

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.832-001-078.33

Конюченко Е.А.<sup>1</sup>, Ульянов В.Ю.<sup>1</sup>, Дроздова Г.А.<sup>2</sup>, Норкин И.А.<sup>1</sup>

## КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ А-ДЕФЕНЗИНОВ НЕЙТРОФИЛОВ 1–3 И ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ В ОСТРОМ И РАННЕМ ПЕРИОДАХ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СПИННОГО МОЗГА

<sup>1</sup>ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава России, 410002, г. Саратов; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия

*Методом иммуноферментного анализа в остром и раннем периодах травматической болезни спинного мозга изучено содержание человеческих α-дефензинов нейтрофилов 1–3, про- и противовоспалительных цитокинов в крови у 40 пациентов с осложненными повреждениями шейного отдела позвоночника. На основании проведенного сопоставительного анализа выявлены новые корреляции, характеризующие системный воспалительный ответ в посттравматическом периоде.*

**Ключевые слова:** спинной мозг; травматическая болезнь; α-дефензины нейтрофилов 1–3; цитокин; иммуноферментный анализ.

**Для цитирования:** Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60 (7): 53–55.

Koniutchenko E.A.<sup>1</sup>, Ulianov V.Yu.<sup>1</sup>, Drozdova G.A.<sup>2</sup>, Norkin I.A.<sup>1</sup>

THE CORRELATION ANALYSIS OF CONTENT OF α-DEFENSINS OF NEUTROPHILS 1-3 AND CYTOKINES IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS IN ACUTE AND EARLY PERIODS OF TRAUMATIC DISEASE OF SPINAL CORD

<sup>1</sup>The Saratov research institute of traumatology and orthopedics of Minzdrav of Russia, 410002 Saratov, Russia; <sup>2</sup>The peoples' friendship university of Russia, 117198 Moscow, Russia

*The technique of enzyme-linked immunosorbent assay was implemented to analyze in acute and early period of traumatic disease of spinal cord the content of human α-defensins of neutrophils 1-3 and pro- and anti-inflammatory cytokines in blood of 40 patients with complicated damages of cervical spine. The implemented comparative analysis established new correlations, characterizing systemic inflammatory response during post-traumatic period.*

**Key words:** spinal cord; traumatic disease; α-defensins of neutrophils 1-3; enzyme-linked immunosorbent assay

**Citation:** Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (7): 53–55. (in Russ.)

Первичное повреждение вещества спинного мозга характеризуется каскадом патофизиологических реакций, происходящих на клеточном и молекулярном уровне (эксайтотоксичность, нейровоспаление, активация нейроглии, апоптоз) [1, 2]. Этому предшествует миграция из системного кровотока под влиянием хемоаттрактантов полиморфно-ядерных лейкоцитов и инфильтрация ими паренхимы спинного мозга [3]. В ответ на массивную травму под влиянием различных провоспалительных цитокинов и хемокинов, в большом количестве синтезирующихся моноцитами, происходит индуцированная TLR-зависимая и TLR-независимая продукция α-дефензинов нейтрофилов HNP (1–3) [4, 5]. Последние, в свою очередь, вызывают дозозависимое высвобождение провоспалительных цитокинов и нейтрофилактивирующего белка-78 из эпителиальных клеток, что приводит к дополнительному рекрутингу нейтрофилов в очаг повреждения [6]. HN (1–3) выделяются нейтрофилами в фагосомы, а натуральными киллерами – в экстрацеллюлярное пространство, обеспечивая иммунные и воспалительные механизмы действия многих катионных антимикробных пептидов [7, 8].

HNP (1–3) активно оказывают и противовоспалительное действие, ингибируя активность индуцированных моноцитов, макрофагов и дендритных клеток. Так, HNP (1–3) блокирует высвобождение IL-1<sub>β</sub>, IL-6 и IL-10 моноцитами при сохранении индуцированной продукции ФНОα [9, 10].

Существуют многочисленные сведения о роли человеческих HNP (1–3) в патогенезе различных заболеваний [11, 12], однако отсутствуют сведения об их роли в развитии системного воспалительного ответа при травматической болезни спинного мозга.

Цель: на основании сопоставительного анализа содержания в плазме крови HNP (1–3), про- и противовоспалительных цитокинов выявить отдельные корреляции, характеризующие системный воспалительный ответ в посттравматическом периоде у пациентов с осложненными повреждениями шейного отдела позвоночника.

