↑
24 ч	1,3 ↓	0,2	1,3 ↑
7 сут	1,8 ↓	0,2	1,6 ↑

**Примечание.** ↑ повышение и ↓ снижение коэффициента баланса Th2/Th9, Th2/Th17 и Th2/Th22 цитокинов относительно контроля.

вмешательствах. Это может привести к расширению очага воспаления и повреждению тканей, усилению перекисного окисления липидов и белков, накоплению свободных радикалов, стимуляции апоптоза. Преобладание Th2 цитокинов может свидетельствовать о подключении компенсаторных гуморальных механизмов иммунного ответа.

Как показывают наши исследования, у больных с онкопатологией печени после оперативного вмешательства наблюдается дисбаланс Th1, Th2, Th9 и Th17 и Th22 цитокиновой системы. До начала операции в спектре Th1 цитокинов отмечалась их повышенная концентрация, которая является ключевой провоспалительной составляющей иммунного ответа. TNF-α, синтезируемый преимущественно клетками миеломоноцитарного ряда и играющий важную роль при метаболическом синдроме, оказывает влияние на функционирование эндотелия, продукцию IL-1, IL-6, IL-8, IFN-γ и активацию лимфоцитов. IL-1β, обеспечивая резистентность к патогенам, также может усугублять повреждение тканей при хронических заболеваниях и острой травме [10].

IL-2, оказывая непосредственное воздействие на лимфоциты, приводит к дифференци-

ции некоторых незрелых Т-клеток в регуляторные Т-клетки, которые подавляют аутореактивные клоны. Также под воздействием IL-2 Т-клетки дифференцируются в эффекторные и клетки памяти, тем самым обеспечивая быстрое реагирование иммунной системы на повторное вторжение патогенов [1]. При этом IFN- $\gamma$ , являясь активатором макрофагов, может вызывать как защитные, так и патологические эффекты. Этот интерферон индуцирует дифференцировку миелоидных клеток костного мозга, в результате которой они приобретают высокоаффинные Fc $\gamma$ -рецепторы для связывания мономерной формы IgG. IFN- $\gamma$  активирует и антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), осуществляемую зрелыми гранулоцитами [4].

Важными медиаторами иммунного ответа являются цитокины Th2-типа, включающие IL-4, IL-5 и IL-13, которые ассоциируются с индукцией IgE и эозинофильных ответов при атопии [14], а также IL-10, который характеризуется большей способностью индуцировать противовоспалительный ответ. IL-10, продуцируемый моноцитами/макрофагами, активированными В-клетками и Th1 и Th2 клетками, подавляет синтез Th1 цитокинов, включая IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$  с Th1 клетками и IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 и GM-CSF моноцитами/макрофагами. В избытке Th2 ответ противодействует Th1 опосредованному бактерицидному действию [11]. Поэтому для поддержания адекватного иммунного ответа важен баланс ответа Т-хелперов Th1/Th2/Th9/Th17/Th22. Как видно из наших исследований, уровень Th2 цитокинов остался достаточно высоким по сравнению с группой здоровых лиц.

В наших исследованиях в целом по группе больных оперативное вмешательство привело к повышению уровня Th9/Th17/Th22 цитокинов. Известно, что IL-17а продуцируется уникальной субпопуляцией Т-хелперных клеток независимо от Th1/Th2 клеточного развития. Th17 клетки играют роль в защите организма от внеклеточных патогенов посредством «рекрутирования» нейтрофилов и макрофагов в инфицированные ткани. Кроме того, становится очевидным, что aberrантная регуляция Th17 клеток может играть значительную роль в патогенезе многочисленных воспалительных и аутоиммунных нарушений [3].

