

РОЛЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ НЕОНАТАЛЬНОГО СЕПСИСА У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

Керимова Н.Т.¹, Эфендиев А.М.²

*Научно-Исследовательский Институт Педиатрии им.К.Я.Фараджевой¹
Азербайджанский Медицинский Университет, кафедра биохимии²*

Целью данного исследования явилось определение критериев реализации сепсиса у новорожденных детей различного гестационного возраста на основе комплексных лабораторных данных. Установлено статистически значимое изменение концентрации АМП (дефензинов, эндотоксинов) в сыворотке крови и возможности использования этих показателей в своевременной диагностике и определении тяжести неонатального сепсиса у новорожденных детей.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, дефензины, эндотоксины, неонатальный сепсис.

Несмотря на постоянные усилия по ранней диагностике и профилактике неонатальный сепсис все еще остается сложным недостаточно изученной общемедицинской проблемой неонатологов из-за отсутствия идеальных диагностических маркеров. Потребность в биомаркере с высокой точностью и надежностью диагностики имеет первостепенное значение в качестве руководства для врачей в оценке риска инфекции и необходимости антибактериальной терапии. В настоящее время продолжают исследования в поисках нового маркера неонатального сепсиса. Несмотря на использование мощных антибиотиков и химиотерапевтических препаратов, а также современных технологий интенсивной терапии, тяжелый сепсис и септический шок - самые частые причины смерти у больных в отделениях реанимации. Сепсис занимает одно из первых мест причин смерти по всему миру. По оценкам ВОЗ во всем мире каждый год страдают 3 миллиона новорожденных, при этом заболеваемость в среднем от 1 до 20 случаев на 1000 живых рожденных и сильно зависит от социально экономических условий [1-5].

В процессе родов и сразу после рождения ребёнка, происходит тесный контакт стерильного организма новорожденного с антигенами микроорганизмов родовых путей и окружающей среды [2,3]. Сепсис но-

ворожденных может осложняться метастатическими очагами инфекции, диссеминированным внутрисосудистым свертыванием, застойной сердечной недостаточностью и шоком [4]. Врожденная иммунная система обеспечивает защиту организма против инфекции, вызывая воспаление, играющее роль в активации адаптивного иммунитета.

Важную роль в развитии процессов воспаления, поддержании и регуляции адаптивной иммунной системы играют эндогенные антимикробные пептиды (АМП) [6]. Они являются неспецифическими факторами гуморального иммунитета, обладают эндотоксин-нейтрализующей и иммуномодулирующей активностью, а также обеспечивают защиту против широкого спектра микроорганизмов грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов, вирусов [7,8]. АМП различаются с расположением 10-50 аминокислот в коротких антипатических молекулах. У человека существует 3 типа АМП:

1. Дефензины,
2. Кателициды,
3. Гистамины [9].

Дефензины обладают регуляторными свойствами. У человека идентифицировано 6 типов альфа-дефензинов, 4 из которых экспрессируются в нейтрофилах HNP (нейтрофильный пептид человека [HNP] 1-4) и 2 - в клетках Панета кишечника (HD) [9],

HD5 и HNP1 подавляют образование спор микроспоридий.

Некоторые АМП, такие как пептиды группы кателицидинов и дефензинов, являются аттрактантами для клеток иммунной системы. Они усиливают выработку цитокинов, способствуют высвобождению гистамина из тучных клеток. Дефензины относятся к иммунозащитным пептидам и продуцируются иммунной системой большинства многоклеточных организмов, играют главную роль как молекулы-эффекторы врожденного иммунитета [10].

α -дефензины человека выступают сигнальной молекулой для моноцитов, Т-клеток и зрелых и незрелых дендритных клеток. К примеру, продемонстрировано, что дефензины в условиях *invitro* способны увеличивать адгезию Т-клеток к эпителиоцитам легочного эпителия через индукцию IFN α , IL-10 и IL-6 [11]. Известно, что α -дефензины, в частности HNP-1, активируют гены синтеза хемокинов CXCL5, CXCL6 и CXCL7A [11], которые в свою очередь выступают хемоаттрактантами для моноцитов. Дефензины обладают регуляторными свойствами [2;3;11]. HNP могут обеспечивать эффекторную фазу адаптивного иммунитета. HNP являются хемоаттрактантами для CD4⁺/CD45RO⁺ Т-лимфоцитов и дендритных клеток. Кроме того, HBD2 –потенциальный хемоаттрактант для нейтрофилов [13,14]. Таким образом, осуществляется привлечение нейтрофилов в очаги воспаления [11;12]. Хемотаксическое действие дефензины проявляют в значительно меньших концентрациях 10-100 раз по отношению к концентрациям, требуемым для уничтожения микробов [11, 12].

