

УДК 616.155.194.125-022:612.017.11

ЭНДОГЕННЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА ПРИ ТАЛАССЕМИИ

Доц. Г. И. АЗИЗОВА, канд. биол. наук А. Р. ДАДАШОВА, доц. Г. Р. ВАГАБОВА,
доц. Р. Х. ДЖАФАРОВ

*Азербайджанский медицинский университет, Баку,
Азербайджанская Республика*

Проведено сравнительное изучение антимикробных пептидов – дефензина (HNP), белка, увеличивающего проницаемость мембран (BPI), и эндотоксина при β -талассемии. Определены биохимические (прямой и непрямой билирубин, щелочная фосфатаза, гемоглобин, ферритин, АСТ, АЛТ, средний объем эритроцитов (MCV)) и иммуноферментные показатели (IgA, IgM, IgG, фагоцитарная активность). Отмечено, что повышение уровня эндогенных антимикробных пептидов является маркером развития инфекционного процесса и отражает динамику изменений биохимических показателей и иммунного статуса организма.

Ключевые слова: дефензин, BPI, эндотоксин, β -талассемия, антимикробные пептиды.

По данным ВОЗ (2002), в мире насчитывается 80–90 млн носителей гена талассемии. Это заболевание встречается преимущественно в странах Средиземноморского бассейна, на Среднем Востоке с частотой носителей гена болезни от 2 до 25%. Талассемия распространена в Азербайджане, заболевание диагностируется у 7–10% населения отдельных низменных районов республики [1].

Опубликовано немало работ, в которых изучены изменения биохимических показателей иммунного статуса больных β -талассемией, однако данных об уровне секреции эндогенных антимикробных пептидов при данном заболевании недостаточно [2].

Цель данной работы – сравнительное изучение количества антимикробных пептидов – дефензина, белка, увеличивающего проницаемость мембран (BPI), и эндотоксина при β -талассемии, а также анализ взаимосвязи между биохимическими показателями, количеством железа и уровнем секреции антимикробных пептидов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда развития науки при Прези-

денте Азербайджанской Республики – Грант № EIF-2010–1(1)-03/015.

Проанализированы результаты биохимических и иммунологических исследований венозной крови 123 пациентов (72 мальчика, 51 девочка) с различными формами талассемии, находящихся на стационарном лечении в НИИ гематологии и трансфузиологии им. Б. Эйвазова Азербайджанской Республики. Возраст больных составил от 2 до 18 лет, из них в возрасте 1–4 года было 46, 5–7 лет – 30, 8–12 лет – 24, 13–18 лет – 23 пациента. Критериями включения детей и подростков в исследование были подтверждение диагноза β -талассемии, уточнение ее формы и возраст больного. Диагноз β -талассемии был установлен у всех детей исследованием фракций гемоглобина, а также на основе критериев ВОЗ клинической картины (размеры печени и селезенки), возраста ребенка в период первых клинических проявлений. Спленэктомия выполнялась у пациентов в возрасте 5 лет.

Все больные были разделены на три группы: в первую вошли пациенты с гетерозиготной

формой β -талассемии ($n = 41$, возраст — от 4 до 18 лет, 19 мальчиков и 22 девочки); во вторую — больные с гомозиготной формой до спленэктомии ($n = 41$, возраст — от 14 мес до 5 лет, 9 девочек и 32 мальчика); в третью — больные с гомозиготной формой после спленэктомии ($n = 41$, возраст — от 5 до 12 лет, 21 мальчик и 20 девочек). Контрольную группу составили 15 здоровых детей.

Уровни биохимических показателей устанавливались на автоматическом анализаторе Mindray BA-88A (Китай). Железо определялось фотометрическим методом с использованием феррена с помощью реактивов набора «Human Diagnostics Worldwide»; прямой билирубин — колориметрическим методом диазореактивом в кислой среде (метод Эндрасика); активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови — унифицированным методом по «конечной точке»; активность АЛТ и АСТ — методом Райтмана — Френкеля [3]. Гемоглобин крови определяли с помощью фотометрического метода с использованием железосинеродистого калия при длине волны 540 нм [4]. Ферритин изучался с помощью тест-системы на иммуноферментном анализаторе (ИФА) «Mindray MR-96A» (Китай).