**Материалы и методы.** Основную группу составили 40 пациентов обоего пола (средний возраст 29±7,5 года) с осложненными травматическими повреждениями шейного отдела позвоночника, находившихся на лечении в клинике нейрохирургии ФГБУ «Саратовский НИИ травматологии и ортопедии» Минздрава России в период с 2011 по 2013 г. Контрольную группу составили 40 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой.

Критериями включения в исследование больных основной группы были: степень повреждения спинного мозга, соответствующая классам А, В, С (по шкале Frankel, 1970); сроки наблюдения, соответствующие острому (1–4-е сутки) и раннему (до 30-х суток) посттравматическим периодам (по классификации А.В. Лившица, 1990).

Материалом для исследования была периферическая кровь, полученная натощак в утренние часы при пункции локтевой вены в объеме 5 мл. Для определения концентрации HNP (1–3) образцы крови хранили на льду при температуре 4°C. Гепаринизированную плазму отделяли не позднее чем через 20 мин после взятия образца крови центрифугированием при 1500 об/мин в течение 15 мин дважды, до полного

Для корреспонденции: Конюченко Елена Анатольевна, koniuchenko1983@mail.ru

For correspondence: Koniutchenko E.A., koiuchenko1983@mail.ru

отделения лейкоцитов. Для определения содержания цитокинов кровь оставляли для свертывания при комнатной температуре, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин для получения сыворотки.

Количественное содержание HNP (1–3), провоспалительных (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в сыворотке крови пациентов изучали методом иммуноферментного анализа с помощью наборов для определения человеческих  $\alpha$ -дефензинов (ELISAKit, HyCult biotechnology, Нидерланды) и цитокинов в плазме крови (“Вектор-Бест”, Россия) в соответствии с инструкциями к их применению.

Исследования HNP (1–3) и цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10) в плазме крови в основной группе осуществляли на 1–4, 7, 14, 21 и 30-е сутки с момента получения травмы, в контрольной группе – однократно.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета программ IBMSPSS 20 Statistics. Проверили гипотезы о виде распределений (критерий Шапиро–Уилкса). Большая часть наших данных не соответствовала закону нормального распределения, поэтому для сравнения значений использовали непараметрические критерии (U-критерий Манна – Уитни). Сопоставительный анализ статистически значимых показателей проводили путем определения коэффициента корреляции рангов Спирмена ( $R$ ), причем значение  $R < 0,3$  свидетельствовало о слабой связи изученных признаков, значения  $R > 0,3$  и  $< 0,7$  – о средней связи и  $> 0,7$  – о высокой связи. Рассчитывали показатель достоверности ( $p$ ), который считали статистически значимым при  $p < 0,05$ .

*Результаты и обсуждение.* Анализ корреляций содержания HNP (1–3) и провоспалительных цитокинов на 1–4-е сутки с момента травмы показал наличие положительной сильной связи с TNF $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) и средней силы – с IL-6 ( $p < 0,05$ ). На 7-е сутки исследования фиксировали ослабление корреляционной связи с TNF $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) до средней и сохранение связи средней силы с IL-6 ( $p < 0,05$ ). На 14-е сутки исследования корреляционный анализ показал сохранение положительных средней силы связей содержания HNP (1–3) с TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 ( $p < 0,05$ ). На 21-е сутки с момента травмы отмечались положительные связи: средней силы с TNF $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), слабой силы с IL-6 ( $p < 0,05$ ). На 30-е сутки исследования отмечалось отсутствие каких-либо значимых корреляционных взаимосвязей между содержанием HNP (1–3) и провоспалительных цитокинов (см. таблицу).

Анализ корреляций содержания HNP (1–3) и уровней противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациентов выявил статистически значимые отрицательные корреляционные связи с концентрацией IL-4 на 1–4 и 7-е сутки травматической болезни спинного мозга ( $p < 0,05$ ). На 14-е сутки травматической болезни отмечалось появление положительных статистически достоверных связей слабой силы HNP (1–3) с концентрациями IL-4 и IL-10 ( $p < 0,05$ ). На 21-е сутки исследования фиксировали наличие отрицательной связи слабой силы HNP (1–3) с уровнем IL-4 ( $p < 0,05$ ). На 30-е сутки исследования статистически значимых корреляций содержания HNP (1–3) с IL-4 и IL-10 зафиксировано не было (см. таблицу).

