

Значение эндогенных антимикробных пептидов в формировании иммунного статуса у больных с хроническим вирусным гепатитом С

А.М.Эфендиев, З.Г.Гидаятова, А.Р.Дадашова,
А.Г.Гаджиев
Азербайджанский медицинский университет,
Баку

Целью данного исследования явилось изучение маркеров эндотоксемии (дефензинов, эндотоксина и липополисахарид-связывающего белка) и выявление взаимосвязи с иммунными показателями в патогенезе хронического вирусного гепатита С. Представляется возможным использование дефензинов, эндотоксина, липополисахарид-связывающего белка как дополнительных биомаркеров вирусных и бактериальных инфекций, а эндотоксина – в качестве количественного маркера динамики и степени тяжести повреждения печени при хроническом гепатите С.

Ключевые слова: гепатит С, дефензины, липополисахарид-связывающий белок, эндотоксины, лимфоциты, циркулирующие иммунные комплексы.

The Importance of Endogenous Antimicrobial Peptides in the Formation of Immune Status in Patients with Chronic Viral Hepatitis C

A.M.Efendiev, Z.G.Gidayatova, A.R.Dadashova,
A.G.Gadzhiev
Azerbaijan Medical University, Baku

The aim of this research was to study the markers of endotoxemia (defensins, endotoxins, and lipopolysaccharide binding protein) and determine the relationship with immune indicators in pathogenesis of chronic viral hepatitis C. It is possible to use defensins, endotoxins, and lipopolysaccharide binding protein as additional biomarkers of viral and bacterial infections, while endotoxin can be used as a quantitative marker of dynamics and severity of liver damage in chronic hepatitis C.

Keywords: hepatitis C, defensins, lipopolysaccharide binding protein, endotoxins, lymphocytes, circulating immune complexes.

Во всем мире вирусом хронического гепатита С (ХВГС) поражено около 500 млн человек, и наблюдается хроническое прогрессирующее заболевание у

80% инфицированных лиц. Заражение характеризуется повреждением печени, что приводит к фиброзу и циррозу [1].

Достигнуты немалые успехи в изучении строения вируса гепатита С, в раскрытии тонких механизмов повреждения и регенерации паренхимы печени, развития фиброза, злокачественной трансформации гепатоцитов. Вместе с тем, многие вопросы патогенеза ХВГС остаются неисследованными. Значение факторов иммунитета и их роль в патогенезе хронического гепатита С изучены еще недостаточно [2]. 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. Они являются неспецифическими факторами гуморального иммунитета, обладают эндотоксин-нейтрализующей и иммуномодулирующей активностью, а также обеспечивают защиту против широкого спектра грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов, вирусов [3].

Учитывая тот факт, что эндотоксины грамотрицательных бактерий являются одними из ведущих патогенетических факторов при вирусном гепатите С [4], определяющих особенности их течения, актуальным является изучение маркеров эндотоксемии (дефензинов, эндотоксина и липополисахарид-связывающего белка) и выявление взаимосвязи с иммунными показателями в патогенезе хронического вирусного гепатита С, что и является целью данной работы.

Материал и методы

Была исследована кровь 87 больных в возрасте 17–38 лет, которые были разделены на 2 группы: I группа – 45 больных с хроническим вирусным гепатитом С и II группа – 42 больных ХВГС, осложненным бактериальной инфекцией (пневмония). Контрольную группу составляли 20 здоровых доноров.

Диагноз хронического вирусного гепатита был поставлен, согласно классификации Всемирного конгресса гастроэнтерологов (Лос-Анджелес, 1994). Биохимическая оценка осуществлялась путем изучения таких маркеров, как общий, прямой и непрямой билирубин по методу Ендрашика; АЛАТ, АсАТ – по методу Райтмана-Френкеля, активность фермента γ -глутамилтрансферазы и содержание общего белка – с использованием коммерческих наборов фирмы «Diasys» (Германия).