Определение эритроцитарных показателей (количество эритроцитов, средний объем эритроцитов (MCV) и среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCH)) проводилось методом Коста [5].

Имуноферментные показатели IgA, IgM, IgG устанавливались методом Манчини, фагоцитарная активность — по способности фагоцитоза лейкоцитов [6].

Концентрацию антимикробных пептидов (дефензина, эндотоксина и ВР1) определяли методом ИФА коммерческим набором «Hycult Biotech» (США).

С целью сравнения динамики изменений антимикробных пептидов с состоянием метаболизма и иммунным статусом пациентов проведены биохимический и иммунологический анализы крови больных во всех группах. Полученные данные приведены в табл. 1.

Заметное повышение уровней прямого и непрямого билирубина, АЛТ наблюдается в третьей группе у больных β -талассемией после спленэктомии. Так, прямой билирубин увеличился в 1,99 раза, непрямого билирубин — в 1,34 раза, АЛТ — в 2,27 раза, что указывает на снижение функционального состояния печени. Отмечается резкое повышение уровней сывороточного железа, ферритина во всех группах: у больных первой группы — в 1,9 раза, второй — в 2,1 раза, третьей — в 3,25 раза, что указывает на его накопление в организме. Заметное снижение уровня гемоглобина отмечается в первой, второй и третьей группах соответственно в 1,02; 1,07 и 1,42 раза. Схожую динамику изменений продемонстрировали MCV и MCH.

Анализ полученных иммуноферментных показателей показывает повышение уровней IgA и IgG (табл. 2). Концентрация IgM заметно не изменяется. Так, например, в контрольной группе средний уровень IgG составил $14,40 \pm 0,21$ г/л, а у больных первой группы наблюдалось его повышение в 1,005 раза, второй — в 1,13 раза, третьей — в 1,27 раза.

Таблица 1

Биохимические и иммунные показатели у пациентов с β -талассемией

Показатель	Группы			
	контрольная, $n = 15$	первая, $n = 41$	вторая, $n = 41$	третья, $n = 41$
Конъюгированный билирубин (мкмоль/л)	2,42±0,15	2,39±0,17*	2,95±0,23*	4,8±0,37*
Свободный билирубин (мкмоль/л)	12,74±0,62	13,1±0,5*	14,5±0,78*	17,1±0,92*
Щелочная фосфатаза (Ед/л)	242,7±3,4	253,1±4,5	247,8±1,7	276,2±4,5
Гемоглобин (г/л)	108,2±1,2	105±2,3	101,2±2,4	76,1±0,92
Сывороточное железо (мкмоль/л)	17,95±0,38	33,4±1,2	37,5±0,13	58,5±7,1
Ферритин (нг/мл)	1625±114	1750±98	2104±117	3865±305
АЛТ (Ед/л)	0,51±0,03	0,62±0,07**	1,4±0,2**	1,16±0,07**
АСТ (Ед/л)	0,42±0,02	0,47±0,04**	0,54±0,07**	0,76±0,004**
Средний объем эритроцитов (MCV) (п/г)	89	76	73	70
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCH) (фл)	28,25	26	25	22
IgA (г/л)	1,84±0,05	1,92±0,07	2,1±0,07	2,4±0,05
IgM (г/л)	2,41±0,07	2,44±0,04	2,31±0,03	2,42±0,04
IgG (г/л)	14,40±0,21	14,47±0,22	16,2±0,4	18,3±0,7
Фагоцитарная активность (%)	36,5±2,5	32,3±2,6	23,3±1,3*	16,1±0,8

* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Показатели содержания антимикробных пептидов у пациентов с β -талассемией

Показатель	Группы			
	контрольная, <i>n</i> = 15	первая, <i>n</i> = 41	вторая, <i>n</i> = 41	третья, <i>n</i> = 41
HNP (pg/ml)	102,0±0,7 (100,4–107,4)	114,0±0,9* (109–119,3)	524,0±7,07* (320–1022)	1582±142,2* (1147–2836)
BPI (ng/ml)	0,222±0,019 (0,17–0,35)	1,035±0,020* (0,83–1,15)	4,53±0,117* (3,72–5,4)	7,93±1,179* (4,52–23,21)
LAL (EU/ml)	0,033±0,012 (0,004–0,09)	0,18±0,004* (0,16–0,2)	0,23±0,006* (0,202–0,254)	0,476±0,033* (0,33–0,65)

