

На правах рукописи

Дюкарев Владимир Владимирович

Иммунологические нарушения при черепно-мозговой травме и их прогностическая информативность

14.03.09 –клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Юдина Светлана Михайловна

доктор медицинских наук, профессор

Кравчук Александр Дмитриевич

Официальные оппоненты:

Серебряная Наталья Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии, профессор кафедры;

Сумная Дина Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Уральский государственный университет физической культуры» Министерства спорта России, кафедра биохимии, профессор кафедры;

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «15» сентября 2020г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.08 в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте www.sechenov.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук,

профессор



Калюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Среди травматических повреждений, характеризующихся высокой летальностью и инвалидизацией, наибольший процент приходится на черепно-мозговую травму (ЧМТ), смертность при которой приближается к 35-38%, а инвалидизация пострадавших – к 50% [Гусев В.И., 2009; Лихтерман Л.Б., 2015]. 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 [Горбунов В.И., 2001; Hog, C.W, 2008; Wraight D.C., 2012].

В настоящее время травматическую болезнь головного мозга рассматривают как реакцию всего организма, включая иммунную систему, на травму ЦНС [Шганкам Л., Казанцева Л.В., 2011; Ousman S.S., Kubes P., 2012; Schwulst S.J., 2013]. Воспаление, развивающееся в тканях ЦНС, имеет отличительные особенности, так как мозг является «иммунологически привилегированным органом», гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) которого ограничивает контакт с иммунокомпетентными клетками и гуморальными веществами [Smith J. A. et al., 2011; Aguzzi A., 2013]. Возникающие нарушения в иммунной системе при ЧМТ являются, с одной стороны, проявлением защитной реакции организма, а с другой – формированием специфического иммунного ответа на чужеродную ткань головного мозга [Дмитриенко Е.В., Акимото Н. и др., 2013; Woodcock T., 2013]. Одним из факторов развития воспалительного процесса, индуцированного травмой, является иммунная дисфункция, а ее главными регуляторами – про- и противовоспалительные цитокины, секретируемые резидентными нейронными и глиальными клетками мозга [Байкова Е.Е., Каде А.Х. и др., 2014; Wiese S., Karus M., 2012]. Кроме этого, источником цитокинов в ЦНС являются рекрутированные к очагу воспаления клетки иммунной системы вследствие нарушения ГЭБ. По данным ряда исследователей воспалительный процесс в тканях мозга сопровождается гиперсекрецией провоспалительных и ингибирующих цитокинов, что имеет существенное значение в течение и исходе ЧМТ [Мамытова Е.Л., 2013; Weckbach S., 2012; Edwin B. Yan et al., 2014]. Однако роль цитокинов в патогенезе ЧМТ остается недостаточно изученной, а приводимые в литературе данные немногочисленны, дискутабельны и требуют дальнейшего изучения.

В последние годы особое внимание уделяется исследованию врожденного иммунитета как первой линии защиты в развитии воспалительного процесса в головном мозге, одним из механизмов которого является продукция противомикробных пептидов (ПМП), выполняющих наряду с антимикробной функцией роль медиаторов воспаления [Ransohoff R. M., Brown M. A., 2012; Lehrer R.I., Lu W., 2012]. При этом особого внимания заслуживают α -дефензины,

основным источником которых являются нейтрофилы, осуществляющие первыми миграцию в ткани при воспалении. Показано, что уровень α -дефензинов 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 [Calvo C.F. 2005; Erkkonen B. 2005; Mikkel, F. 2005]. Наряду с этим, α -дефензины влияют на продукцию ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10, дисбаланс которых на системном и локальном уровне также является одним из основных патогенетических механизмов ЧМТ. Вместе с тем, в литературе практически отсутствуют данные о взаимодействии противомикробных пептидов и цитокинов в развитии нейровоспалительного процесса при травматической болезни головного мозга.

С учетом изложенного, комплексный подход в исследовании цитокинового профиля и факторов врожденного иммунитета – противомикробных пептидов на системном и локальном уровнях представляется важным вкладом в изучении роли иммунных механизмов в патогенезе травматической болезни головного мозга и разработки критериев прогнозирования ее течения и исходов.

