

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, СОВРЕМЕННЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ НЕОНАТАЛЬНОГО СЕПСИСА

Керимова Н.Т.

Азербайджанский медицинский университет, Баку, e-mail: etplaboratoriya@mail.ru

В представленной научной статье изложены биологические действия и свойства антимикробных пептидов (АМП), дефензинов, эндотоксинов, обладающих антибактериальной, противовирусной и противовоспалительной активностью. Дефензины относятся к иммунозащитным пептидам и продуцируются иммунной системой, играя главную роль как молекулы-эффекторы врожденного иммунитета. Целью данного исследования было определение критериев развития сепсиса у новорожденных разного гестационного возраста на основе комплексного анализа биохимических и иммунологических данных. В статье представлены возможности использования данных АМП в диагностике и лечении патологических состояний, в том числе при сепсисе. Были определены критерии диагностики у новорожденных детей с сепсисом по уровню цитокинов в сыворотке крови. Определение было проведено стандартным методом твердофазового («сэндвич» вариант) иммуноферментного анализа на автоматическом анализаторе «ElisysUno» (Германия). Были обследованы 50 новорожденных детей с сепсисом, 17 из которых доношенные, 33 недоношенные, и 30 здоровых новорожденных – контрольная группа. Полученные данные были подвергнуты статистической обработке с вычислением U-критерия Уилкоксона (Манна – Уитни). Установлено статистически значимое изменение концентрации указанных показателей в сыворотке крови и возможности их использования в своевременной диагностике и определении тяжести поражения септических детей. Выявлена зависимость между показателями АМП, дефензинов, эндотоксинов, провоспалительных (ИЛ-6, ИЛ-8) цитокинов в сыворотке крови и клиническими проявлениями инфекции. Помимо этого повышение уровней билирубина, АСАТ, АЛАТ является показателем ухудшения состояния и неблагоприятным прогнозом у новорожденных детей с сепсисом. Изменения этих показателей дают возможность прогнозировать течение воспалительного процесса у новорожденных детей при данной патологии. Результаты исследования дают основание утверждать, что изменения иммунологических и биохимических показателей и содержания АМП у доношенных и недоношенных детей с сепсисом позволяют использовать их как дополнительные критерии для характеристики воспалительного процесса при сепсисе, прогноза исходов и оценки степени иммунодефицита.

Ключевые слова: доношенные и недоношенные новорожденные, сепсис, антимикробные пептиды, дефензины, эндотоксины, провоспалительные цитокины, интерлейкин-6, интерлейкин-8

BIOCHEMICAL FEATURES AS MODERN LABORATORY PROGNOSTIC CRITERIA FOR NEONATAL SEPSIS

Kerimova N.T.

Department of biochemistry of Azerbaijan Medical University, Baku, e-mail: etplaboratoriya@mail.ru

The presented scientific article describes the biological actions and properties of antimicrobial peptides (AMP), defensins, endotoxins, which have antibacterial, antiviral and anti-inflammatory activity. Defensins are immunoprotective peptides and are produced by the immune system, they play a major role as innate immune effector molecules. The aim of this study was to determine the criteria for the development of sepsis in newborns of different gestational ages based on a comprehensive analysis of biochemical and immunological data. The article presents the possibilities of using AMP data in the diagnosis and treatment of sepsis. The criteria for diagnostics in newborns with sepsis were determined by the level of cytokines in the blood serum. The determination was carried out by the standard method of solid-phase (“sandwich” version) enzyme-linked immunosorbent assay on an automatic analyzer “ElisysUno” (Germany). We studied 50 newborns with sepsis, 17 of which were full-term, 33 premature, and 30 healthy newborns – the control group. The data obtained were subjected to statistical processing with the calculation of the Wilcoxon U-test (Mann-Whitney). A statistically significant change in the concentration of these indicators in the blood serum and the possibility of their use in timely diagnosis and determination of the severity of lesions in septic children were established. A relationship was revealed between the parameters of AMP, defensins, endotoxins, pro-inflammatory (IL-6, IL-8) cytokines in the blood serum and clinical manifestations of infection. In addition, an increase in the levels of bilirubin, ASAT, ALAT is an indicator of the deterioration of the condition and a poor prognosis in newborns with sepsis. Changes in these indicators make it possible to predict the course of the inflammatory process in newborns with sepsis. The results of the study suggest that changes in immunological and biochemical parameters and AMP content in term and premature infants with sepsis make it possible to use them as additional criteria for characterizing the inflammatory process in sepsis, predicting outcomes and assessing the degree of immunodeficiency.

