

## ИНФОРМАТИВНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ И $\alpha$ -ДЕФЕНСИНОВ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ТЕЧЕНИЯ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Дюкарев В.В.<sup>1</sup>, Юдина С.М.<sup>1</sup>, Королев А.Г.<sup>1</sup>, Кравчук А.Д.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «КГМУ» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск, e-mail: vdukarev89@mail.ru;

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, Москва

Цель работы заключалась в сопоставительном анализе содержания  $\alpha$ -дефенсинов (HNP1-3), про- и противовоспалительных цитокинов в плазме крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и их роли в развитии системного воспалительного ответа в посттравматическом периоде у пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой (ЧМТ). Материалы и методы. В исследование включено 105 пациентов с тяжелой ЧМТ. Забор ликвора и плазмы крови проводили в 1-е и 7-е сутки после травмы. Количественное содержание  $\alpha$ -дефенсинов (HNP1-3) в плазме крови и цереброспинальной жидкости, цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-10) в сыворотке крови и ЦСЖ определяли методом ИФА с набором для определения человеческих  $\alpha$ -дефенсинов (ELISAKit, HyCultbiotechnology, Нидерланды) и цитокинов («Вектор-Бест», Россия). Результаты. Проведенные исследования показали, что тяжелая ЧМТ сопровождается повышенной продукцией  $\alpha$ -дефенсинов, про- и противовоспалительных цитокинов. В первые сутки после ЧМТ в плазме крови и ЦСЖ наблюдается значительное увеличение концентрации  $\alpha$ -дефенсинов. В динамике на 7-е сутки отмечалось снижение содержания  $\alpha$ -дефенсинов в плазме крови и ЦСЖ, более выраженное в ликворе. Между уровнем  $\alpha$ -дефенсинов и содержанием белка, цитозом в ликворе в 1-е сутки, а также между  $\alpha$ -дефенсинами и противовоспалительным цитокином IL-10 в плазме крови и ликворе на 7-е сутки выявлена прямая корреляционная зависимость, отражающая динамику течения воспалительного процесса в ЦНС. Анализ корреляционной связи между тяжестью ЧМТ по шкале ком Глазго (ШКГ), включающей оценку уровня сознания, и шкале исходов ком Глазго (ШИКГ) с исследуемыми показателями выявил статистически значимую сильную прямую корреляционную связь между концентрацией  $\alpha$ -дефенсинов и IL-10 в ликворе на 7-е сутки и исходами тяжелой ЧМТ по ШИКГ, что позволило выделить 3 группы пациентов по тяжести течения и исходам ЧМТ.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, цереброспинальная жидкость,  $\alpha$ -дефенсины (HNP1-3), цитокины.

## INFORMATIVE RESEARCH CYTOKINE PROFILE AND INNATE IMMUNITY FACTORS IN PREDICTING THE COURSE OF TRAUMATIC BRAIN INJURY

Dyukarev V.V.<sup>1</sup>, Yudina S.M.<sup>1</sup>, Korolev A.G.<sup>1</sup>, Kravchuk A.D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: vdukarev89@mail.ru;

<sup>2</sup>N.N. Burdenko National Scientific and Practical Center for Neurosurgery, Moscow

The aim of the work was to compare the content of  $\alpha$ -defensins (HNP1-3), pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) and their role in the development of a systemic inflammatory response in the post-traumatic period in patients with severe traumatic brain injury (TBI). Materials and methods. The study included 105 patients with severe TBI. CSF and blood sampling was performed on the 1st and 7th day after injury. The quantitative content of  $\alpha$ -defensins (HNP1-3) in plasma and cerebrospinal fluid, cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-10) in serum and CSF was determined by the method ELISA with a kit for the determination of human  $\alpha$ -defensins (ELISAKit, HyCultbiotechnology, the Netherlands) and cytokines (Vector-Best, Russia). Results. Studies have shown that severe head injury is accompanied by increased production of  $\alpha$ -defensins, pro-and anti-inflammatory cytokines. On the first day after TBI, a significant increase in the concentration of  $\alpha$ -defensins observed in blood plasma and CSF. In the dynamics on the 7th day, there was a decrease in the content of  $\alpha$ -defensins in the blood plasma and CSF, more pronounced in the cerebrospinal fluid. Between the level of  $\alpha$ -defensins and protein content, cytosin in the cerebrospinal fluid on day 1, and between  $\alpha$ -defensins and the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the blood plasma and cerebrospinal fluid on the 7th day, a direct correlation was found reflecting the dynamics of the inflammatory process in the central nervous system. Analysis of the correlation between the severity of TBI on the Glasgow com scale (GCS), including an assessment of the level of consciousness, and the Glasgow com outcome scale with the studied parameters revealed a significant strong direct correlation between the concentration of  $\alpha$ -defensins and IL-10 in the liquor at 7 On the 24th day and the outcomes of severe TBI on GCOS, which allowed us to distinguish 3 groups of patients according to the severity and outcome of TBI.