Степень разработанности темы

Вопросами эпидемиологии, клинического течения, диагностики и лечения тяжелой ЧМТ занимались А.Н. Коновалов, Л.Б. Лихтерман, А.А. Потапов, А.Д. Кравчук (НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко, г. Москва), а также В.В. Крылов, А.Э. Талыпов, С.С. Петриков (НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, г. Москва). Вопросы роли иммунитета в патогенезе ЧМТ изучали В.И. Горбунов, Л.Б. Лихтерман (НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко, г. Москва), L.J. Chew, A. Takanohashi (Center for Neuroscience Research, Children's Research Institute, Children's National Medical Center, Washington, District of Columbia, USA), а также A. Kumar, J. Dressler, L. Walter. Динамику цитокинового профиля при ЧМТ исследовали Д.Б. Сумная, Е.И. Львовская, В.А. Садова (УралГУФК, г. Челябинск), а также C.F. Calvo, B.Y. Edwin, T. Hayakata, Y. Huang. Роль α -дефензинов в нейровоспалении изучали F.A. Maffei, R.P. Heine, M. Szekeres, E. Ivitz. В ходе изучения имеющихся исследований, представленные научные труды не раскрывали полностью аспекты участия цитокинов, факторов врожденного иммунитета в патогенезе тяжелой ЧМТ. Вышесказанное обосновывает актуальность дальнейшего фундаментального изучения роли иммунных механизмов в нейровоспалении при тяжелой ЧМТ и разработки критериев прогнозирования течения заболевания, что и обусловило выбранную цель и задачи данной работы.

Цель работы

Разработать информативные прогностические критерии течения тяжелой черепно-мозговой травмы на основании оценки цитокинового профиля и противомикробных пептидов на системном и локальном уровнях.

Задачи исследования

1. Исследовать в динамике содержание цитокинов с про- (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- γ) и противовоспалительной (ИЛ-10) активностью у больных с ЧМТ в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости.
2. Провести анализ содержания противомикробных пептидов - α -дефензинов (HNP 1-3) в плазме крови и цереброспинальной жидкости у больных с ЧМТ.
3. Оценить информативность определения исследуемых биомаркеров в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости.
4. Разработать иммунологические критерии прогнозирования течения ЧМТ.

Основные положения, выносимые на защиту

Одним из механизмов развития воспалительного процесса, возникающего при травматическом поражении тканей мозга у пациентов с ЧМТ, является повышенная продукция α -дефензинов (HNP 1-3), про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- γ и ИЛ-10), способствующих снижению проницаемости гематоэнцефалического барьера, притоку нейтрофилов в очаг воспаления и развитию осложнений.

Показатели тяжести ЧМТ по шкале ком Глазго (ШКГ), включающей оценку уровня сознания, и шкале исходов ком Глазго (ШИКГ) на 7-е сутки после травмы коррелируют с ликворной концентрацией α -дефензинов (HNP 1-3), ИЛ-8 и ИЛ-10.

Показатели уровня α -дефензинов (HNP 1-3), ИЛ-8 и ИЛ-10 в ликворе пациентов с тяжелой ЧМТ на 7-е сутки после травмы являются информативными прогностическими критериями течения и исходов ЧМТ.

Научная новизна

В работе впервые у пациентов с тяжелой ЧМТ в динамике проведена сравнительная оценка спектра цитокинов и противомикробных пептидов (α -дефензинов) на системном (в периферической крови) и локальном (цереброспинальной жидкости) уровнях. Более выраженные изменения исследуемых показателей выявлены на локальном уровне – в цереброспинальной жидкости. Определена значимость исследования ликворной концентрации

α -дефензинов, ИЛ-8 и ИЛ-10, коррелирующей с тяжестью исходов тяжелой ЧМТ. Разработаны иммунологические критерии прогнозирования течения и исходов тяжелой ЧМТ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные способствуют расширению существующих представлений о механизмах развития и прогрессирования воспалительного процесса при травматической болезни головного мозга. В результате проведенного исследования на основании определения содержания α -дефензинов и цитокинов (ИЛ-8 и ИЛ-10) в периферической крови и цереброспинальной жидкости пациентов с тяжелой ЧМТ разработаны информативные иммунологические критерии прогнозирования тяжести течения и исходов ЧМТ, позволяющие своевременно диагностировать развитие осложнений и назначать адекватное лечение.

Степень достоверности и апробация результатов

Научные положения, описанные данные, выводы и рекомендации, сформулированные в работе, базируются на обследовании в динамике 105 пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой, а также исследовании цитокинового статуса и α -дефензинов (HNP 1-3) в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости впервые и седьмые сутки после травмы. Дизайн исследования включал клиническую оценку неврологического статуса пациентов, включая компьютерную томографию головного мозга.

Статистическая обработка цифровых данных проводилась с применением программного комплекса Microsoft Office Excel 2007. Для описания количественных признаков в исследуемых группах использовались элементы вариационной статистики: средняя арифметическая (M), стандартное (среднее квадратичное) отклонение (σ), среднеквадратическая (стандартная ошибка) среднего арифметического (m), критерий достоверности Стьюдента (t), уровень значимости (p). Для оценки корреляционной связи количественных вариантов вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Во всех процедурах статистического анализа за уровень значимости принимали $p < 0,05$. Статистический анализ количественных переменных основывался на различии средних арифметических совокупностей. В случае двух несвязанных выборок использовался t -критерий Стьюдента с отдельной оценкой дисперсии для независимых групп.