Определение концентрации эндотоксина и липополисахарид-связывающего белка (LBP) проводилось методом иммуноферментного анализа (ELISA) по принципу «сэндвич» – варианте на твердофазном иммуноферментном наборе фирмы «HyCult Biotechnology» (Нидерланды).

Для оценки состояния клеточного и гуморального звеньев иммунитета проводили определение субпопуляционного состава лимфоцитов в непрямой реакции поверхностной иммунофлюоресценции (НРИФ) с использованием мышинных моноклональных антител к антигенам лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD16⁺, CD25⁺. Определение общего количества циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) проводили методом преципитации 3,5% раствором полиэтиленгликоля.

Статистическую обработку данных проводили с помощью U-критерия Уилкинсона (Манна-Уитни). Значение $p < 0,05$ принималось как достоверное.

Показатели	Контроль (n=20)	I группа (n=45)	II группа (n=42)
Общий билирубин, мкмоль/л	16,3±0,7	18,3±0,7	17,2±0,4
Прямой билирубин, мкмоль/л	3,94±0,15	4,92±0,25*	4,52±0,36
Непрямой билирубин, мкмоль/л	12,74±0,62	15,92±0,68**	14,91±0,76
АлАТ, ммоль/ч л	0,51±0,03	1,16±0,12***	1,16±0,07***
АсАТ, ммоль/ч л	0,41±0,02	0,47±0,03	0,74±0,08**
γ-глутамилтрансфераза, МЕ/л	15,24±1,16	17,24±0,83	28,61±1,07***

Примечание. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ по сравнению с контролем.

Параметры	Контрольная группа (n=20)	I группа (n=45)	II группа (n=42)
Дефензины, нг/мл	38,6±3,8	297,0±17,5***	1467,3±27,7***
Эндотоксин, МЕ/мл	0,10±0,01	24,4±2,3***	57,7±5,2***
Протеин, связывающий ЛПС, нг/мл	23,6±4,2	138,7±8,9***	443,6±29,6***

Примечание. *** $p<0,001$ по сравнению с контролем.

Параметры	Контрольная группа (n=20)	I группа (n=45)	II группа (n=42)
CD3, %	62,40±1,52	58,07±1,36	59,71±1,41
CD4, %	32,10±1,38	26,65±1,49*	27,71±0,92**
CD8, %	29,75±1,70	28,34±1,59	27,39±1,62
CD14, %	16,05±0,62	17,06±0,54	18,16±0,54*
CD16, %	13,25±1,08	12,85±0,73	12,26±0,72
CD25, %	20,3±1,4	10,67±1,08***	7,64±0,89***
CD4 / CD8, %	1,09±0,03	0,86±0,02***	0,82±0,02***
В-лимфоциты, %	33,35±2,74	19,84±1,70***	29,52±1,4
Т-лимфоциты, %	52,42±1,93	61,54±1,83**	57,6±1,82
ЦИК, ЕД	103,40±7,00	130,40±8,68	169,63±9,15***

Примечание. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ** $p<0,001$ по сравнению с контролем.

Результаты и обсуждение

Все биохимические показатели (билирубин и его фракции, активность АлАТ) были повышены по сравнению с нормой, и выраженность этих изменений отвечала активности и клиническим проявлениям гепатита (табл. 1).

Во II группе концентрация АсАТ увеличивалась достоверно ($p<0,01$), а в I группе находилась в пределах нормы. Типичным критерием ухудшения состояния и неблагоприятного прогноза является повышение уровней АсАТ и АлАТ, а также фермента γ-глутамилтрансферазы (во II группе увеличивался в 1,9 раза), что свидетельствует о тяжелом некроbioзе гепатоцитов. Бактериальная инфекция является одним из самых частых осложнений у пациентов при поражениях печени [5]. Вероятно, с этим и связаны наиболее существенные изменения во II группе больных.