Keywords: traumatic brain injury, cerebrospinal fluid,  $\alpha$ -defensins (HNP1-3), cytokines.

Среди травматических повреждений, характеризующихся высокой летальностью и инвалидизацией, наибольший процент приходится на черепно-мозговую травму (ЧМТ). В последние годы установлено, что исход ЧМТ во многом определяется не только первичным повреждением головного мозга, но и развитием вторичных реакций, среди которых иммунной дисрегуляции отводится ключевая роль. Рядом авторов показано, что у большинства пациентов с ЧМТ происходит угнетение клеточного и гуморального звеньев иммунитета, наиболее выраженное в случае развития гнойных осложнений и неблагоприятных исходов [1; 2].

В последние годы особое внимание уделяется исследованию врожденного иммунитета в связи с его важной ролью в развитии воспаления. Одним из механизмов врожденного иммунитета является продукция противомикробных пептидов (ПМП), выполняющих роль медиаторов воспаления и обладающих, наряду с антимикробным действием, способностью участвовать во врожденных и адаптивных иммунных реакциях, свертываемости крови, тканевой репарации и других процессах в организме [3-5].

При этом особого внимания заслуживают  $\alpha$ -дефенсины, основным источником которых являются нейтрофилы, осуществляющие первыми миграцию в ткани при воспалении. Показано, что уровень  $\alpha$ -дефенсинов может быть надежным маркером активации нейтрофилов, а эти пептиды более длительно сохраняются в плазме крови и тканях за счет их способности сорбироваться на различных белках и клетках после гибели короткоживущих нейтрофилов. Наряду с этим  $\alpha$ -дефенсины влияют на продукцию TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и IL-10, дисбаланс которых на системном и локальном уровнях также является одним из основных патогенетических механизмов ЧМТ [6]. Вместе с тем роль цитокинов в тяжести течения и исходов ЧМТ не определена, а немногочисленные сведения, приводимые в литературе, весьма противоречивы. Кроме этого, в литературе практически отсутствуют данные о взаимодействии противомикробных пептидов и цитокинов в развитии нейровоспалительного процесса при травматической болезни головного мозга.

Исходя из изложенного, целью работы являлась разработка информативных прогностических критериев течения и исходов тяжелой черепно-мозговой травмы на основании оценки состояния цитокинового профиля и факторов врожденного иммунитета.

**Материалы и методы исследования.** В исследование включено 105 пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой, находившихся на лечении в нейрохирургическом отделении Курской областной клинической больницы с 2015 по 2019 год. Протокол клинического обследования больных утвержден на заседании Этического комитета ФГБОУ ВО «КГМУ» Минздрава России (протокол № 9 от 09.11.15 г.).

Критериями включения пациентов в исследование являлись: тяжелая ЧМТ, средний

уровень сознания по шкале комы Глазго –  $6,8 \pm 1,2$  балла.

Критериями исключения из исследования являлись пациенты с тяжелой ЧМТ в крайне тяжелом и агональном состоянии (шкала комы Глазго – 3 балла) и пациенты с уровнем сознания при поступлении  $>10$  баллов по шкале комы Глазго.

Всем пациентам в клинической группе проводилось комплексное общесоматическое, неврологическое и рентгенологическое обследование. Локализация очагов поражения подтверждена данными КТ или МРТ головного мозга. Диагностика и лечение ЧМТ проводились в соответствии с требованиями Приказа Минздрава России от 07.11.2012 N 635н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при внутричерепной травме» [7].