Основные положения и выводы диссертации были представлены автором на научных конференциях студентов и молодых ученых (г. Курск, 2016, 2018; г. Москва, 2017), межрегиональных научно-практических конференциях с международным участием (г. Курск, 2018, г. Смоленск, 2018, г. Воронеж, 2019). Апробация диссертации состоялась на заседании кафедр клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии, неврологии и нейрохирургии, хирургических болезней №1 КГМУ 31 мая 2019 года, протокол № 21.

Личный вклад автора

Автором были самостоятельно выполнены все этапы по подготовке диссертации: выбор направления исследования диссертационной работы, анализ и обобщение литературных источников, разработка дизайна исследования, определение цели и задач, подбор адекватных методов для решения поставленных задач, лично проводился подбор и осуществлялось лечение пациентов, забор периферической крови и ликвора для лабораторных исследований, внесение полученной информации в специально разработанные электронные таблицы и статистическая обработка данных с последующей интерпретацией и формулированием выводов. Автор лично участвовал в подготовке всех публикаций по выполненной работе, в апробации результатов исследования, а также лично написал и оформил данную рукопись.

Внедрение результатов в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в практику лечебной работы отделения нейрохирургии БМУ Курской областной клинической больницы, а также в научный и учебный процесс кафедр неврологии и нейрохирургии, клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии КГМУ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, а именно области исследований: «Фундаментальные исследования, посвященные изучению строения, функционирования иммунной системы и механизмов иммунной защиты». Изучение патогенеза иммунозависимых заболеваний (иммунодефицитных состояний, аллергической и аутоиммунной патологии). Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики аллергических и иммунопатологических процессов.

Публикации

Основные материалы и положения диссертационного исследования были изложены в 7 публикациях, в том числе в 3 статьях рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста, иллюстрирована 4 рисунками и 14 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 41 отечественных и 176 зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клинические исследования. Под наблюдением было 105 пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой, находившихся на лечении в нейрохирургическом отделении Курской областной клинической больницы. Протокол клинического обследования больных утвержден Этическим комитетом ФГБОУ ВОКГМУ Минздрава России (протокол № 9 от 09.11.15г.). 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.

Основной контингент составили лица молодого работоспособного возраста (средний возраст - $39,8 \pm 18,63$ года), с преобладанием больных мужского пола (83,1%). Среди наблюдаемых пациентов у 38 (36,19%) была диагностирована изолированная закрытая ЧМТ, у 36 (34,28%) – изолированная открытая, у 26 (24,76%) – сочетанная травма с открытой ЧМТ и у 5 (4,76%) – сочетанная закрытая ЧМТ. Средний балл по шкале исходов Глазго – $3,9 \pm 0,5$ балла. Среди причин ЧМТ превалировала бытовая травма, включая криминальную и спортивную, которую получили 66 (62,85%) пациентов. У 39 пациентов травма была получена в ДТП. При анализе исходов ЧМТ на момент выписки пациентов из стационара было констатировано, что низкие баллы шкалы исходов комы Глазго (ШИКГ) были сопряжены с открытой ЧМТ и сочетанной травмой.

Оперативное лечение ЧМТ было проведено 85 (80,95%) пациентам. Летальность составила 36 случаев (34%), из них: 15 (14,3%) летальных исходов в группе с изолированной ЗЧМТ, 13 (12,3%) – летальных исходов среди пациентов с изолированной ОЧМТ, 6 (5,71%) – в группе больных с сочетанной ОЧМТ и 2 (1,9%) летальных исхода среди пациентов с закрытой сочетанной ЧМТ.

При поступлении в первые сутки 97 (92,38%) пациентов нуждались в инвазивной искусственной вентиляции легких (ИВЛ). Стабилизация гемодинамики, инотропная или вазопрессорная поддержка проводилась 22 (20,95%) пациентам.

Всем пациентам в клинической группе проводилось комплексное общесоматическое, неврологическое и рентгенологическое обследование. Локализация очагов поражения подтверждена данными КТ или МРТ головного мозга, в соответствии с которыми у 7 пациентов выявлено диффузное аксональное повреждение (ДАП) без латерального дислокационного синдрома с транстенториальным смещением, у 79 – острые травматические гематомы с

дислокацией более 7 мм и у 19 – множественные очаги ушиба с дислокационным синдромом до 4 мм. У всех пациентов наблюдалось массивное субарахноидальное кровоизлияние.

Методы лабораторных исследований. Общеклинические лабораторные исследования включали общий анализ крови с развернутой лейкоцитарной формулой и биохимический анализ с определением глюкозы, лактата, общего белка, электролитов (K, Na, Cl), билирубина с фракциями, мочевины, креатинина, амилазы, АлТ, АсТ, ЛДГ, коагулограммы. Оценка анализа ликвора проводилась с определением цвета, прозрачности, цитоза и общего белка.