Дефензины выполняют важные функции во многих клинически значимых патологических процессах. Активация нейтрофилов при инфекционных и воспалительных процессах приводит к быстрому высвобождению дефензинов, которые затем обнаруживаются в плазме и других жидкостях организма. В нормальной плазме обнаруживается очень низкий уровень дефензинов (от неопределяемых величин до 50-100 нг/мл), однако в условиях сепсиса содержание их может возрасти до 10

мг/мл и даже выше. К примеру, нарушение активации цитокинов и дефензинов на поверхностном эпителии репродуктивного тракта влечет за собой внедрение возбудителя даже при малом его количестве [15]. Показано, что пациенты, у которых отсутствуют α -дефензины, страдают частыми и тяжелыми бактериальными инфекциями [13,16]. Помимо всего вышесказанного, дефензины экспрессируются на всем протяжении репродуктивного тракта женщин, где выполняют ряд функций, которые играют ключевую роль в сохранении и защите плода во время беременности [14,17,18]. Важно отметить, что при значительном повышении концентрации дефензинов в биологических жидкостях при воспалении возникает проблема предотвращения цитопатического действия по отношению к собственным клеткам [10,12]

Эндотоксины грамотрицательных бактерий являются одним из ведущих патогенетических факторов при сепсисе [15,19, 20]. Актуальным является изучение маркеров эндотоксемии дефензинов, эндотоксина, и выявление взаимосвязи их в патогенезе сепсиса.

Целью исследования явилось изучение АМП-дефензинов, эндотоксинов у новорожденных с сепсисом.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились в научно-исследовательской лаборатории НИИ Педиатрии им. К.Я. Фараджевой. Работа выполнена в отделениях патологии новорожденных, анестезиологии и интенсивной терапии реанимации. Была исследована кровь 80 новорожденных, которые были разделены на 3 группы:

I группа-17 новорожденных со сроком гестации 38-41 недель;

II группа-33 новорожденных со сроком гестации 27-37 недель;

III группа-контрольная группа её составили 30 здоровых новорожденных детей из родильного дома №7 г.Баку.

Инфицированных новорожденных со сроком гестации 38-41 недель в среднем (37,8 \pm 0,2), со сроком гестации 27-37 (32,8 \pm 0,5). Контрольную группу составили 30 здоровых новорожденных детей. В

группе наблюдавшихся доношенных новорожденных масса тела была ($3181 \pm 107,9$ г.), а масса тела недоношенных новорожденных составляла ($1983,6 \pm 91,5$).

Биохимическая оценка осуществлялась путем изучения таких маркеров как общий, прямой и непрямой билирубин по методу Ендрашика; АЛАТ, АсАТ – по методу Райтмана-Френкеля – с использованием наборов фирмы «HUMAN» (Германия).

Определение концентрации АМР, проводилось методом иммуноферментного анализа (ELISA) по принципу «сэндвич» – на иммуноферментном анализаторе «ElysusUno» производство Германии. Были использованы наборы DEF-a1 фирмы «US CN» (КНР), Endotoxin(ET) ELISA Kit фирмы «abbexa». Статистическую обработку

данных проводили с помощью U-критерия Уилкинсона (Манна-Уитни).

Результаты исследования и их обсуждение.

Активность патологического процесса в печени в целом влияла на изменения плазменных уровней, изучаемых показателей антимикробных пептидов. Эти изменения были более характерны для новорожденных с неонатальным сепсисом. Типичным критерием ухудшения состояния и неблагоприятного прогноза является повышение у доношенных и недоношенных детей уровней билирубина, прямого билирубина, непрямого билирубина, а также АсАТ и АЛАТ повышены у всех больных по сравнению с нормой в I и II группах.

Таблица 1.