В первые 24 часа и через 7 суток после ЧМТ пациентам выполнялась люмбальная пункция с забором цереброспинальной жидкости и периферической крови из центральной вены.

Количественное содержание  $\alpha$ -дефенсинов (HNP<sub>1-3</sub>) в плазме крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-10) в сыворотке крови и ЦСЖ определяли методом ИФА с набором для определения человеческих  $\alpha$ -дефенсинов (ELISAkit, HyCultbiotechnology, Нидерланды) и цитокинов («Вектор-Бест», Россия). Для определения показателей, принимаемых за физиологическую норму, обследовано 20 здоровых лиц (средний возраст  $38,3 \pm 11,5$  года).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программного комплекса Microsoft Office Excel 2007, используя среднее значение показателя, среднее стандартное отклонение показателя и процент случаев в анализируемой группе пациентов. Достоверность статистических различий средних арифметических величин сравниваемых параметров оценивали по расхождению границ доверительных интервалов. Статистически значимыми считали различия по критерию Стьюдента при значениях  $p < 0,05$ . Для выявления корреляционной связи между показателями использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ).

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Результаты исследования показали, что в первые сутки после ЧМТ уровни цитокинов с про- и противовоспалительной активностью в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости в десятки раз превышали значения доноров (рисунок 1). При этом более высокие концентрации исследуемых медиаторов выявлены в ЦСЖ (рисунок 2). Полученные данные объясняются первоначальной реакцией иммунной системы на травму и логично согласуются с тем, что продукция цитокинов всегда выше в очаге воспаления на уровне органа-мишени [8; 9].

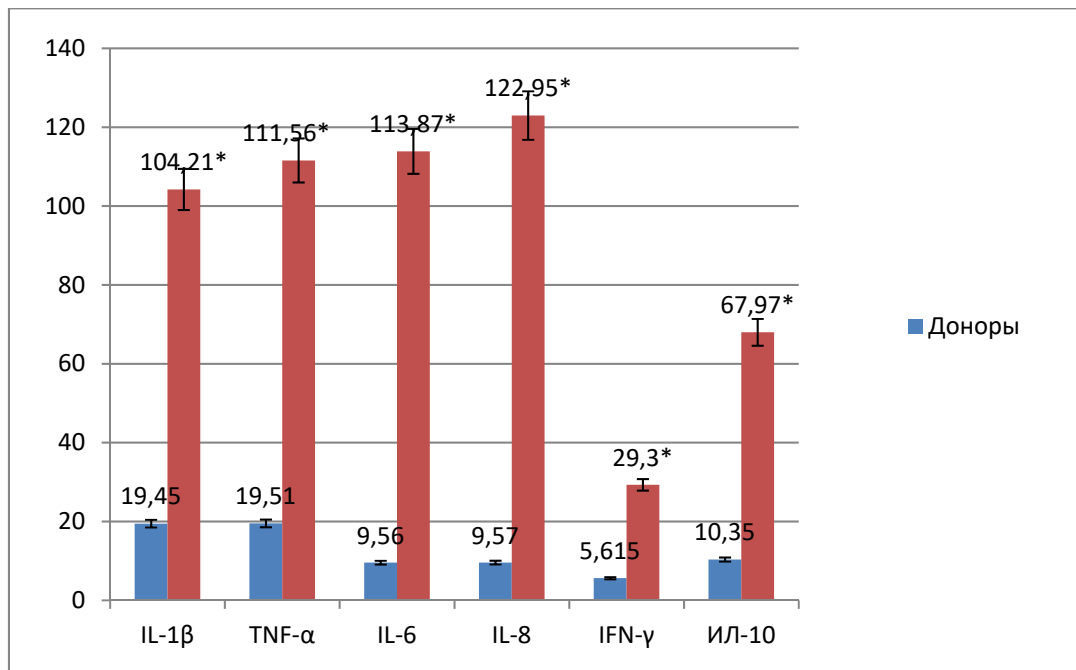


Рис. 1. Профиль сывороточных цитокинов у больных с ЧМТ в первые сутки после травмы

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с донорами.

