



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.3.027>



Керимова Н.Т.

Азербайджанский медицинский университет, Баку, Азербайджан

Роль эндогенных антимикробных пептидов, цитокинов при оценке тяжести течения сепсиса

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 22.08.2023

Принята: 25.09.2023

Контакты: mic_amu@mail.ru

Резюме

Целью данного исследования явилось изучение маркеров (АМП дефензинов, провоспалительных (IL-6), противовоспалительных (IL-8) цитокинов) и выявление их роли при сепсисе. Представляется возможным использование дефензинов, IL-6, IL-8 как дополнительных биомаркеров вирусных и бактериальных инфекций, количественного маркера динамики и степени тяжести при сепсисе. В статье представлены данные о свойствах и биологических действиях дефензинов, обладающих антибактериальной, противовирусной, провоспалительной активностью, и их роли в сепсисе, а также новые возможности использования представленных катионных антимикробных пептидов в диагностике и лечении септических состояний. Установлено статистически значимое изменение концентрации в сыворотке крови и возможности использования этого показателя в своевременной диагностике и определении тяжести поражения. Анализы были проведены стандартным методом твердофазного («сэндвич»-вариант) иммуноферментного анализа (ИФА) на автоматическом анализаторе ElisysUno.

Ключевые слова: доношенные и недоношенные септические новорожденные, АМП (антимикробные пептиды), дефензины, эндотоксины, провоспалительные цитокины (IL-6), хемокины (IL-8)

Kerimova N.

Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

Role of Endogenic Antimicrobial Peptides, Cytokines in Estimation of Sepsis Severity

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 22.08.2023

Accepted: 25.09.2023

Contacts: mic_amu@mail.ru

Abstract

The purpose of this study was to study markers (AMP defensins, pro-inflammatory (IL-6), anti-inflammatory (IL-8) cytokines) and identify their role in sepsis. It seems possible to use

defensins IL-6, IL-8 as additional biomarkers of viral and bacterial infections, a quantitative marker of the dynamics and severity of chronic sepsis.

The article presents data on the properties and biological action of defensins possessing antibacterial, antiviral, pro-inflammatory activity and their role in sepsis, as well as new possibilities of using the presented cationic antimicrobial peptides in the diagnosis and treatment of pathological conditions. A statistically significant change in the concentration in blood serum and the possibility of using this indicator in timely diagnosis and determination of the severity of the lesion were established. The determination was carried out by the standard method of solid-phase ("sandwich" version) ELISA analysis on an automatic analyzer "Elaysis Uno".

Keywords: term infants, preterm infants, septic children, AMR (antimicrobial peptides), diphenesins, endotoxins, pro-inflammatory cytokines, IL-6, IL-8

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема неонатального сепсиса остается одной из наиболее острых в интенсивной терапии новорожденных. По данным Hartman M.E., Richardson C.J. (2013), в США за период с 1995 по 2005 г. частота сепсиса у новорожденных удвоилась с 4,5 до 9,7 случая на 1000 живорожденных новорожденных детей [1, 2]. Летальность в отделениях интенсивной терапии остается высокой, несмотря на достигнутые успехи в ранней диагностике и лечении, и достигает, по данным разных авторов, от 13–15% до 30–40% в структуре неонатальной смертности [3, 4].

В предыдущие годы младенческая смертность быстро снижалась в первую очередь за счет управляемых причин (уменьшение смертности от инфекционных заболеваний, болезней органов дыхания и др.), а также благодаря совершенствованию технологий выхаживания недоношенных детей преимущественно с массой тела более 1000 г. Однако смертность детей с экстремально низкой массой тела и новорожденных с грубыми пороками развития относится к трудноуправляемым причинам.

Поздний неонатальный сепсис LONS (Late Onset Neonatal Sepsis) развивается в период 4–90 дней жизни, по сути являясь нозокомиальным. Среди основных возбудителей наиболее часто выделяют коагулазонегативные стафилококки, золотистый стафилококк, кишечную палочку, клебсиеллы, синегнойную палочку, энтеробактерии, кандиды, гемолитические стрептококки группы В и редко *Serratia*, *Acinetobacter* и анаэробы [5].