Впервые 24 часа и через 7 суток после травмы пациентам выполнялась люмбальная пункция с забором цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и периферической крови из центральной вены. С целью оценки показателей системного и локального иммунитета в сыворотке крови и ЦСЖ исследовали содержание цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- γ , ИЛ-10) с набором реактивов («Вектор-Бест», Россия) методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Содержание α -дефензинов (HNP 1-3) в плазме крови и ЦСЖ определяли сэндвич методом ИФА с набором реагентов («ELISAKit, NuCultbiotechnology», Нидерланды). Для определения показателей, принимаемых за физиологическую норму обследованы 20 здоровых доноров (средний возраст 35,1 \pm 2,1года).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика цитокинового статуса пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой

Известно, что первоначальная воспалительная реакция после травмы и нарушения проницаемости ГЭБ сопровождается активацией микроглиальных клеток и продукцией провоспалительных цитокинов, среди которых ключевую роль играют ИЛ-1 β , ФНО- α и ИЛ-6, высокая концентрация которых способствует прогрессированию процесса апоптоза и вторичной клеточной гибели [Myer, D.J. 2006; Hercus, T.R. 2012]. Результаты проведенного исследования показали, что в первые сутки после ЧМТ уровни сывороточных цитокинов с провоспалительной активностью в десятки раз превышали значения доноров (рис.1).

Из данных представленных на рисунке 1 видно, что содержание ФНО- α в сыворотке крови в 5,7 раза было выше показателей здоровых лиц, ИЛ-1 β – в 5,3 раза, ИЛ-6 – в 12 раз и ИЛ-8 – в 12,8 раза, ИЛ-10 – в 6,6 и ИФН- γ – в 5,2 раза ($p < 0,05$).

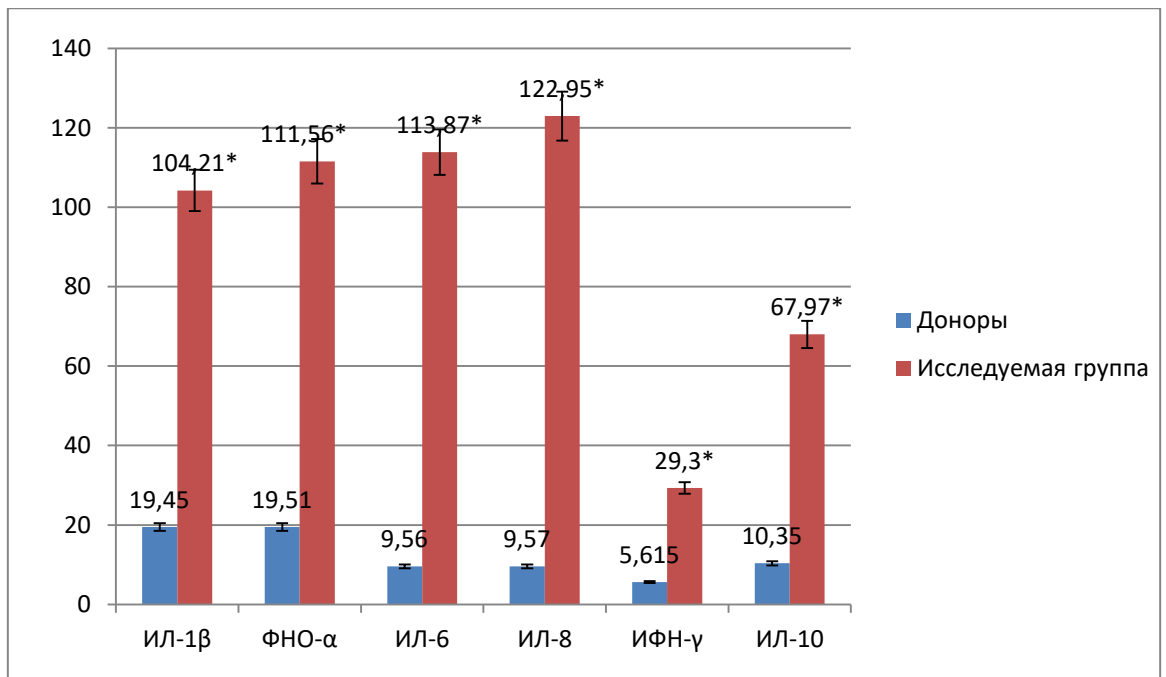


Рисунок 1. Профиль сывороточных цитокинов у больных с ЧМТ в первые сутки после травмы.