* $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Отмечалось снижение фагоцитарной активности лейкоцитов: у пациентов первой группы среднее значение данного показателя составило 32,3±2,6%, что в 1,13 раза ниже, чем у обследованных контрольной группы, второй группы – 23,3±1,3%, что в 1,56 раза ниже, а третьей группы – 16,1±0,8%, что в 2,27 раза ниже, чем в контроле. Полученные данные указывают на взаимосвязь биохимических и иммунных показателей при β -талассемии.

В качестве объекта исследования из эндогенных пептидов нами были выбраны дефензин (HNP), белок, увеличивающий проницаемость мембран (BPI), и эндотоксин, поскольку именно они представляют интерес при повышении восприимчивости к инфекциям, а также при инфекционных осложнениях, наблюдаемых при β -талассемии [7].

Результаты изучения уровня антимикробных пептидов отражены в табл. 2.

В первой группе, в которую входили гетерозиготные по β -талассемии пациенты, концентрация HNP составила 114±0,9 нг/мл, что на 10,8%, т. е. в 1,1 раза выше контроля. Во второй группе у больных до спленэктомии также наблюдалось повышение уровня дефензина на 409,7%, т. е. в 5 раз, что заметно выше, чем у пациентов первой группы. Минимальный уровень дефензина, установленный во второй группе, – 320 нг/мл, максимальный – 1022 нг/мл, что указывает на большую вариацию количества этого белка до спленэктомии, что, по-видимому, зависит от степени активации нейтрофилов. В третьей группе, в которую входили пациенты с гомозиготной формой β -талассемии после спленэктомии с большим количеством и частыми трансфузиями, уровень дефензина был повышен на 1438,8%, что в 15,4 раза выше по сравнению с контролем. В данной группе среднее значение содержания дефензина – 1582,1±142,2 нг/мл, минимальное – 1147 нг/мл и максимальное – 2836 нг/мл.

Данные по уровню BPI также показывают положительную динамику изменений: в первой группе наблюдается повышение на 366,3% (в 4,7 раза), во второй – на 1940,5% (в 20,4 раза) и в третьей – на 3474% (в 35,7 раза), что свидетельствует о значительных изменениях по сравнению с контролем.

При сравнении динамики изменений BPI и уровня увеличения дефензина наблюдается заметное различие. Объяснением этому, вероятно, является факт, что увеличение секреции BPI наиболее часто характерно для инфекционных заболеваний респираторного тракта. У больных β -талассемией гораздо чаще диагностируются именно болезни дыхательной системы бактериального происхождения, такие как бронхит, пневмония, вызванные грамотрицательными микроорганизмами [8].

Проведенный LAL-тест уровня эндотоксина также показал его повышение во всех группах больных. Динамика изменений этого показателя схожа с изменениями дефензина: в первой группе отмечается повышение на 443,8% (или в 5,4 раза), во второй – на 590,8% (или в 6,9 раза) и в третьей – на 1339,2% (или в 14,4 раза). Среднее значение уровня эндотоксина в контрольной группе составило 0,0331±0,012 нг/мл, в первой клинической группе – 0,18±0,004 нг/мл, во второй – 0,23±0,006 нг/мл, а в третьей – 0,476±0,033 нг/мл. Повышение уровня данного показателя объясняется, вероятно, изменением функционального состояния печени, поскольку метаболизм эндотоксина происходит в данном органе [9]. Полученные биохимические показатели, отражающие состояние печени, еще раз доказывают этот факт.

В результате проведенного исследования можно сделать следующие выводы.

При гомозиготной форме β -талассемии на фоне снижения фагоцитарной активности лейкоцитов и функционального состояния печени наблюдается повышение секреции дефензина до спленэктомии в 5,1 раза и после спленэктомии – в 15,4 раза.

В группе больных β -талассемией с частыми трансфузиями отмечается накопление железа, и на этом фоне происходит увеличение концентрации эндотоксина в плазме крови.

Частые инфекционные осложнения приводят к увеличению секреции BPI.