Среди факторов риска развития первое место занимает хориоамниониты и вагинальные материнские инфекции [6, 7]. По данным Chan G.J. (2013), лабораторно подтвержденные материнские инфекции увеличивают риск развития раннего неонатального сепсиса в 6,6 раза (95%). Факторы риска позднего неонатального сепсиса фактически идентичны внутрибольничной инфекции, особенно периода новорожденности, в частности у глубоко недоношенных детей. Негативным трендом последних лет стало глобальное распространение множественной устойчивости основных возбудителей сепсиса к антибиотикам [8, 9].

Врожденная иммунная система обеспечивает защиту организма от инфекций, вызывая воспаление и активируя адаптивный иммунитет. Важную роль в развитии процессов воспаления в поддержании и регуляции адаптивной иммунной системы

играют эндогенные антимикробные пептиды [10, 11]. Они являются неспецифическими факторами гуморального иммунитета, обладают эндотоксин-нейтрализующей и иммуномодулирующей активностью, а также обеспечивают защиту организма против широкого спектра микроорганизмов, грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов, вирусов [12, 13].

Дефензины относятся к иммунозащитным пептидам и продуцируются иммунной системой большинства многоклеточных организмов, играют главную роль как молекулы – эффекторы врожденного иммунитета [14]. Кателицидины и дефензины являются хемоаттрактантами для клеток иммунной системы. Они усиливают выработку цитокинов, способствуя высвобождению гистамина из тучных клеток. Дефензины, в том числе некоторые α -дефензины человека, являются сигнальной молекулой для моноцитов, Т-клеток, незрелых дендритных клеток.

Помимо всего вышеперечисленного, дефензины экспрессируются на всем протяжении репродуктивного тракта женщин, где выполняют ряд функций, которые играют ключевую роль в сохранении и защите плода во время беременности [15, 16]. Иммунологическая реакция организма на грамотрицательные бактерии проявляется в лейкоцитозе и продукции цитокинов: фактор некроза опухоли (TNF- α), интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-6 (IL-6). Высвобождая экзотоксины, грамположительные бактерии приводят к различным клеточным реакциям и выбросу цитокинов с относительно низким уровнем TNF- α , IL-1, IL-6 и повышенным уровнем IL-8 [17].

Ответ организма на грамотрицательную флору чрезмерно выражен, а это приводит к дисбалансу про- и противовоспалительных цитокинов, что часто вызывает септический шок и полиорганную недостаточность, ДВС-синдром.

Повышение уровня общего билирубина, прямого и непрямого билирубина, АсАТ, АлАТ является неблагоприятным прогнозом у доношенных и недоношенных новорожденных детей. Уровень этих показателей был повышен у всех пациентов по сравнению с нормой в I и II группах.

Дефензины являются иммунозащитным методом и продуцируются иммунной системой, играют важную роль во врожденном иммунитете. Исходя из этого, можно сказать, что дефензины можно использовать в оценке степени иммунодефицита у новорожденных.

Дефензины обладают выраженным бактерицидным действием и способны усиливать альтерацию в зоне воспаления вследствие повреждения клеток организма. Дефензины привлекают в очаг инфекции различных участников иммунных реакций, к примеру моноциты, незрелые дендритные клетки, 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 самими различными клетками провоспалительных цитокинов.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оптимизация диагностики и терапии сепсиса у детей периода новорожденности на основе оценки иммунных реакций и биологических особенностей возбудителя.

Изучение клинико-лабораторных особенностей неонатального сепсиса, обусловленного грамотрицательными и грамположительными бактериями. Изучение количества в крови α -дефензина, IL-6, IL-8 у детей с неонатальным сепсисом.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в НИИ педиатрии им. К.Я. Фараджевой, г. Баку. Работа выполнена в отделениях патологии новорожденных, анестезиологии и интенсивной терапии. По ГВ была исследована кровь 80 новорожденных детей. Все новорожденные дети были разделены на 3 группы:

I группа – 17 новорожденных детей (ГВ 38–41 неделя);

II группа – 33 новорожденных ребенка (ГВ 27–37 недель);

III группа контрольная – 30 новорожденных детей.

Контрольную группу составляли 30 здоровых новорожденных детей из родильного дома № 7 г. Баку.

Количество инфицированных новорожденных со сроком гестации 38–41 неделя в среднем составляло $37,8 \pm 0,2$, со сроком гестации 27–37 недель – $32,8 \pm 0,5$. В группе наблюдавшихся доношенных новорожденных детей при рождении масса тела составляла $3181 \pm 107,9$ г. У недоношенных новорожденных детей масса тела составляла $1983 \pm 91,5$ г.