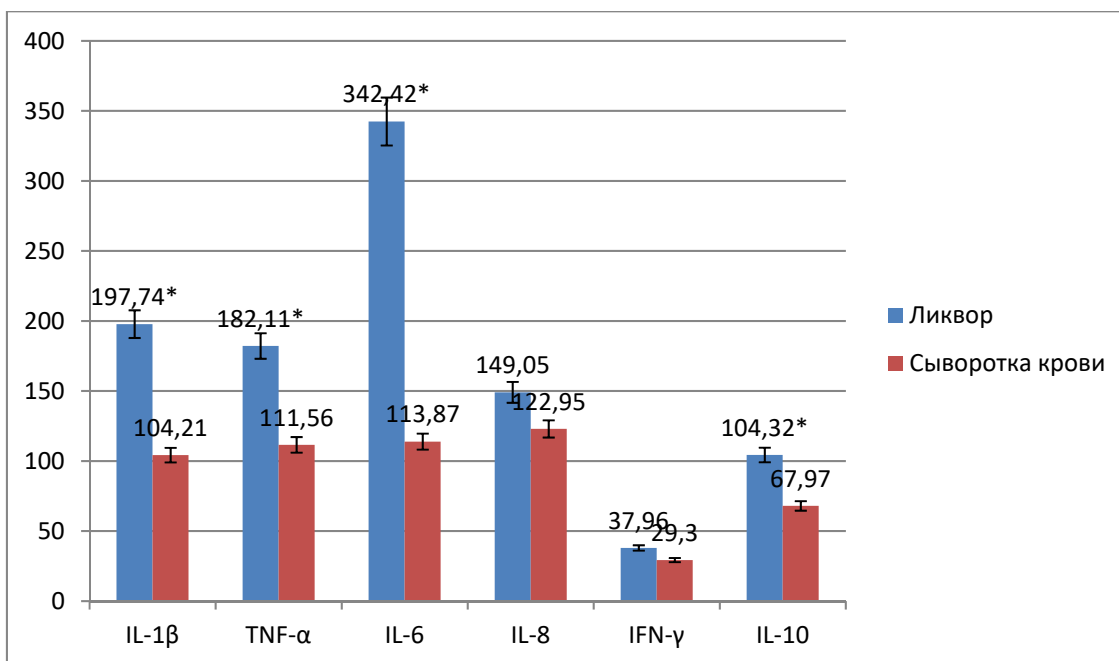


Рис. 2. Цитокиновый профиль сыворотки крови и ликвора пациентов с ЧМТ в первые сутки

Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

На 7-е сутки по сравнению с первыми отмечалось статистически значимое снижение уровня IL-1β и TNF-α, IFN-γ и IL-10 в обеих биологических жидкостях (рисунок 3). При этом обращало внимание увеличение сывороточной и концентрации IL-6 и IL-8 в 1,3 и 1,6 раза соответственно, а ликворной по сравнению с сывороточной соответственно в 3,4 и в 1,9 раза ( $p < 0,01$ ).



IL-1 $\beta$	0,465							
TNF- $\alpha$		0,645*						
IL-6			0,619*					
ИЛ-8				0,623*				
ИФН- $\gamma$					-0,0456			
ИЛ-10						0,71*		
Цитоз							0,63*	
Белок								0,507*

Примечание: коэффициент ранговой корреляции Спирмена (\*  $-r_s > 0,5$ ).

Учитывая отсутствие в литературе данных об участии  $\alpha$ -дефенсинов в развитии иммунного ответа при травматической болезни головного мозга, был проведен сопоставительный анализ содержания  $\alpha$ -дефенсинов (HNP1-3) в плазме крови и цереброспинальной жидкости. Результаты исследования показали, что в 1-е сутки после травмы наблюдается значительное повышение содержания  $\alpha$ -дефенсинов (HNP 1-3) и в плазме крови, и в ЦСЖ, но уровень HNP 1-3 в ЦСЖ был в 9,7 раза ниже, чем в плазме крови. Аналогичная картина отмечалась и на 7-е сутки посттравматического периода, а именно, на фоне снижения к 7-м суткам содержания HNP 1-3 в плазме крови в 1,4 раза, более выраженное снижение наблюдалось в ЦСЖ – в 2,4 раза (рисунок 4). При этом уровень в ЦСЖ был в 15 раз меньше, чем в плазме крови ( $63282 \pm 621,77$  пг/мл и  $4126,9 \pm 129,36$  пг/мл соответственно;  $p < 0,05$ ).