Биохимические показатели исследуемых больных в сравнении с нормативами

Показатели	Нормальная величина	I группа (n=17) доношенные	II группа (n=33) недоношенные	P1
		Общий билирубин мкмоль/л	2,0-17,1	
Прямой билирубин, мкмоль/л	2,0-0,42	$23,6 \pm 3,8$ (10-50)	$22,3 \pm 3,0$ (10-72)	0,652
Непрямой билирубин, мкмоль/л	2,0-17,1	$131,6 \pm 24,3$ (34-90)	$131,1 \pm 11,2$ (50-280)	0,346
АЛАТ, МЕ/мл	10-45	$95,0 \pm 35,1$ (21-300)	$51,0 \pm 10,1$ (28-118)	0,202
АсАТ, МЕ/мл	10-38	$109,5 \pm 45,2$ (28-380)	$59,8 \pm 13,9$ (30-160)	0,135

Прим: p₁- статистическая значимость различий между показателями I и II групп.

Результаты представлены в виде $M \pm m$. M-среднее значение, m-стандартная ошибка (min-max)-размах вариации: минимальная и максимальная значения ряда.

Эндотоксин может вызывать или усугублять иммунное воспаление через множественные механизмы и стимулирует выработку дефензинов, являющихся достаточно информативными маркерами остроты воспалительного процесса. Так, уровень дефензинов в сыворотке крови I группы увеличивается в 16,6 раза ($806,6 \pm 58,6$ нг/мл), при контроле ($48,4 \pm 1,3$ нг/мл), во II группе в 17,6 ($740,3 \pm 40,1$ нг/мл) при контроле ($41,9 \pm 4,2$ нг/мл). Вариабельность количества дефензина, отражает степень

активации нейтрофилов. При исследовании было выявлено что количество эндотоксина в I группе составляло $3,7 (1,541 \pm 0,039)$ МЕ/мл, при контроле ($0,410 \pm 0,018$) МЕ/мл. а во II группе $4,6 (1,554 \pm 0,017)$ МЕ/мл, при контроле ($0,337 \pm 0,019$) МЕ/мл. Бактериальный эндотоксин постоянный структурный компонент наружной клеточной стенки грамотрицательных бактерий, он освобождается при их разрушении.

Показатели АМП (дефензинов, эндотоксинов) у новорожденных с сепсисом.

Параметры	Доношенные		р	Недоношенные		р	р ₁
	Контрольная группа (n=23)	I группа (n=17)		Контрольная группа (n=7)	II группа (n=33)		
Дефензины, нг/мл	48,4±1,3 (31,2-58,4)	806,6±58,6 (397,2-1098)	<0,001	41,9±4,2 (25,8-58,4)	740,3±40,1 (401,8-1076)	<0,001	0,771
Эндотоксин, МЕ/мл	0,410±0,018 (0,27-0,57)	1,541±0,039 (1,24-1,77)	<0,001	0,337±0,019 (0,25-0,39)	1,554±0,017 (1,36-1,73)	<0,001	0,157

Прим: статистическая значимость различий:

1. р – с показателями соответствующей контрольной группы
2. р₁ – между показателями основных групп.

С одной стороны, дефензины обладают выраженным бактерицидным действием, а с другой – способны усиливать альтерацию в зоне воспаления вследствие повреждения клеток организма. Дефензины привлекают в очаг инфекции различных участников иммунных реакций, например, незрелые дендритные клетки, моноциты и Т-клетки. Описаны такие эффекты дефензинов как усиление пролиферации и созревания ряда клеток иммунной системы, способность усиливать клеточную экспрессию молекул адгезии и главного комплекса гистосовместимости, а также модулирование синтеза самыми различными клетками провоспалительных цитокинов.

Выводы. АМП обладают хемотаксическим, иммуномодулирующим, цитотоксическим действием в организме, активируют протеазы, вызывают апоптоз, ингибируют ангиогенез. Дефензины стимулируют синтез хемокинов, цитокинов и обладают иммуномодулирующим действием. Дефензины относятся к иммунозащитным пептидам и продуцируются иммунной системой большинства многоклеточных организмов, играют главную роль как молекулы-эффекторы врожденного иммунитета. Дефензины обладают широким спектром биологических свойств от прямого убивания проникающего патогена до модулиро-

вания иммунных и других биологических реакций организма-хозяина. Дефензины выполняют важные функции во многих клинически значимых патологических процессах. Эндотоксин может вызывать или ускорять иммунное воспаление через нежественные механизмы и стимулирует выработку дефензинов, являющихся достаточно информативными маркерами остроты воспалительного процесса.