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 ElisysUno производства Германии. Были использованы наборы DEF-a1 фирмы USCN (KHP), IL-6, IL-8 фирмы «Вектор Бест» (РФ). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью U-критерия Уилкоксона (Манна – Уитни).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сепсисе у новорожденных имеются нарушения иммунного ответа, которые, несомненно, требуют коррекции, но эта коррекция должна производиться лишь после установления конкретного нарушенного звена иммунореактивности и носить строго целенаправленный характер. Перспективным направлением терапии сепсиса новорожденных могло бы быть использование методов иммунотерапии, направленных на усиление клеточных реакций иммунитета; однако, исходя из потенциальной опасности стимулирования циркулирующих в крови новорожденных материнских лимфоцитов, необходима разработка четких рекомендаций по использованию этих методов терапии у новорожденных детей.

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

При исследовании I группы общий билирубин составлял $154,4 \pm 25,3$ при норме 2,0–17,1 мкмоль/л, прямой билирубин – $23,6 \pm 3,8$ при норме 2,0–0,42 мкмоль/л, непрямой билирубин – $131,6 \pm 24,3$ при норме 2,0–17,1 мкмоль/л, АлАТ – $95,0 \pm 35,1$ при норме 10–45 МЕ/мл, АсАТ – $109,5 \pm 45,2$ при норме 10–380 МЕ/мл; во II группе



Таблица 1

Биохимические данные новорожденных детей с сепсисом в сравнении с контрольной группой

Table 1

Biochemical data of newborn children with sepsis in comparison with the control group

Показатели	Нормальная величина	I группа (n=17), доношенные	II группа (n=33), недоношенные	P1
Общий билирубин, мкмоль/л	2,0–17,1	154,4±25,3 (52–432)	150,6±12,5 (62–320)	0,546
Прямой билирубин, мкмоль/л	2,0–0,42	23,6±3,8 (10–50)	22,3±3,0 (10–72)	0,652
Непрямой билирубин, мкмоль/л	2,0–17,1	131,6±24,3 (34–90)	131,1±11,2 (50–280)	0,346
АлАТ, МЕ/мл	10–45	95,0±35,1 (21–300)	51,0±10,1 (28–118)	0,202
АсАТ, МЕ/мл	10–38	109,5±45,2 (28–380)	59,8±13,9 (30–160)	0,135

Примечание: p1 – статистическая значимость различий между показателями I и II групп. Результаты представлены в виде M±m: M – среднее значение, m – стандартная ошибка, min–max – размах вариации (минимальное и максимальное значение ряда).

Таблица 2

Показатели АМП (дефензинов, IL-6, IL-8) у новорожденных детей с сепсисом

Table 2

Indicators of AMPs (defensins, IL-6, IL-8) in newborns with sepsis

Параметры	Доношенные		p	Недоношенные		p	p1
	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
IL-6, pq/ml	3,3±0,2 (1,7±5,6)	51,7±5,3 (11,2±77,2)	<0,001	3,1±0,3 (3,8±2,1)	50,7±3,2 (16,8±74,3)	<0,001	0,673
IL-8, pq/ml	11,8±0,37 (6,7±15,1)	347,6±9,0 (236,3±398,4)	<0,001	12,3±0,4 (13,4±10,8)	313,0±11,4 (134–396,1)	<0,001	0,202

Примечание: статистическая значимость различий: p – с показателями соответствующей контрольной группы; p1 – между показателями основных групп.

общий билирубин составлял 150,6±12,5, прямой билирубин – 22,3±3,0, непрямой билирубин – 131,1±11,2, АлАТ – 51,0±10,10, АсАТ – 59,8±13,9 (табл. 1).

При исследовании было выявлено, что количество дефензинов в сыворотке крови в I группе увеличивается в 16,6 раза – 806,6±58,6 нг/мл, при контроле – 48,4±1,3 нг/мл, во II группе в 17,6 раза – 740,3±40,1 нг/мл, при контроле – 41,9±4,2 нг/мл.

Повышение количества дефензина отражает степень активации нейтрофилов (табл. 2).