Keywords: full-term and premature infants, sepsis, antimicrobial peptides, defensins, endotoxins, pro-inflammatory cytokines, interleukin-6, interleukin-8

Сепсис – одна из наиболее сложных и до конца не изученных проблем здравоохранения. Тяжелое течение сепсиса и септический шок, встречающиеся согласно

статистике, примерно в 2/3 всех случаев заболевания, все еще остаются наиболее частыми причинами смерти пациентов в отделениях интенсивной терапии. Несмотря

на создание новых, эффективных методов борьбы с сепсисом, ежегодно во всем мире регистрируется более 18 млн случаев заболевания, летальность же колеблется на уровне 50–80% [1, 2].

Наибольшая заболеваемость сепсисом среди всех возрастных групп наблюдается у новорожденных и составляет около 3 млн детей во всем мире (22 на 1000 живорождений) со смертностью 11–19% и выраженными многочисленными долговременными неврологическими нарушениями [3, 4]. У новорожденных с повышением температуры тела в течение более 1 часа, не вызванным экологическими причинами и превышающим 39°C, чаще встречаются бактериемия, менингит, пневмония, а также патологии, связанные с вирусными заболеваниями, в частности герпес-симплексным энцефалитом [5]. Респираторное расстройство, включая тахипноэ, хрюканье, расширение носа и ретракцию дыхательных мышц, может быть единственным проявлением сепсиса с пневмонией или без нее и может быть изначально спутано с переходящим тахипноэ у новорожденного. У новорожденных с сепсисом быстрое клиническое ухудшение наступает, если не начато своевременное управление антибиотиками. Сепсис новорожденных может осложняться метастатическими очагами инфекции, диссеминированным внутрисосудистым свертыванием, застойной сердечной недостаточностью и шоком [6]. Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) играют важную роль в регулировании адаптивной иммунной системы, а также в развитии процессов воспаления [7]. Врожденная иммунная система, защищая организм от инфекций, активирует адаптивный иммунитет. Противомикробные пептиды являются неспецифическими факторами гуморального иммунитета, обладают иммуномодулирующей и нейтрализующей активностью эндотоксина, а также обеспечивают защиту организма от различных микроорганизмов, включая бактерии, вирусы и грибы. Основная функция эндогенных антимикробных пептидов – это поддержание приобретённого иммунитета [8, 9].

Дефензины выступают в роли активных хемоаттрактантов для клеток иммунной системы, увеличивая синтез цитокинов. Так, α -дефензины за счет IFN α , ИЛ-10 и ИЛ-6 в условиях *in vitro* способны повысить адгезию Т-лимфоцитов к эпителиоцитам легких [6, 10], а HNP-1, активируя гены синтеза некоторых хемокинов, может опосредованно выступать в роли хемоаттрактанта для моноцитов [6]. Хемотаксическое действие дефензинов проявля-

ется при очень низких их уровнях, что значительно меньше концентраций, требуемых для уничтожения микробов [2, 3, 11].

Дефензины, будучи иммунопротекторными пептидами, обладают широким спектром биологических свойств, от прямой способности уничтожения патологического агента до модуляции иммунных ответов и регулирования воспалительного процесса [10]. При воспалительных процессах активация нейтрофилов приводит к скоростному высвобождению альфа-дефензинов. Это приводит к повышению их концентрации в плазме крови, что создает проблему в предотвращении цитопатического действия по отношению к собственным клеткам [12]. В условиях патологии, в частности при сепсисе, концентрация альфа-дефензинов значительно увеличивается. Помимо этого, немаловажна роль альфа-дефензинов в защите от таких инфекций, как ВИЧ и летальная легочная патология в результате адаптированного к мыши штамма SARS-коронавируса [13, 14].