Повышение уровня эндогенных антимикробных пептидов является маркером развития инфекционного процесса и отражает динамику изменений биохимических показателей и иммунного статуса организма.

Список литературы

1. *Байтаева Д. А.* Наследственные аномалии гемопротеидов человека (этиопатогенез, диагностика и принципы лечения заболеваний): автореф. дис. на соискание уч. степени д-ра мед. наук; спец. 14.01.20 «Гематология» / **Д. А. Байтаева, Рос. НИИ гематологии и трансфузиологии.**— СПб., 2012.— 46 с.
2. Immunological evaluation of patients with beta-thalassemia major / R. Consolini, A. Calleri, A. Legitimo, F. Masei // *Acta Haematol.*— 2001.— Vol. 105.— P. 7–12.
3. *Kolb V. G., Kamishnikov V. S.* Handbook of Clinical Chemistry: 2nd ed. / V. G. Kolb, V. S. Kamishnikov.— Minsk: Belarus, 1982.— 367 p.
4. Immunological status of thalassemia syndrome / U. Ezer, F. Gulderen, V. K. Culha [et al.] // *Pediatr. Hematol. Oncol.*— 2002.— Vol. 19.— P. 51–58.
5. *Маянский Д. К.* Комплексная оценка функции фагоцитов при воспалительных заболеваниях: метод. рек. / Д. К. Маянский.— Новосибирск, 1985.— С. 50.
6. *Новиков Д. К.* Оценка иммунного статуса / **Д. К. Новиков, В. У. Новикова.**— Витебск: Изд-во ВМИ, 1996.— С. 281.
7. *Lehrer R. I.* α -Defensins in human innate immunity / R. I. Lehrer, W. Lu // *Immunol. Rev.*— 2012.— Vol. 245 (1).— P. 84–112.
8. *Schultz H.* The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease / H. Schultz, J. P. Weiss // *Clin. Chim. Acta.*— 2007.— Vol. 84 (1–2).— P. 12–23.
9. Immune functions in splenectomized thalassemic children / **J. Ahluwalia, U. Datta, R. K. Marwaha, S. Sehgal** // *Indian. J. Pediatr.*— 2000.— Vol. 67.— P. 871–876.

ЕНДОГЕННІ АНТИМІКРОБНІ ПЕПТИДИ ЯК МАРКЕРИ ІНФЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ ПРИ ТАЛАСЕМІЇ

Г. І. АЗИЗОВА, А. Р. ДАДАШОВА, Г. Р. ВАГАБОВА, Р. Х. ДЖАФАРОВ

Проведено порівняльне вивчення антимікробних пептидів — дефензину (HNP), білка, що збільшує проникність мембран (BPI), та ендотоксину при β -таласемії. Визначено біохімічні (прямий і непрямий білірубін, лужна фосфатаза, гемоглобін, феритин, АСТ, АЛТ, середній об'єм еритроцитів (MCV)) та імуноферментні показники (IgA, IgM, IgG, фагоцитарна активність). Зазначено, що підвищення рівня ендогенних антимікробних пептидів є маркером розвитку інфекційного процесу і відображає динаміку змін біохімічних показників та імунного статусу організму.
Ключові слова: дефензин, BPI, ендотоксин, β -таласемія, антимікробні пептиди.

ANDROGENIC ANTIMICROBIAL PEPTIDES AS MARKERS OF INFECTION PROCESS IN THALASSEMIA

G. I. AZIZOVA, A. R. DADASHOVA, G. R. VAGABOVA, R. H. JAFAROV

A comparative study of antimicrobial peptides, defensin (HNP), protein increasing permeability of membranes (BPI), and endotoxin in β -thalassemia was done. Biochemical (direct and indirect bilirubin, alkaline phosphatase, hemoglobin, ferritin, AST, ALT, mean corpuscular volume (MCV)) and immunoenzyme indicators (IgA, IgM, IgG, phagocytic activity) were determined. It was noted that increased level of endogenous antimicrobial peptides was a marker of infectious process and reflected the dynamics of the changes in biochemical parameters and immune status of the organism.
Key words: defensin, BPI, endotoxin, β -thalassemia, antimicrobial peptides.

Поступила 10.02.2014