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

При сравнительном анализе содержания цитокинов в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости в первые сутки после ЧМТ более высокие концентрации исследуемых цитокинов были выявлены в ЦСЖ. Так, в частности, уровень ИЛ-1β – в 1,9 раза превышал сывороточные значения, ФНО-α – в 1,6, ИЛ-6 – в 3 раза, ИЛ-10 – в 1,5, ИЛ-8 и ИФН-γ – в 1,3 раза (табл. 1).

Таблица 1. Цитокиновый профиль сыворотки крови и цереброспинальной жидкости у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой

Цитокины пг/мл	Сыворотка крови		Цереброспинальная жидкость	
	1-е сутки	7-е сутки	1-е сутки	7-е сутки
ИЛ-1 β	104,21 \pm 1,71	49,76 \pm 1,19*	197,74 \pm 9,32	62,17 \pm 5,61*
ФНО- α	111,56 \pm 1,34	53,58 \pm 1,95*	182,11 \pm 9,89	77,53 \pm 4,75*
ИЛ-6	113,87 \pm 4,92	135,29 \pm 2,91*	342,42 \pm 13,83	455,28 \pm 14,96**
ИЛ-8	122,95 \pm 7,39	165,56 \pm 7,91*	149,05 \pm 9,98	242,7 \pm 12,37*
ИФН- γ	29,3 \pm 0,76	16,48 \pm 0,81	37,96 \pm 0,8	23,72 \pm 0,69
ИЛ-10	67,97 \pm 2,91	28,64 \pm 1,9*	104,32 \pm 7,99	54,51 \pm 7,04**

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ в сравнении с 1-ми и 7-ми сутками

Полученные результаты логично согласуются с тем, что продукция цитокинов всегда выше в очаге воспаления на уровне органа-мишени [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Gordon, S. 2005].

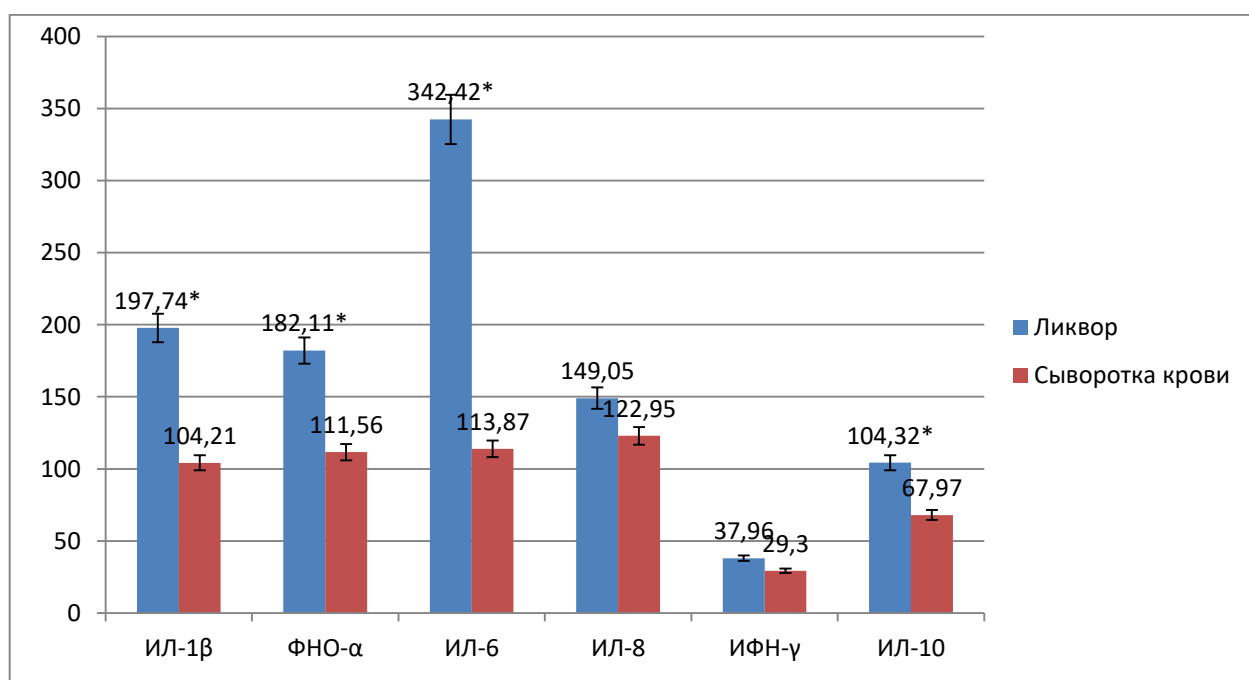


Рисунок 2. Цитокиновый профиль сыворотки крови и ликвора у пациентов с ЧМТ в 1-е сутки. Примечание: * – $p < 0,05$.