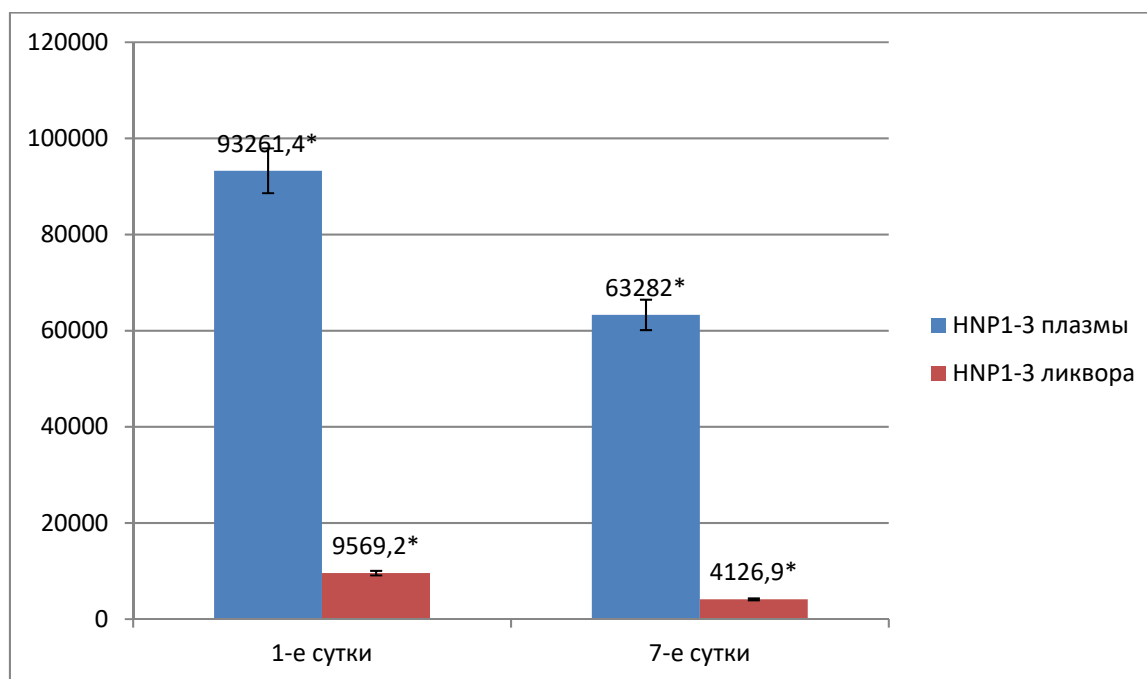


Рис. 4. Динамика содержания HNP 1-3 в плазме крови и ликворе

Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

Принимая во внимание данные литературы о том, что  $\alpha$ -дефенсины, наряду с антимикробной активностью, взаимодействуют с системой комплемента и коагуляционного гемостаза, индуцируют синтез цитокинов, представляло интерес сопоставить содержание  $\alpha$ -дефенсинов и цитокинов в исследуемых биологических жидкостях в разные сроки после ЧМТ [11; 12].

С учетом этого был проведен корреляционный анализ между показателями HNP 1-3 в плазме крови и ликворе в 1-е и 7-е сутки после травмы, по результатам которого была выявлена сильная прямая корреляционная связь изменения концентрации HNP 1-3 в плазме крови и ликворе (таблица 2).

Таблица 2

Корреляционный анализ содержания HNP 1-3 в плазме крови и ликворе в 1-е и 7-е сутки

Коэффициент корреляции Спирмена		Содержание HNP 1-3 плазмы и ликвора, пг/мл
HNP 1-3 плазмы	$r_s$	0,82
	$T_{кр}$	0,5*
HNP 1-3 ликвора	$r_s$	0,736
	$T_{кр}$	0,55*

Примечание:  $r_s < 0,5$  – связь сильная прямая;  $T_{кр}$  – оценка коэффициента корреляции; \* – связь статистически значимая.