Имеется закономерность в реакции организма на грамотрицательные бактерии, отличающаяся от аналогичных ответных реакций при грамположительной инфекции. Так, в первом случае наблюдается повышение продукции некоторых цитокинов: фактора некроза опухоли (TNF- β), интерлейкина-1 (ИЛ-1), интерлейкина-6 (ИЛ-6), что, соответственно, приводит к дисбалансу про- и противовоспалительных цитокинов, являясь патогенетической основой септического шока и полиорганной недостаточности, а нередко и ДВС-синдрома [15].

При неонатальном сепсисе количество цитокинов в крови резко увеличивается. Это происходит еще до увеличения белков острой фазы. Количество некоторых цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, TNF- α) увеличивается быстрее у новорожденных в ответ на бактериальную инфекцию. Это увеличение можно наблюдать еще до появления признаков и симптомов сепсиса у новорожденных. Поскольку цитокины не проникают через плацентарный барьер, увеличение этих цитокинов наблюдается в образцах крови, взятых из пуповины. Это позволяет судить о возможности развития сепсиса у новорожденных в первые часы жизни, а также прогнозировать последующее течение сепсиса. Из них более информативными считаются ИЛ-6 и ИЛ-8. Количество интерлейкина-6 выше при раннем сепсисе. ИЛ-8 – это провоспалительный цитокин, который ускоряет активацию нейтрофилов и хемотаксис. ИЛ-8 является не только маркером сепсиса, но и индикатором степени тяжести инфекции [15–17].

Целью исследования явилось определение критериев развития сепсиса у новорожденных различного гестационного возраста на основе комплексного анализа клинико-анамнестических, биохимических и иммунологических данных.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились в научно-исследовательской лаборатории НИИ Педиатрии им. К.Я. Фараджевой, г. Баку. Работа выполнена в отделениях патологии новорожденных, анестезиологии, интенсивной терапии и реанимации. Была исследована кровь 80 новорожденных (50 – с сепсисом, 30 – здоровых). По гестационному возрасту (ГВ) все новорожденные дети были разделены на 2 группы:

В I группу входило 17 новорожденных детей (ГВ 38–41 неделя);

Во II группу входило 33 новорожденных (ГВ 27–37 недель).

Контрольную группу составляли 30 здоровых новорожденных детей, родившихся в родильном доме № 7 г. Баку.

Среди инфицированных новорожденных I группы средний срок гестации составил $37,8 \pm 0,2$ недель, II группы – $32,8 \pm 0,5$ недель. В группе наблюдавшихся доношенных новорожденных детей средняя масса тела при рождении была $3181 \pm 107,9$ г, у недоношенных этот показатель был равен $1983,6 \pm 91,5$ г.

Биохимическая оценка проводилась путем изучения маркеров общего, прямого и непрямого билирубина по методу Ендрашика; АЛАТ, АСАТ – по методике Рейтмана-Френкеля – с использованием наборов фирмы «HUMAN» (Германия). Определение концентрации АМФ проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) по принципу «сэндвича» – иммуноферментным методом.

Определение концентрации АМФ проводилось методом иммуноферментного анализа (ELISA) по принципу «сэндвич» – на иммуноферментном анализаторе «ElisysUno» производства Германии. Были использованы наборы DEF-a1 фирмы «USCN» (KHP), Endotoxin (ET) ELISA Kit фирмы «abbexa». Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью определения U-критерия Уилкоксона (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 детей с неонатальным сепсисом. Повышение уровней билирубина, прямого билирубина, непрямого билирубина, а также АСАТ и АЛАТ у доношенных и недоношенных новорожденных детей в I и II группах по сравнению с контрольной группой является маркером неблагоприятного прогноза (табл. 1).