На 7-е сутки, по сравнению с первыми, в сыворотке крови отмечалось достоверное снижение уровня ИЛ-1 β и ФНО- α в 2,3 раза, ИФН- γ – в 1,8 раза и ИЛ-10 – в 2,4 раза ($p < 0,05$). При этом обращало внимание увеличение концентрации ИЛ-6 и ИЛ-8 в 1,3 и 1,6 раза соответственно ($p < 0,05$).

Аналогичная динамика цитокинов отмечалась на 7-е сутки после ЧМТ и в ликворе: уровень ИЛ-1 β снизился в 3,2 раза, ФНО- α - в 2,3 раза, ИФН- γ – в 1,6 и ИЛ-10 – в 2 раза ($p < 0,05$). Содержание ИЛ-6 и ИЛ-8 в ЦСЖ по сравнению с 1-ми сутками увеличилось

на 7-е сутки в 1,3 и 1,6 раза соответственно ($p < 0,05$). При этом динамика ИЛ-8 и ИЛ-6 в ЦСЖ на 7-е сутки после ЧМТ была аналогичной их сывороточной концентрации и характеризовалась достоверным увеличением ИЛ-8 в 1,5 и ИЛ-6 – в 3,4 раза соответственно (рис. 3).

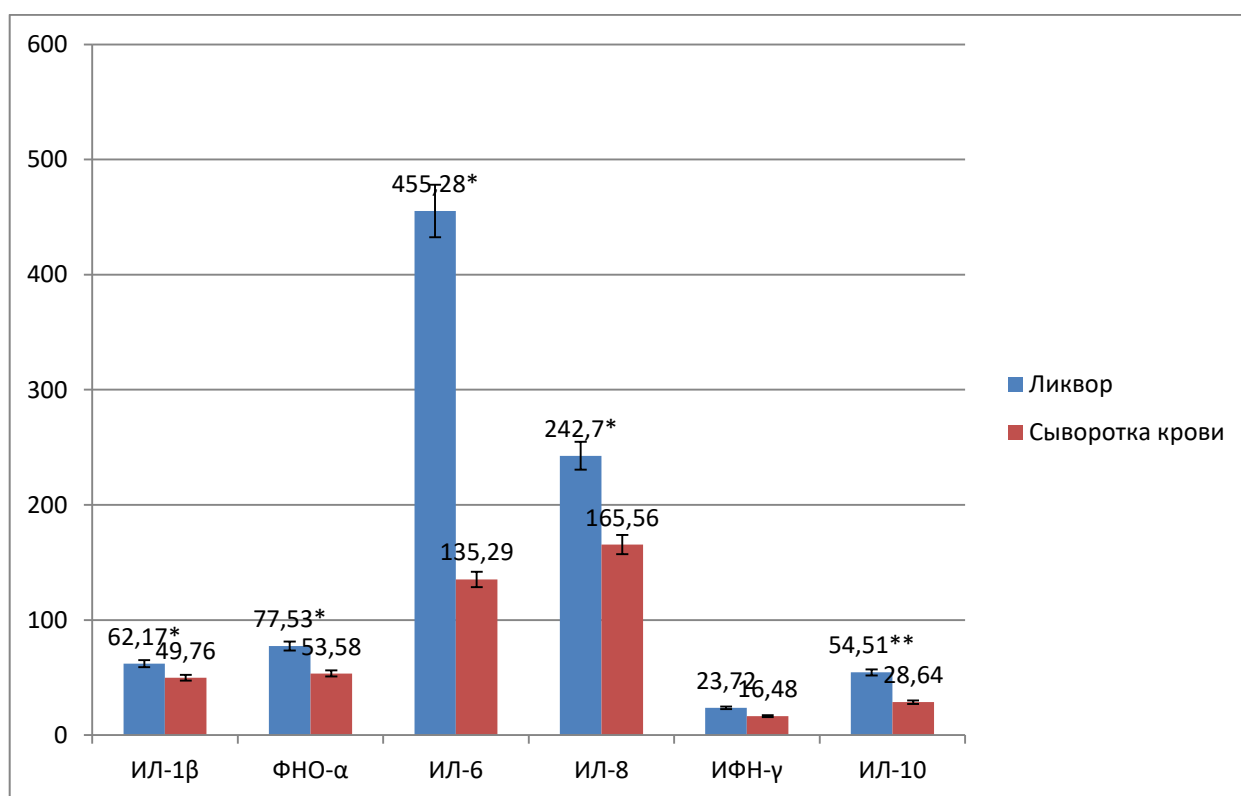


Рисунок 3. Цитокиновый профиль ликвора и сыворотки крови на 7-е сутки после травмы.