Анализ доступной литературы свидетельствует о важной роли катионных антимикробных пептидов в механизмах неспецифической защиты при различных заболеваниях человека, таких как острые респираторные вирусные инфекции, острые бактериальные воспалительные заболевания респираторного тракта, мочеполовой системы. Приводятся сведения о механизмах антимикробного действия дефензинов нейтрофилов, об индукции ими синтеза отдельных цитокинов, взаимодействии с системами коагуляционного гемостаза и комплемента. Практически отсутствуют данные о роли взаимодействия дефензинов нейтрофилов человека и цитокинов в развитии системного воспалительного ответа в условиях травматической болезни спинного мозга. Это делает актуальными результаты проведенного нами исследования.

Выявленные на 1–4-е сутки с момента получения травмы положительные корреляции содержания HNP (1–3) и TNF $\alpha$ , IL-6 свидетельствуют, по нашему мнению, об инициации продукции в очаге повреждения нейтрофильными лейкоцитами HNP (1–3). Это соответствует данным литературы [4, 6, 8] о механизмах цитокин-опосредованной индукции миграции нейтрофильных лейкоцитов в очаг повреждения и их последующей дегрануляции с высвобождением HNP (1–3). Некоторое ослабление положительных корреляций на 7–21-е сутки посттравматического периода, на наш взгляд, может быть связано с реализацией иммунно-воспалительного механизма системного ответа, характеризующегося повышением активности моноцитов, макрофагов и дендритных клеток. Согласно данным [5], для ингибирования активности описанных клеток требуется активное участие HNP (1–3), цитокинов, хемокинов. Именно поэтому происходит обусловленное усиленным потреблением снижение концентраций HNP (1–3), TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6.

Выявленные на 1–4-е сутки с момента получения травмы отрицательные корреляции содержания HNP (1–3) и IL-4 свидетельствуют, по нашему мнению, об относительной недостаточности противовоспалительных механизмов в остром и раннем периодах травматической болезни спинного мозга, обусловленной активной миграцией нейтрофильных лейкоцитов в очаг повреждения и потенцированием провоспалительных механизмов. Появление положительных корреляций HNP (1–3) и IL-4 на 14-е сутки после травмы свидетельствует об усилении продукции противовоспалительных цитокинов, более выраженной по сравнению с конституционным уровнем и обусловленной действием патоген-ассоциированных молекулярных структур. Купирование инфекционного воспаления в последующие сроки наблюдения характеризовалось появлением отрицательных корреляций HNP (1–3) и IL-4, что свидетельствует о восстановлении баланса про- и противовоспалительных медиаторов. Полученные нами данные соответствуют данным литературы [2, 3] о взаимодействии медиаторов воспаления в разные сроки посттравматического периода [5, 6].

*Выводы.* 1. Системный воспалительный ответ в остром и раннем периодах травматической болезни спинного мозга сопровождается изменением содержания HNP (1–3), провоспалительных (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов.

2. Провоспалительные механизмы системного ответа при травматической болезни спинного мозга в остром и раннем периодах характеризуются появлением положительных кор-

**Корреляции содержания HNP (1–3), провоспалительных (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в остром и раннем периодах травматической болезни спинного мозга ( $n = 40$ )**

Содержание в сыворотке крови цитокинов, пг/мл		Содержание в плазме крови HNP (1–3), пг/мл				
		Сроки наблюдения, сут				
		1–4-е	7-е	14-е	21-е	30-е
TNF $\alpha$	$R$	0,711	0,355	0,451	0,313	0,071
	$p$	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05
IL-1 $\beta$	$R$	0,032	0,075	0,432	0,032	0,071
	$p$	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05
IL-6	$R$	0,511	0,432	0,515	0,217	0,033
	$p$	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05
IL-4	$R$	-0,287	-0,398	0,214	-0,275	-0,039
	$p$	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05
IL-10	$R$	-0,043	-0,038	0,275	-0,063	-0,012
	$p$	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05

реляций содержания HNP (1–3) и TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 на 1–4-е и 21-е сутки.