Кроме этого, была проанализирована корреляционная зависимость между показателями HNP 1-3, цитокинами и общим анализом ликвора, выявившая статистически значимую сильную прямую корреляционную связь между HNP 1-3 и концентрацией IL-1 $\beta$  в плазме крови, содержанием белка и цитозом в ликворе в 1-е сутки после травмы (таблица 3). При этом особого внимания заслуживала выявленная на 7-е сутки после травмы статистически значимая прямая корреляционная зависимость между уровнем HNP 1-3 и противовоспалительным цитокином IL-10 как в плазме, так и в ликворе, что имеет важное значение в динамике течения и исходов воспалительного процесса в головном мозге.

Как известно, IL-10 – противовоспалительный цитокин, является мощным регулятором иммунного ответа, ингибирующим продукцию провоспалительных цитокинов. Значительное снижение IL-10 в плазме и ликворе отражает тяжесть воспалительного процесса в головном мозге, повышенную проницаемость гематоэнцефалического барьера, что характерно для тяжелых форм ЧМТ и может служить достоверным прогностическим критерием их исходов [13].

Таблица 3

Корреляционный анализ с расчетом коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ) между показателями HNP 1-3, цитокинов и общего анализа ликвора

Цитокины, пг/мл		HNP 1-3, пг/мл	
		1-е сутки	7-е сутки
IL-1 $\beta$	Плазма	0,67*	0,22
	Ликвор	-0,325	-0,343
TNF- $\alpha$	Плазма	-0,155	-0,3
	Ликвор	-0,373	-0,44
IL-6	Плазма	-0,501**	0,1
	Ликвор	0,118	-0,38
IL-8	Плазма	-0,26	-0,13
	Ликвор	0,275	-0,31
INF- $\gamma$	Плазма	-0,682**	0,14
	Ликвор	-0,0136	-0,435
IL-10	Плазма	-0,33	0,5*
	Ликвор	0,457	0,83*
Белок г/мл	Ликвор	0,526*	0,036
Цитоз	Ликвор	0,513*	0,16

Примечание: \* –  $r_s < 0,5$  – связь сильная прямая; \*\* –  $r_s < -0,5$  – связь сильная обратная.

Согласно результатам проведенного исследования спектра провоспалительных и ингибирующих цитокинов, а также одного из важнейших факторов врожденного иммунитета – противомикробных пептидов на системном и локальном уровнях, представляло интерес сопоставить информативность их определения с клиническим течением и исходами ЧМТ. Поэтому следующим этапом исследования был анализ корреляционной связи между тяжестью ЧМТ по шкале ком Глазго (ШКГ), включающей оценку уровня сознания, и шкале исходов ком Глазго (ШИКГ) с исследуемыми показателями (таблица 4).

Таблица 4

Корреляционная зависимость уровня HNP 1-3 и цитокинов крови и ликвора с исходами ЧМТ

Цитокины		ШИКГ	
		1-е сутки	7-е сутки
IL-10	Кровь	-0,0538	0,0169



	Ликвор	0,227	0,7**
IFN- $\gamma$	Кровь	0,0388	0,17
	Ликвор	0,54*	-0,192
IL-8	Кровь	0,0492	0,282
	Ликвор	-0,665*	-0,661*
IL-6	Кровь	0,0123	0,238
	Ликвор	-0,421	-0,568*
HNP 1-3	Кровь	0,542*	0,409
	Ликвор	0,687*	0,862**

Примечание:  $r_s < 0,5$  – связь сильная прямая;  $T_{кр}$  – оценка коэффициента корреляции; \* – связь статистически значимая.

Результаты исследования выявили статистически значимую сильную прямую корреляционную связь между концентрацией HNP 1-3, IL-10 и IL-8 в ликворе на 7-е сутки и тяжестью исходов тяжелой ЧМТ по ШИКГ, что позволило выделить 3 группы пациентов по тяжести течения и исходам ЧМТ (таблица 5).