Th17-клетки продуцируют IL-17, IL-17F и IL-22, тем самым, вызывая массовую реакцию тканей вследствие широкого распространения IL-17 и IL-22 рецепторов. Через секрецию IL-21 Th17 клетки могут взаимодействовать с клетками иммунной системы. Недавно были идентифицированы дифференцировочные факторы (TGF- $\beta$  плюс IL-6 или IL-21), факторы роста и стабилизации (IL-23), а также транскрипционные факторы (STAT3, ROR $\gamma$ t и ROR $\alpha$ ), участвующие в развитии Th17 клеток. Участие TGF- $\beta$  в дифференциации Th17 клеток проводит тесную параллель между Th17 и CD4+/CD25+/Foxp3+ регуляторными Т-клетками (T-reg) [15].

Недавно открытая субпопуляция Т-хелперных клеток — Th9. TGF- $\beta$ , который является критически важным в дифференцировке Th17 клеток, индуцирует реорганизацию Th2 клеток в Th9, которые характеризуются секрецией IL-9. Th9 клетки могут также быть дериватами наивных CD4+ Т-клеток, продуцирующих TGF- $\beta$  и IL-4. IL-9 является членом общего цитокинового рецептора  $\gamma$  цепь-зависимого семейства цитокинов, которые также включают IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 и IL-21. Благодаря плейотропным эффектам в отношении Th2 лимфоцитов, В лимфоцитов, тучных клеток, эозинофилов, а также эпителиальных клеток кишечника и респираторного тракта Th9 вовлекаются в патогенез астмы и других аллергических заболеваний [6].

IL-22 — член IL-10 цитокинового семейства, который преимущественно

секретируются Th17 клетками. IL-23 и IL-6 могут непосредственно стимулировать наивные Т-клетки к продукции IL-22. Недавно было показано, что IL-22 способен защитить от бактериальной инфекции в легких и кишечнике. Недавно была открыта собственная Т-клеточная популяция, именуемая Th22. Эти клетки инфильтрируют эпидермис у индивидов с воспалительными нарушениями кожи и характеризуются секрецией IL-22 и TNF- $\alpha$ , но не IFN- $\gamma$ , IL-4 или IL-17 [8].

На тканевом уровне Th цитокины ответственны за развитие воспаления, а затем и за регенерацию тканей. При развитии системной воспалительной реакции цитокины влияют практически на все органы и системы организма, участвующие в регуляции гомеостаза. Попадание цитокинов в кровяное русло, безусловно, означает, что местная защита не справилась с патогеном и требуется включение системной воспалительной реакции для предотвращения распространения патогена и противодействия развитию сепсиса [7].

Однако в наших исследованиях уровень всех про- и противовоспалительных цитокинов у больных был повышен уже до операции в результате физического стресса, обусловленного наличием опухолевого процесса, инфекции или сопутствующей патологии, что свидетельствует о наличии воспалительного процесса, связанного с активацией эффекторов иммунной системы. При этом определялся дисбаланс системы цитокинов хелперных клеток, который может приводить к функциональным и органическим нарушениям через индукцию «цитокинового шторма» и усугублять состояние этих пациентов. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, направленные на коррекцию системы цитокинов у больных данного профиля.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Balkhi M.Y., Ma Q., Ahmad S., Junghans R.P. T cell exhaustion and interleukin 2 down-regulation. *Cytokine*. 2015, 71 (2): 339-347.
2. Borlak J., Chatterji B., Londhe K.B., Watkins P.B. Serum acute phase reactants hallmark healthy individuals at risk for acetaminophen-induced liver injury. *Genome Med*. 2013, 5 (9): 86.
3. Hasan M., Neumann B., Hauptelshofer S., Stahlke S. Activation of TGF- $\beta$ -induced non-Smad signaling pathways during Th17 differentiation. *Immunol. Cell Biol*. 2015, 3: 216-223.
4. Hoeksema M.A., Scicluna B.P., Boshuizen M.C. et al. IFN- $\gamma$  priming of macrophages represses a part of the inflammatory program and attenuates neutrophil recruitment. *J. Immunol*. 2015, 3 (2): 329-335.
5. Holdsworth S.R., Gan P.Y. Cytokines: names and numbers you should care about. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2015, May 4. pii: CJN.07590714.
6. Hoppenot D., Malakauskas K., Lavinskienė S., Bajoriūnienė I. Peripheral blood Th9 cells and eosinophil apoptosis in asthma patients. *Medicina*. 2015, 51 (1): 10-17.
7. Hotchkiss R.S., Sherwood E.R. Immunology. Getting sepsis therapy right. *Science*. 2015, Mar 13; 347 (6227): 1201-1202.
8. Jia L., Wu C. The biology and functions of Th22 cells. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2014, 841: 209-230.
9. Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K. IL-17 and Th17 cells. *Ann. Rev. Immunol*. 2009, 27: 485-517.
10. Lopez-Castejon G., Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011, Aug; 22 (4): 189-195.
11. Muraille E., Leo O., Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front. Immunol*. 2014, 5: 603.
12. Naji N., Smith S.G., Gauvreau G.M., O'Byrne P.M. T helper 17 cells and related cytokines