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Важно отметить, что повышенная продукция провоспалительных цитокинов, и в частности, ИЛ-8 и ИЛ-6, имеет важное значение в патогенезе нейровоспалительного процесса, так как следствием этого является снижение функции ГЭБ, что способствует привлечению гематогенных нейтрофилов в мозг и развитию воспалительных осложнений. Установлено

также, что ИЛ-8 играет ключевую роль в механизмах повреждения тканей при гипоксии, в том числе, головного мозга [Дмитриенко Е.В., Акимото Н. и др., 2013; Smith J.A., Das A., 2011].

Следует также констатировать, что изменение исследуемых показателей были взаимосвязаны. По результатам проведенного корреляционного анализа установлена прямая корреляционная зависимость между уровнем цитокинов, цитозом и содержанием белка в ликворе (табл. 2). При этом наиболее сильная корреляционная связь выявлена между ИЛ-6, ИЛ-8, уровнем цитоза и содержанием белка ($r_s > 0,5$).

Таблица 2. Корреляционная зависимость между показателями ликвора в 1-е и 7-е сутки после ЧМТ

Показатели	ИЛ-1 β	ФНО- α	ИЛ-6	ИЛ-8	ИФН- γ	ИЛ-10	Цитоз	Белок
ИЛ-1 β	0,465							
ФНО- α		0,645*						
ИЛ-6			0,619*					
ИЛ-8				0,623*				
ИФН- γ					-0,0456			
ИЛ-10						0,71*		
Цитоз							0,63*	
Белок								0,507*

Примечание: * $-r_s > 0,5$

Таким образом, результаты исследования цитокинового профиля на системном и локальном уровнях показали, что тяжелая черепно-мозговая травма сопровождается гиперсекрецией про- и противовоспалительных цитокинов, продукция которых в динамике развития воспалительного процесса, возникающего при травматическом поражении тканей мозга, имеет существенные особенности. В первые сутки после травмы в сыворотке крови и ЦСЖ наблюдается значительное увеличение концентрации цитокинов как с про- (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- γ), так и с противовоспалительной активностью (ИЛ-10). При этом уровень цитокинов в ЦСЖ достоверно превышал их сывороточные значения в среднем в 1,5 раза. Такую продукцию воспалительных медиаторов можно расценить как адекватную первоначальную реакцию иммунной системы на травму, а преобладание их концентрации на локальном уровне – в ЦСЖ особенностями их секреции.

В динамике на 7-е сутки после травмы отмечалось снижение содержания исследуемых цитокинов как в сыворотке крови, так и в ЦСЖ, кроме ИЛ-6 и ИЛ-8, концентрация которых увеличилась в обеих биологических жидкостях в 1,5-2 раза соответственно. Выявленная прямая

корреляционная зависимость между уровнем ИЛ-6, ИЛ-8, цитозом и содержанием белка в ЦСЖ свидетельствует об их важной роли в патогенезе ЧМТ.

Анализ содержания α -дефензинов(HNP1-3) в плазме крови и цереброспинальной жидкости у пациентов с ЧМТ

В реакциях организма, как направленных на поддержание генетического постоянства гомеостаза, так и в условиях патологии наиболее важную роль играют факторы врожденного иммунитета как первой линии защиты в развитии воспалительного процесса любого генеза, в том числе нейровоспалительного при травматической болезни головного мозга [Wraith D.C., 2012]. Повреждение в результате травмы вещества головного мозга, нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера сопровождается активацией мигроглии, продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов, миграцией из системного кровотока нейтрофилов, являющихся основным источником α -дефензинов [Lehger R.I., Lu W., 2012]. Показано, что α -дефензины, наряду с антимикробной активностью, являются мощными активаторами различных звеньев иммунной системы, что позволяет рассматривать их в качестве маркеров системной активации при мониторинге течения инфекционных, воспалительных и аутоиммунных патологических процессов [Yount, N. 2005; Czigler, A. 2009].

С учетом этого, а также отсутствия в литературе данных об участии α -дефензинов в развитии иммунного ответа при травматической болезни головного мозга, на следующем этапе работы мы провели сопоставительный анализ содержания α -дефензинов (HNP1-3) в плазме крови и цереброспинальной жидкости.

Результаты исследования показали, что в 1-е сутки после травмы наблюдалось значительное повышение содержания α -дефензинов (HNP 1-3) в плазме крови и ЦСЖ, но уровень HNP 1-3 в ЦСЖ был в 9,7 раза ниже, чем в плазме крови ($93261,4 \pm 8296,98$ пг/мл и $9569,2 \pm 562,12$ пг/мл соответственно). Аналогичная картина отмечалась и на 7-е сутки посттравматического периода, а именно, на фоне снижения к 7-м суткам содержания HNP 1-3 как в плазме крови, так и в ЦСЖ, их 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; $p < 0,05$).

При этом замечено, что на 7-е сутки после травмы более выраженное снижение содержания HNP 1-3 (в 2,3 раза) наблюдалось на локальном уровне – в ликворе (рис. 4).