3. Противовоспалительные механизмы системного ответа при травматической болезни спинного мозга в остром и раннем периодах характеризуются относительной недостаточностью, что проявляется отрицательными корреляциями содержания HNP (1–3) и IL-4 на 1–4, 7-е и 21-е сутки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белашкин И.И., Кочетков А.В. Клинико-патоморфологические особенности современного течения позвоночно-спинальной травмы. *Вестник восстановительной медицины*. 2011; 4: 27–30.
2. Ульянов В.Ю., Норкин И.А., Щуковский В.В., Пучиньян Д.М., Конюченко Е.А. Характеристика цитокинового профиля в остром и раннем периодах травматической болезни спинного мозга. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2011; 3: 114–22.
3. Ульянов В.Ю., Норкин И.А., Дроздова Г.А., Конюченко Е.А. Результаты применения интеллектуальной медицинской системы мониторинга процессов ремоделирования нервной ткани в посттравматическом периоде. *Риски и осложнения в современной травматологии и ортопедии: Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной памяти профессора А.Н. Горячева*. Омск; 2015.
4. Абатуров А.Е. Катионные антимикробные пептиды системы неспецифической защиты респираторного тракта: дефензины и кателицидины. Дефензины-молекулы, переживающие ренессанс. *Здоровье ребенка*. 2012; 2.
5. Будихина А.С., Пинегин Б.В. Дифензины – мультифункциональные катионные пептиды человека. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2008; 2: 31–40.
6. Lehrer R.I., Lu W.  $\alpha$ -Defensins in human innate immunity. *Immunol Rev*. 2012; 245 (1): 84–112.
7. Auvynet C., Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the smallest big players in innate and adaptive immunity. *The FEBS JOURNAL*. 2009; 276 (22): 6497–508.
8. Vant Hof W., Veermann E.C., Helmerhost E.J., Nieuw Amerongen A.V. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *J. Biochem*. 2001; 382: 597–619.
9. Мусселиус С. Г. *Синдром эндогенной интоксикации при неотложных состояниях*. М.: БИНОМ; 2008.
10. Козлов В.К. Дисфункция иммунной системы в патогенезе сепсиса. *Общая реаниматология*. 2005; 4: 65–76.
11. Устьянцева И.М., Хохлова О.И. Роль нейтрофилов в развитии полиорганной недостаточности при сепсисе. *Политравма*. 2008; 2: 71–4.
12. Sakamoto N., Mukae H., Fujii T., et al. Differential effects of alpha and beta defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2005; 288 (3): 508–13.

#### REFERENCES

1. Belashkin I.I., Kochetkov A.V. Clinico-pathological features of contemporary course of the vertebral-spinal trauma. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny*. 2011; 4: 27–30. (in Russian)
2. Ul'yanov V.Yu., Norkin I.A., Shchukovskiy V.V., Puchin'yan D.M., Konyuchenko E.A. Characterization of cytokine profile in acute and early periods of traumatic disease of the spinal cord. *Proceedings of the higher educational institutions. Volga region. Medical sciences*. 2011; 3: 114–22. (in Russian)
3. Ul'yanov V.Yu., Norkin I.A., Drozdova G.A., Konyuchenko E.A. The results of the application of intellectual health monitoring system for the remodeling of nerve tissue in the posttraumatic period. *Risks and complications of modern traumatology and orthopedics: Book of Abstracts of All-Russian scientific-practical conference dedicated to the memory of Professor A.N. Goryachev*. Omsk; 2015. (in Russian)
4. Abaturov A.E. Cationic antimicrobial peptides of nonspecific protection respiratory tract: defensins and cathelicidins. Defensins molecules undergoing a renaissance. *Zdorov'e rebenka*. 2012; 2. (in Russian)
5. Budikhina A.S., Pinegin B.V. Difenziny – multifunctional cationic peptides person. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2008; 2: 31–40. (in Russian)
6. Lehrer R.I., Lu W.  $\alpha$ -Defensins in human innate immunity. *Immunol. Rev*. 2012; 245 (1): 84–112.
7. Auvynet C., Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the smallest big players in innate and adaptive immunity. *The FEBS JOURNAL*. 2009; 276 (22): 6497–508.
8. Vant Hof W., Veermann E.C., Helmerhost E. J., Nieuw Amerongen A. V. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *J. Biochem*. 2001; 382: 597–619.
9. Musselius S.G. *Syndrome of endogenous intoxication in case of emergency*. Moscow: BINOM; 2008. (in Russian)
10. Kozlov V.K. Dysfunction of immune systems in the pathogenesis of sepsis. *Obshchaya reanimatologiya*. 2005; 4: 65–76. (in Russian)
11. Ust'yantseva I.M., Khokhlova O.I. The role of neutrophils in the development of multiple organ failure in sepsis. *Politravma*. 2008; 2: 71–4. (in Russian)
12. Sakamoto N., Mukae H., Fujii T., et al. Differential effects of alpha and beta defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2005; 288 (3): 508–13.

Поступила 05.02.15

Received 05.02.15