Как в I, так и во II группе обнаружались значительные изменения некоторых параметров иммунной системы по сравнению с контрольными показателями. Проведенные исследования показали, что достоверно снижено количество CD3⁺, CD4⁺, соотношение CD4⁺/CD8⁺, отмечается снижение CD8⁺. Это указывает на выраженный иммунодефицит Т-клеточного звена. Низкие значения содержания CD4⁺, CD8⁺ и их соотношения – CD4⁺/CD8⁺ говорят о хелперно-супрессорном иммунодефиците [6].

Количество В-лимфоцитов также понижалось в обеих группах больных. Пониженное содержание CD16⁺ и CD25⁺ при повышенном содержании Т-лимфоцитов показывает меньшую выраженность специфического клеточно-опосредованного иммуните-

та. Содержание CD14⁺ достоверно повышалось лишь во II группе больных. По мнению большинства исследователей, основная роль в развитии и исходе заболевания принадлежит дисбалансу Т-клеточного звена иммунной системы [7]. Как известно, основной функцией В-лимфоцитов является превращение в плазматические клетки при связывании с антигенами и последующей секрецией специфических антител, но для этого необходимо участие CD4⁺ клеток. Выше было показано, что уровень CD4⁺ клеток достоверно снижен и становится понятно, что при ХВГС специфические антитела циркулируют в малой концентрации, «не успевая» связывать циркулирующий вирус [8].

Определение уровня ЦИК выявило повышение их концентрации в обеих группах больных и особенно значительно во II группе (при контроле 103,40±7,00 ЕД этот показатель составлял 169,63±9,15 ЕД, тогда как в I группе 130,40±8,68 ЕД). Повышение концентрации ЦИК свидетельствует о возможном поглощении специфических антител ЦИК. Это отражает блокаду иммунными комплексами рецепторов иммуноглобулинсинтезирующих клеток и комплемента, что способствует персистенции вируса и поддержанию хронического процесса в печени [9].

Активность патологического процесса в печени в целом влияла на изменения плазменных уровней, изучаемых показателей антимикробных пептидов, и эти изменения были более характерны для группы больных с пневмонией.

Количество эндотоксина при ХВГС в I группе составляло 24,4±2,3 МЕ/мл, во II группе – 57,7±5,2 МЕ/мл и в контрольной группе – 0,10±0,01 МЕ/мл.

Известно, что при хроническом вирусном гепатите, прежде всего в связи с нарушением детоксицирующей функции печени, повышением проницаемости кишечной трубки, развитием синдрома избыточного бактериального роста, может многократно нарастать концентрация эндотоксина в кровотоке, способствуя развитию эндотоксиновой агрессии [10].

Эндотоксин может вызывать или ускорять иммунное воспаление через множественные механизмы и стимулирует выработку дефензинов, являющихся достаточно информативными маркерами остроты воспалительного процесса [11]. Так, уровень дефензинов в I группе увеличивается в 7,7 раза ($297,0 \pm 17,5$ нг/мл) по сравнению с контролем – $38,6 \pm 3,8$ нг/мл, а во II группе в 5 раза ($1467,3 \pm 27,7$ нг/мл) по сравнению с I группой больных.

С одной стороны, дефензины обладают выраженным бактерицидным действием, а с другой – способны усиливать альтерацию в зоне воспаления вследствие повреждения клеток организма [12]. Дефензины выступают как опсонины и даже как хемокины: 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 [13].

Для оценки активности воспалительного процесса в печени мы изучали также содержание липополисахарид-связывающего белка (LBP). Нужно отметить, что уровни LBP коррелировали с тяжестью инфекционного процесса в печени. Наиболее высокий уровень был отмечен во II группе – повышение в 18,8 раза ($443,6 \pm 29,6$ нг/мл), а в I группе – в 5,9 раза ($138,7 \pm 8,9$ нг/мл) по сравнению с контролем. Повышение значений LBP может свидетельствовать, с одной стороны, о выраженности синдрома эндотоксемии, с другой – об активации антиэндотоксинового иммунитета. Уровень липополисахарид-связывающего белка быстро возрастает при наличии бактериальной инфекции, что не исключает перспективность использования этого белка для количественной оценки эндотоксемии и в качестве маркера развивающегося воспалительного процесса [14, 15].