Таблица 5

Корреляционная зависимость ликворной концентрации на 7-е сутки HNP 1-3 и цитокинов с тяжестью состояния пациентов по ШИКГ

Иммунологические показатели	Исходы ТЧМТ по ШИКГ		
	1-2 балла	3 балла	4-5 баллов
IL-10	<40	40-80	>80
HNP 1-3	<2000	2000-4000	>4000
IL-8	>300	200-300	<200

Первая группа – пациенты с уровнем HNP 1-3 в ликворе на 7-е сутки после травмы менее 2000 пг/мл, IL-8 более 300 пг/мл и IL-10 менее 40 пг/мл - прогнозируется возможность неблагоприятного исхода ЧМТ (по ШИКГ 1-2 балла). Вторая группа – пациенты с уровнем HNP 1-3 в ликворе на 7-е сутки после травмы 2000-4000 пг/мл, IL-8 в пределах 200-300 пг/мл и IL-10 в пределах 40-80 пг/мл – прогнозируется возможность условно неблагоприятного исхода (грубая инвалидизация) - по ШИКГ 3 балла. Третья группа – пациенты с уровнем HNP 1-3 в ликворе более 4000 пг/мл, IL-8 менее 300 пг/мл и IL-10 более 80 пг/мл – прогнозируется возможность благоприятного исхода (частичное или полное восстановление

после травмы) - по ШИКГ 4-5 баллов.

### **Заключение**

Таким образом, проведенный корреляционный анализ выявил наибольшую диагностическую информативность прогнозирования исходов ЧМТ для ликворной концентрации на 7-е сутки после травмы HNP 1-3, IL-8 и ИЛ-10.

### **Список литературы**

1. Edwin B.Y. Post-Traumatic Hypoxia Is Associated with Prolonged Cerebral Cytokine Production, Higher Serum Biomarker Levels, and Poor Outcome in Patients with Severe Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma*. 2014. Vol. 31. No 7. P. 618-629.
2. Giunta B. The immunology of traumatic brain injury: a prime target for Alzheimer's disease prevention. *J. Neuroinflammation*. 2012. No 9. P. 185-189.
3. Абатуров А.Е. Катионные антимикробные пептиды системы не специфической защиты респираторного тракта: дефенсины и кателицидины // *Здоровье ребенка*. 2012. Т. 3. № 38. С. 31-38.
4. Kohlgraf K.G. Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiology*. 2010. Vol. 5. No 1. P. 99-113.
5. Laube D.M., Yim S., Ryan L.K., Kisich K.O., Diamond G. Antimicrobial peptides in the airway. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2006. Vol. 306. P. 153-182.
6. Ramlackhansingh A.F., Brooks D.J., Greenwood R.J. Inflammation after trauma: Microglial activation and traumatic brain injury. *Ann. Neurol*. 2011. Vol. 70. No 3. P. 374-383.
7. Приказ Минздрава России от 07.11.2012 N 635н "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при внутричерепной травме" (Зарегистрировано в Минюсте России 25.01.2013 N 26710). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.niito.ru/pdf/standarts/635.pdf> (дата обращения: 10.06.2019).
8. Das M., Mohapatra S., Mohapatra S.S. New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. *Journal of neuroinflammation*. 2012. No 9. P. 230-236.
9. Ульянов В.Ю. Характеристика цитокинового профиля в остром и раннем периодах травматической болезни спинного мозга // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2011. № 3. С. 114-122.
10. Шевченко К.В., Четвертных В.А., Кравцов Ю.И. Баланс цитокинов при тяжелой черепно-мозговой травме // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2009. Т. 3. № 2. С. 14-16.
11. Байкова Е.Е. Каде А.Х., Музлаев Г.Г., Лебедев В.П., Занин С.А. Динамика

цитокинового статуса у больных с изолированной черепно-мозговой травмой средней и тяжелой степени тяжести // Кубанский научный медицинский вестник. 2014. № 3. С. 16-17.

12. Kumar M.A. Relative Deficiency of Plasma A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin Type 1 Repeats 13 Activity and Elevation of Human Neutrophil Peptides in Patients with Traumatic Brain Injury. J. Neurotrauma. 2019. Vol. 36 (2). P. 222-229.

13. Chaudhry A., Samstein R.M., Treuting P. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. Immunity. 2011. Vol. 34. No 4. P. 566-578.