В сравнении с активностью воспалительного процесса у доношенных и недоношенных новорожденных детей с диагнозом «сепсис» мы изучали также содержание провоспалительных цитокинов интерлейкина IL-6, IL-8. Количество интерлейкина-6 в I группе составляло 51,7±5,3 pq/ml, увеличиваясь в 17,4 раза при сравнении с контрольной группой – 3,3±0,2 pq/ml, а во II – 50,7±3,2 pq/ml, увеличиваясь в 1,06 раза при сравнении с контрольной группой – 3,1±0,3 pq/ml.

Количество интерлейкина-8 в I группе составляло $347,6 \pm 9,0$ pg/ml, увеличиваясь в сравнении с контрольной группой в 21,8 раза – $11,8 \pm 0,37$ pg/ml, а во II группе – $313,0 \pm 11,4$ pg/ml, увеличиваясь в сравнении с контрольной группой в 10,8 раза – $12,3 \pm 0,4$ pg/ml (табл. 2).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение изменения количества антимикробных пептидов у недоношенных и доношенных новорожденных детей с сепсисом дает возможность использовать их как дополнительные критерии для характеристики воспалительного процесса при сепсисе.

Таким образом, резюмируя вышесказанное, можно подчеркнуть, что особенно-стью течения неонатального сепсиса на современном этапе является то, что стираются различия между ранним и поздним сепсисом в отношении как гестационного возраста и веса детей, так и факторов риска и даже представителей грамположительных и грамотрицательных штаммов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Anderson-Berry A.L., Rosenkrantz T. Neonatal sepsis. 2014. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/978352-overview#a0101>.
2. Chan GJ, Lee AC, Baqui AH, Tan J, Black RE. Risk of early-onset neonatal infection with maternal infection or colonization: a global systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2013;10(8):1001502.
3. Hartman E., Linde-Zwirble W.T., Angus D.C., Watson R.S. Trends in the epidemiology of pediatric severe sepsis. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2013;14(7):686–693.
4. Malloy M.H. Chorioamnionitis: epidemiology of newborn management and outcome United States. *Journal of Perinatology.* 2014. doi:10.1038/jp.2014.81
5. Manortey S., et al. Verbal autopsy: an analysis of the common causes of childhood death in the Barekese sub-district of Ghana. *Journal of Publ. Health in Africa.* 2011;2(2). doi:10.4081/jphia.2011.e18
6. Mathur N.B. *Neonatal sepsis.* Elsevier; 2010. 104 p.
7. Newborn numbers. *Healthy Newborn Network.* 2014;7. Available at: <http://www.healthynewbornnetwork.org/page/newborn-numbers>.
8. Thomas W., Speer C. P. Chorioamnionitis: important risk factor or innocent bystander for neonatal outcome? *Neonatology.* 2011;99:177–187.
9. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014. Available at: <http://www.who.int/drugresistance/en>.
10. Azimova V.T., Potaturkina-Nesterova N.I., Nesterov A.S. Human endogenous antimicrobial peptides. Modern problems of science and education. 2015;(1). Available at: www.science-education.ru/121-17746 (accessed 05.07.2015).
11. Kas'yanova T.R. Hemodynamic disorders and myocardial dysfunction in chronic hepatitis and liver cirrhosis (PhD Theses). Astrahan'; 2014. 47 p.
12. Nashkevich N.N. Alpha-defensins are multifunctional molecules of neutrophils: role in inflammation and infectious pathology of humans. In: Ministry of Health of the Republic of Belarus, Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology. Modern problems of human infectious pathology. Collection of scientific papers. Issue 6. Minsk; 2013. P. 221–226.
13. Wiesner J., Vilcinskis A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence.* 2010 Sep-Oct;1(5).
14. Bedi T., Mahendra J., Ambalavanan N. Defensins in periodontal health. *Indian J Dent Res.* 2015 Jul-Aug;26(Issue 4):340–344.
15. Kim J.Y. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2009;10(6):2860–72.
16. Bahri R. Candida famata modulates toll-like receptor, beta-defensin, and proinflammatory cytokine expression by normal human epithelial cells. *J Cell Physiol.* 2010;222(1):209–218.
17. Bedi T., Mahendra J., Ambalavanan N. Defensins in periodontal health. *Indian J Dent Res.* 2015 Jul-Aug;26(Issue 4):340–344.