Таким образом, изменения показателей иммунного состояния и содержания антимикробных пептидов зависят от наличия сопутствующей вирусному гепатиту С патологии, что позволяет использовать их как дополнительные критерии для характеристики воспалительного процесса в печени при ХВГС, прогноза исходов и оценки степени иммунодефицита.

Литература

- Messina J.P., Humphreys I., Flaxman A., Brown A. et al. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology*. 2015; 61 (1): 77–87.
- Hui-Chun Li, Shih-Yen Lo. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. *World J Hepatol*. 2015; 7 (10): 1377–1389.
- Азимова В.Т., Потатуркина-Нестерова Н.И., Нестеров А.С. Эндогенные антимикробные пептиды человека. Современные проблемы науки и образования. 2015; 1 [Электронный ресурс]. URL: www.science-education.ru/121-17746 (дата обращения: 05.07.2015). / Azimova V.T., Potaturkina-Nesterova N.I., Nesterov A.S. Jendogennyye antimikrobnyye peptidy cheloveka. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 1 [Jelektronnyj resurs]. URL: www.science-education.ru/121-17746 (data obrashcheniya: 05.07.2015). [in Russian]
- Левитан Б.Н., Умерова А.Р., Левитан Г.Б. Антитела к микробным липополисахаридам и синдром эндотоксемии при хронических гепатитах и циррозах печени. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2008; 1. / Levitan B.N., Umerova A.R., Levitan G.B. Antitela k mikrobnym lipopolisakharidam i sindrom jendotoksemii pri khronicheskikh gepatitakh i cirrozakh pecheni. *Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza*. 2008; 1. [in Russian]
- Касьянова Т. П. Гемодинамические нарушения и дисфункция миокарда при хронических гепатитах и циррозах печени. Автореферат на соискание ученой степени доктора медицинских наук, Астрахань, 2014. / Kas'janova T. R. Gemodinamicheskie narusheniya i disfunkcija miokarda pri khronicheskikh gepatitakh i cirrozakh pecheni. *Avtoreferat na soiskanie uchenoj stepeni doktora medicinskih nauk, Astrakhan'*, 2014. [in Russian]
- Понежева Ж.Б., Нагоев Б.С., Дубинина Н.В., Калужин О.В. Клинико-иммунологические особенности хронического гепатита С в зависимости от генотипа вируса. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2011; 2: 26–30. / Ponezheva Zh.B., Nagoev B.S., Dubinina N.V., Kaluzhin O.V. Kliniko-immunologicheskie osobennosti khronicheskogo gepatita S v zavisimosti ot genotipa virusa. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2011; 2: 26–30. [in Russian]
- Чурбакова О.В. Динамика иммунологических показателей у детей при хронических и вирусных гепатитах С до и после проведенной терапии. Известия высших учебных заведений, Поволжский регион. Медицинские науки. 2013; 3 (27): 97–104. / Churbakova O.V. Dinamika immunologicheskikh pokazatelej u detej pri khronicheskikh i virusnykh gepatitakh S do i posle provedennoj terapii. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenij, Povolzhskij region. Medicinskie nauki*. 2013; 3 (27): 97–104. [in Russian]
- Добротина Н.А., Травина Н.М., Копылова Г.Е., Рогацкая Н.А., Дударева Ю.В. Иммунный статус у больных вирусными гепатитами В и С с отягощенным анамнезом. Вестник Нижегородский госуниверситета им. Н.И. Лобачевского. 2001; 1: 55–59. / Dobrotina N.A., Travina N.M., Kopylova G.E., Rogackaja N.A., Dudareva Ju.V. Immunnyj status u bol'nykh virusnymi gepatitami V i S s otjagoshhennym anamnezom. *Vestnik Nizhegorodskij gosuniversiteta im. N.I. Lobachevskogo*. 2001; 1: 55–59. [in Russian]
- Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Горелова И.С. Эффективность иммунокоррекции хронического вирусного гепатита С на фоне противовирусной терапии. Инфекция и иммунитет. 2013; 3: 1: 59–64. / Skljars L.F., Markelova E.V., Gorelova I.S. Jeffektivnost' immunokorrekcii khronicheskogo virusnogo gepatita S na fone protivovirusnoj terapii. *Infekcija i immunitet*. 2013; 3: 1: 59–64. [in Russian]
- Шевяков М.А., Соболев А.В. Иммуномодуляция пробиотиками: спектр клинического приложения и условия эффективности. Трудный пациент. Ноябрь 2013; 43–7. / Shevjakov M.A., Sobolev A.V. Immunomoduljacija probiotikami: spektr klinicheskogo prilozhenija i uslovija jeffektivnosti. *Trudnyj pacient. Nojabr'* 2013; 43–7. [in Russian]
- 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> / Oparina O.N. Rol' jendotoksina gramotricatel'nykh bakterij kishechnika v fiziologicheskikh i patologicheskikh projavlenijakh stressa. *Sovremennyye nauchnyye issledovaniya i innovacii*, 2014; 5 [Jelektronnyj resurs]. URL: <http://web.snauka.ru/issues/2014/05/32845> [in Russian]
- Wiesner J., Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, Sep-Oct, 2010; 1(5): 440–64.
- Нашкевич Н.Н. Альфа-дефензины – мультифункциональные молекулы нейтрофилов: роль в воспалении и инфекционной патологии человека. Современные проблемы инфекционной патологии человека, сборник научных трудов, выпуск 6; Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, 2013. / Nashkevich N.N. Al'fa-defenziny – mul'tifunkcional'nye molekuly nejtrofilov: rol' v vospalenii i infek-