Таким образом, изменения показателей АМП у новорожденных детей позволяет использовать их как дополнительные критерии для характеристики воспалительного процесса при сепсисе, прогноза исхода и оценки степени иммунодефицита. Установлено статистически значимое изменение концентрации АМП (дефензинов, эндотоксинов) в сыворотке крови и возможности использования этих показателей в своевременной диагностике и определении тяжести поражения неонатального сепсиса у новорожденных детей.

Оценивая значимость АМП маркеров, следует учитывать, что на иммунный статус больных, полностью соответствующих критериям сепсиса, влияют как характер патологического процесса, так и множество ключевых параметров, свойственных тяжелой инфекции.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Cohen J. Sepsis: a roadmap for future research // *Lancet Infect Dis.* 2015, v.15(5), p.581-614. doi:10.1016/S1473-3099(15)70112-X.
2. Шлапбах Л. Влияние сепсиса на результаты развития нервной системы в швейцарской национальной когорте крайне недоношенных детей. *Педиатрия* 128, е.348 – е.357 (2011).
3. Флейшман-Струцек Ч.И. соавт. Глобальное бремя педиатрического и неонатального сепсиса: систематический *Ресур. Med.* 6, 223–230 (2018).
4. Martin R.J., Fanarov A.A., Walsh M.S. Neonatal-Perinatal Medicine Fanarov's and Martin's: Fetal and Infant Diseases. Philadelphia: Saunders/ Elsevier, 2011.
5. Wafaisade A., Lefering R., Bouillon B. et al. Epidemiology and Risk Factors of Sepsis after Multiple Trauma. An Analysis of 29,829 Patients from the Trauma Registry of the German Society for Trauma Surgery // *Crit. Care Med.* 2011, Vol. 39, N. 4, P. 621–628.
6. Wiesner J. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system / J. Wiesner, A. Vilcinskas // *Virulence. Sep- Oct, 2010, Vol. 1 (5), P. 440-464.*
7. Эндogenous антимикробные пептиды человека / В.Т. Азимова, Н.И. Потатуркина-Нестерова, А.С. Нестеров // *Современные проблемы науки и образования.* 2015, № 1. [Электронный ресурс]. URL www.scienceeducation.ru/121-17746.
8. Нашкевич Н.Н. Альфа-дефензины – мультифункциональные молекулы нейтрофилов: роль в воспалении и инфекционной патологии человека / Н.Н. Нашкевич // *Современные проблемы инфекционной патологии человека, сборник научных трудов, выпуск 6.* – Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии. Минск, 2013, С. 221-226.
9. Будихина А.С., Пинегин Б.В. Дефензины мультифункциональные катионные пептиды человека // *Имунопатология, аллергология, инфектология.* 2008. № 2, С. 31-40.
10. Umasuthan N., Mothishri M.S., Thulasitha W.S., Nam B.H., Lee J. Molecular, genomic, and expressional delineation of a piscidin from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) with evidence for the potent antimicrobial activities of Of-Pis1 peptide. *Fish Shellfish Immunol.*, 2016, vol. 48, pp. 154–168. doi: 10.1016/j.fsi.2015.11.
11. Гришин Д.В., Соколов Н.Н. Дефензины- естественные пептидные антибиотики высших эукариот // *Биомедицинская химия.* 2014. Т. 60. № 4, С. 438-447.
12. Bahri R. Candida famata modulates toll-like receptor, beta-defensin, and pro inflammatory cytokine expression by normal human epithelial cells / R. Bahri, D.Saidane-Mosbahi, M. Rouabhia // *J. Cell. Physiol,* 2010, Vol. 222, № 1, P. 209.
13. Kim J.Y. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity/ J.Y. Kim, S.C. Park, I. Hwang et al. // *Int. J. Mol. Sci,* 2009, Vol.10, P. 2860.
14. Опарина О.Н. Роль эндотоксина грамотрицательных бактерий кишечника в физиологических и патологических проявлениях стресса / О.Н. Опарина // *Современные научные исследования и инновации.* – 2014. – № 5. [Электронный ресурс]. – URL: <http://web.snauka.ru/issues/2014/05/32845>. Некоммерческое партнёрство (ассоциация) специалистов лабораторной диагностики Иркутской области. Эндogenous антимикробные пептиды и белки. - URL: http://asld.baikal.ru/index.php?id=52&Itemid=53&option=com_content&task=view (дата обращения: 20.10.14).
15. Steintraesser, L. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality / L. Steintraesser // *Immunobiology.* - 2010; doi:10.1016/j.imbio.2010.07.003.
16. Li X., Duan D., Yang J., Wang P., Han B., Zhao L., Jepsen S., Dommisch H., Winter J., Xu Y. The expression of human β -defensins (hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4) in gingival epithelia // *Arch Oral Biol.* 2016. Jun. Vol. 66. P. 15—21.