При исследовании I группы общий билирубин составлял $154,4 \pm 25,3$ мкмоль/л при норме 2,0–17,1 мкмоль/л, прямой билирубин $23,6 \pm 3,8$ мкмоль/л при норме 2,0–0,42 мкмоль/л, непрямого билирубин $131,6 \pm 24,3$ мкмоль/л при норме 2,0–17,1 мкмоль/л, АЛАТ – $95,0 \pm 35,1$ МЕ/мл при норме 10–45 МЕ/мл, АСАТ – $109,5 \pm 45,2$ МЕ/мл при норме 10–38 МЕ/мл. II группе общий билирубин составлял $150,6 \pm 12,5$ мкмоль/л, прямой билирубин $22,3 \pm 3,0$, непрямого билирубин $131,1 \pm 11,2$ мкмоль/л, АЛАТ – $51,0 \pm 10,1$ МЕ/мл, АСАТ – $59,8 \pm 13,9$ МЕ/мл.

Таблица 1

Биохимические данные новорожденных детей с сепсисом в сравнении контрольной группой

Показатели	Нормальная величина	I группа (n = 17) доношенные	II группа (n = 33) недоношенные	p1
Общий билирубин, мкмоль/л	2,0–17,1	$154,4 \pm 25,3$ (52–432)	$150,6 \pm 12,5$ (62–320)	0,546
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

Примечание. 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: минимальное и максимальное значения ряда.

Таблица 2

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

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
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
ИЛ-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
ИЛ-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, ± 11,4 (134–396,1)	< 0,001	0,202

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

В табл. 2 представлены показатели АМП у новорожденных с сепсисом.

При исследовании было выявлено, что количество эндотоксина в I группе было повышено в 3,7 раза (1,541 ± 0,039) МЕ/мл, при контроле 0,410 ± 0,018 МЕ/мл, а во II группе в 4,6 раза (1,554 ± 0,017) МЕ/мл, при контроле 0,337 ± 0,019 МЕ/мл. Бактериальный эндотоксин, будучи постоянным структурным компонентом наружной клеточной стенки грамотрицательных бактерий, освобождается при их разрушении. Повышение количества дефензина отражает степень активации нейтрофилов (табл. 2).

Уровень 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, а во II группе – в 17,6 (740,3 ± 40,1 нг/мл) при контроле 41,9 ± 4,2 нг/мл.

Полученные данные свидетельствуют о значительных изменениях концентраций дефензинов в крови новорожденных с сепсисом, что объясняется их иммунопротекторными свойствами на фоне воспалительной реакции организма, что позволяет дефензинам выступать в роли прогностического маркера.

При анализе активности воспалительного процесса у доношенных и недоношенных новорожденных детей с диагнозом «Сепсис» мы изучали также содержание цитокинов: интерлейкина ИЛ-6, ИЛ-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 группе – 50,7 ± 3,2 pq/ml, что в 1,06 раза выше, чем в контрольной группе (3,1 ± 0,3pq/ml).

Количество интерлейкина-8 в I группе составляло (347,6 ± 9,0 pq/ml) увеличиваясь в сравнении с контрольной группой в 21,8 раза (11,8 ± 0,37 pq/ml), а во II группе – в 10,8 раза (313, ± 11,4 pq/ml) при контроле 12,3 ± 0,4 pq/ml. Повышение уровня интерлейкинов является закономерной реакцией иммунной системы, причем возникновение данных изменений часто происходит раньше клинических проявлений, что свидетельствует о дисбалансе системы цитокинов на ранних стадиях септического процесса.

Заключение

Количественное определение дефензинов может служить в качестве дополнительного маркера воспаления при сепсисе, что позволяет усовершенствовать диагностику и добиться прогресса в своевременном решении вопроса о проведении и правильном подборе терапии.

Комплексная оценка биохимических данных (билирубин, АСАТ, АЛАТ) вместе с изменениями показателей иммунного состояния и количества антимикробных пептидов у доношенных и недоношенных детей с сепсисом может использоваться в качестве критериев, характеризующих воспалительный процесс при сепсисе, а также помочь спрогнозировать результат и оценить степень иммунодефицитного состояния.