- cionnoj patologii cheloveka. Sovremennye problemy infekcionnoj patologii cheloveka, sbornik nauchnykh trudov, vypusk 6; Ministerstvo zdravookhraneniya Respubliki Belarus', Respublikanskij nauchno-prakticheskij centr jepidemiologii i mikrobiologii, Minsk, 2013. [in Russian]
14. Мавзютов А.Р., Мурзабаева Р.Т., Мавзютова Г.А., Бондаренко К.Р. и др. Характер изменений уровня липополисахарид-связывающего белка при различных инфекционных процессах и дисбиозах. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011; 2: 66–72. / Mavzjutov A.R., Murzabaeva R.T., Mavzjutova G.A., Bondarenko K.R. i dr. Kharakter izmenenij urovnja lipopolisakharid-svjazyvajushhego belka pri razlichnykh infekcionnykh processakh i disbiozakh. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2011; 2: 66–72. [in Russian]
15. Самуилова Д.Ш., Боровкова У.Л. Липополисахарид-связывающий белок: основные функции и клиническое значение. Клиническая физиология кровообращения. 2013; 4: 5–9. / Samuilova D.Sh., Borovkova U.L. Lipopolisakharid-svjazyvajushhij belok: osnovnye funkcii i klinicheskoe znachenie. Klinicheskaja fiziologija krovoobrashhenija. 2013; 4: 5–9. [in Russian]

Сведения об авторах:

Эфендиев А.М. – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии Азербайджанского Медицинского Университета, Баку

Гидятова З.Г. – заведующая клинико-диагностической лабораторией госпиталя Министерства Внутренних Дел Азербайджанской Республики, Баку

Дадашова А.Р. – к.б.н., старший преподаватель кафедры биохимии Азербайджанского Медицинского Университета, Баку

Гаджиев А.Г. – к.б.н., старший преподаватель кафедры биохимии Азербайджанского Медицинского Университета, Баку