17. Bedi T., Mahendra J., Ambalavanan N. Defensinsin periodontal health // Indian J Dent Res. 2015. Jul-Aug. Vol. 26. N 4, P. 340—344.

18. Колиуш О.И. Функциональная взаимосвязь липополисахарид-связывающего белка и иммунных нарушений в патогенезе хронического вирусного гепатита С: автореферат диссертации на звание кандидата медицинских наук / О.И. Колиуш. – Київ, 2005.

19. Левитан Б.Н. Антитела к микробным липополисахаридам и синдром эндотоксемии при хронических гепатитах и циррозах печени / Б.Н. Левитан, А.Р. Умерова, Г.Б. Левитан // Медицинский вестник Северного Кавказа 2008, № 1, т. 9, с. 10-14.

20. Remington J. C. Infectious diseases of the fetus and newborn. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders /Elsevier, 2011.

XÜLASƏ

Yenidoğulmuş uşaqlarda neonatal sepsisin proqnozlaşdırılmasında antimikrob peptidlərin rolu

Kərimova N.T.¹, Əfəndiyev A.M.²

*K.Y.Fərəcova adına Elmi-Tədqiqat Pediatriya İnstitutu¹
Azərbaycan Tibb Universiteti, biokimya kafedrası²*

Açar sözlər: vaxtında- və vaxtıdan əvvəl doğulmuş uşaqlar, antimikrob peptidlər, defenzin, endotoksin, neonatal sepsis.

Tədqiqatın məqsədi kompleks şəkildə aparılmış laboratoriya müayinələrin məlumatları əsasında müxtəlif hestasiya yaşlarında olan yenidoğulmuş körpələrdə sepsisin inkişaf meyarlarını müəyyənləşdirməkdir. Yenidoğulanlarda sepsis zamanı qan zərdabında antimikrob peptidlər-defenzin, endotoksinlərin müayinəsi zamanı statistik dəyişikliklər müşahidə olunmuşdur. Bu göstəricilərin neonatal sepsis diaqnozunun vaxtında qoyulmasında və xəstəliyin gedişinin ağırlıq dərəcəsinin müəyyən olunmasında əhəmiyyəti aşkar edilmişdir.

SUMMARY

The role of AMR-s and prediction of neonatal sepsis in newborn children

Kerimova N.T.¹, Afandiev A.M.²

*Scientific Research Institute of Pediatrics named after K.J.Farajova¹
Azerbaijan Medical University, Department of biochemistry²*

Keywords: full-term and premature septic babies, AMP (antimicrobial peptides), defensins, endotoxins, neonatal sepsis.

The aim of this study was to determine the criteria for the implementation of sepsis in newborns of different gestational ages on the basis of comprehensive laboratory data. A statistically significant change in the concentration of AMP-defensins, endotoxins in serum and the possibility of using these indicators in timely diagnosis and determination of the severity of neonatal sepsis course in newborn children has been identified.

Kərimova Nazilə Tələt qızı

*K.Y.Fərəcova adına Elmi-Tədqiqat Pediatriya İnstitutu
E-mail: etplaboratoriya@mail.ru*

Redaksiyaya daxil olub: 19.09.2020

Çapa tövsiyə olunub: 16.10.2020

Rəyçi: prof., b.e.d. İslamzadə F.Q.