- after allergen inhalation challenge in allergic asthmatics. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 2014, 165 (1): 27-34.
13. Petrasek J., Iracheta-Vellve A., Saha B. et al. Metabolic danger signals, uric acid and ATP mediate inflammatory cross-talk between hepatocytes and immune cells in alcoholic liver disease. *J. Leukoc. Biol.* 2015, May 1. pii: jlb.3AB1214-590R.
  14. Redpath S.A., Heieis G., Perona-Wright G. Spatial regulation of IL-4 signalling in vivo. *Cytokine.* 2015, 4 (1): 112-116.
  15. Rodríguez-Reyna T.S., Furuzawa-Carballeda J., Cabiedes J. Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: a cross-sectional study. *Rheumatol. Int.* 2012, 32 (9): 2653-2660.
  16. Shi X., Li D., Deng Q. et al. NEFAs activate the oxidative stress-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway to induce inflammatory response in calf hepatocytes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2015, Jan; 145: 103-112.
  17. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 2007, 13 (2): 139-145.
  18. Xiu F., Catapano M., Diao L. et al. Prolonged er stressed-hepatocytes drives an alternative macrophage polarization. *Shock.* 2015, 5 (2): 125-131.

Поступила 26.09.16

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*В.Н.Царев, Е.В.Инполитов, Е.Н.Николаева*

## **РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У БИОПЛЕНКО-ФОРМИРУЮЩИХ ШТАММОВ ОБЛИГАТНЫХ И ФАКУЛЬТАТИВНЫХ АНАЭРОБОВ**

Московский государственный медико-стоматологический университет

*Цель.* Сравнительный анализ частоты выявления генетических маркеров устойчивости к антибиотикам, формирующейся у анаэробных бактерий в условиях смешанных биопленок в клинических условиях, и сравнение данных фенотипических и генотипических методов исследования. *Материалы и методы.* Исследовали 66 штаммов бактерий, образующих биопленку, у которых определяли гены резистентности к антибиотикам с помощью ПЦР: *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, и анаэробных патогенов — *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*. Проводили моделирование микробных биопленок *in vitro* и сканирующую электронную микроскопию. *Результаты.* Установлено, что исследуемые штаммы резидентной и патогенной микробиоты имеют гены, кодирующие устойчивость к  $\beta$ -лактамным антибиотикам, карбапенемам, макролидам, тетрациклинам. В результате ПЦР у штаммов выявлены генетические маркеры устойчивости к  $\beta$ -лактамным антибиотикам (STX-M и MECA — цефалоспорины), включая карбапенемы (VIM и NDM, но не Окса-48), гликопептиды (VanA и VanB), макролидам (ERM), тетрациклину (Tet) и плазмиды QNRB — фторхинолонов. *Заключение.* Наиболее часто используемые в стоматологической практике препараты — метронидазол и линкомицин (за последние 20 — 30 лет) показали наибольшее число резистентных штаммов — 52,3 и 22,7% соответственно. Частота выявления генетических маркеров резистентности к другим изученным препаратам не превышала 2,5 — 11,4%. Минимальное количество резистентных штаммов анаэробных бактерий выявлено к карбапенемам и фторхинолонам.