При оценке прогностической и диагностической значимости различных цитокинов и медиаторов иммунного ответа важен комплексный подход к определению иммунного статуса больного. Одновременное определение ИЛ-6 и ИЛ-8 позволяет судить

об иммунореактивности пациентов, так как эти цитокины сигнализируют об опасности раньше, чем клинические симптомы развития инфекционного осложнения становятся явными.

Список литературы

1. Antonopoulou A., Giamarellos-Bourboulis E.J. Immunomodulation in sepsis: state of the art and future perspective. *Immunotherapy*. 2011. Vol. 3. No. 1. P. 117–128.
2. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Мустафин И.Г. и др. Особенности иммунитета у новорожденных детей с локализованными и генерализованными формами бактериальных инфекций // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2015. № 5. С. 168–173.
3. Флейшманн С., Шераг А., Адхикари Н.К. и др. Оценка глобальной заболеваемости и смертности от госпитализированного сепсиса. Текущие оценки и ограничения. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016. Vol. 193 (3). P. 259–72.
4. Нашкевич Н.Н. Альфа-дефензины – мультифункциональные молекулы нейтрофилов: роль в воспалении и инфекционной патологии человека // *Современные проблемы инфекционной патологии человека, сборник научных трудов, вып. 6*. Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии. Минск, 2013. С. 221–226.
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 (4). P. 621–628.
6. 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. P. 154–168.
7. Гришин Д.В., Соколов Н.Н. Дефензины – естественные пептидные антибиотики высших эукариот // *Биомедицинская химия*. 2014. Т. 60. № 4. С. 438–447.
8. Gürsoy M., Gürsoy U.K., Liukkonen A., Kauko T., Penkala S., Könönen E. Salivary antimicrobial defensins in pregnancy. *J Clin Periodontol*. 2016. Oct. Vol. 43. No. 10. P. 807–815.
9. Азимова В.Т., Потатуркина-Нестерова Н.И., Нестеров А.С. Эндогенные антимикробные пептиды человека // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. № 1–1. [Электронный ресурс]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=17746> (дата обращения: 03.07.2021).
10. Опарина О.Н. Роль эндотоксина грамотрицательных бактерий кишечника в физиологических и патологических проявлениях стресса // *Современные научные исследования и инновации*. 2014. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <http://web.snauka.ru/issues/2014/05/32845> (дата обращения: 03.07.2021).
11. Yamaguchi Y., Ouchi Y. Antimicrobial peptide defensin: identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 2012. Vol. 88(4). P. 152–166.
12. Bedi T., Mahendra J., Ambalavanan N. Defensins in periodontal health. *Indian J Dent Res*. 2015. Jul-Aug. Vol. 26. Issue 4. P. 340–344.
13. Nakatsuji T., Gallo R.L. Antimicrobial peptides: Old molecules with new ideas. *J. Invest. Dermatol*. 2012. Vol. 132. P. 887–895. [CrossRef].
14. Мирошниченко Ю.А., Шестопалов А.В., Смольянинова Л.П. Роль факторов врожденного иммунитета слизистой оболочки репродуктивного тракта // *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2013. № 1. С. 11–15.
15. Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Лазарева М.А. Цитокиновый ответ и другие отличительные особенности критических фаз системного воспаления при сепсисе // *Медицинская иммунология*. 2014. Vol. 16 (2). P. 173–182. DOI: [org/10.15789/1563-0625-2014-2-173-182](https://doi.org/10.15789/1563-0625-2014-2-173-182).
16. Рябкова Н.Л., Везикова Н.Н. Эволюция лабораторных маркеров системных бактериальных инфекций // *Терапевтический архив*. 2017. Т. 89. № 11. С. 105–110. DOI: [10.17116/terarkh20178911105-110](https://doi.org/10.17116/terarkh20178911105-110).
17. Любимова М.А., Дунаева Е.В., Беляева Н.А. Течение раннего неонатального периода у новорожденных детей от матерей с гнойно-воспалительными изменениями в плаценте // *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2014. № 4. С. 320–321.