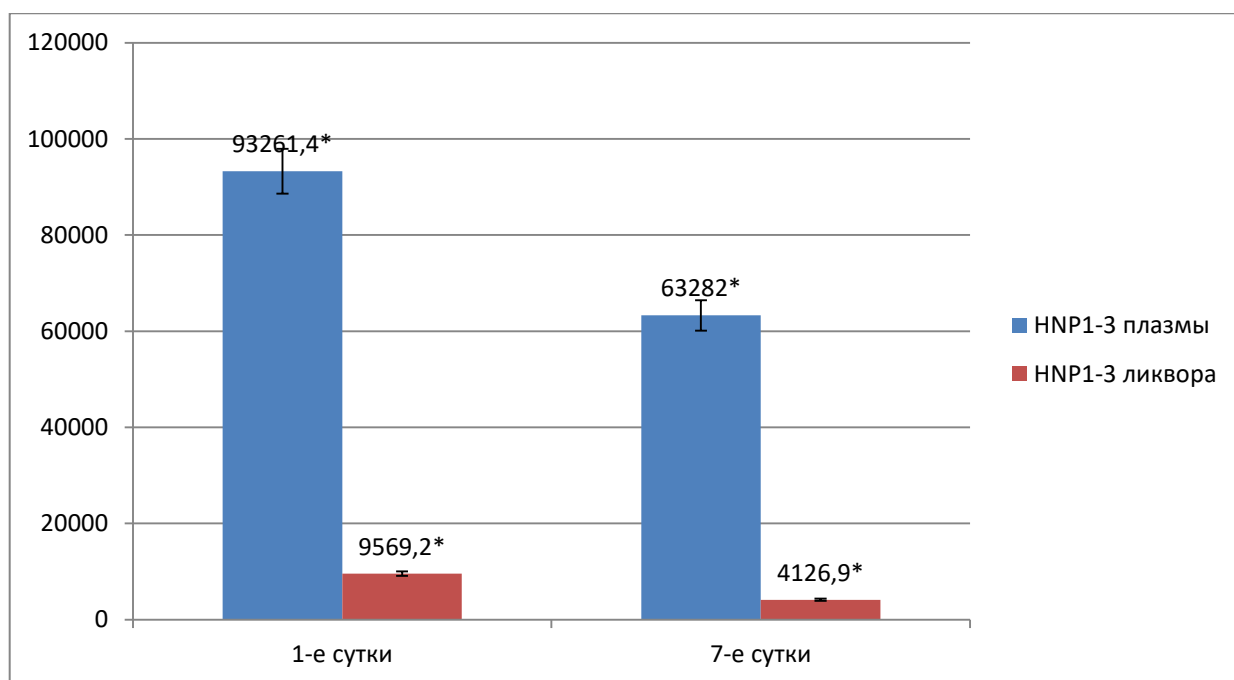


Рисунок 4. Динамика содержания HNP 1-3 в плазме крови и ликворе.

Примечание: * – $p < 0,05$.

Проведенный корреляционный анализ между показателями HNP 1-3 в плазме крови и ликворе в 1-е и 7-е сутки после травмы выявил сильную прямую корреляционную связь изменения концентрации HNP 1-3 в плазме крови и ликворе (табл. 3).

Таблица 3. 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 достоверная.

Принимая во внимание данные литературы о том, что α -дефензины наряду с антимикробной активностью индуцируют синтез цитокинов, представляло интерес сопоставить содержание α -дефензинов и цитокинов в исследуемых биологических жидкостях в разные сроки после ЧМТ. 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 (табл. 4).

Таблица 4. 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
ИЛ-1 β	Плазма	0,67*	0,22
	Ликвор	-0,325	-0,343
ФНО- α	Плазма	-0,155	-0,3
	Ликвор	-0,373	-0,44
ИЛ-6	Плазма	-0,501**	0,1
	Ликвор	0,118	-0,38
ИЛ-8	Плазма	-0,26	-0,13
	Ликвор	0,275	-0,31
ИФН- γ	Плазма	-0,682**	0,14
	Ликвор	-0,0136	-0,435
ИЛ-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.

Кроме этого, была проанализирована корреляционная зависимость между показателями HNP 1-3, цитокинами и общего анализа ликвора, выявившая достоверную сильную прямую корреляционную связь между HNP 1-3 и концентрацией ИЛ-1 β в плазме крови, содержанием белка и цитозом в ликворе в 1-е сутки после травмы (табл. 4). При этом сильная обратная связь наблюдалась между HNP 1-3 с ИЛ-6 и ИФН- γ в плазме крови. На 7-е сутки констатирована достоверная прямая корреляционная зависимость между уровнем HNP 1-3 и противовоспалительным цитокином ИЛ-10 как в плазме, так и в ликворе, что имеет важное значение в динамике течения и исходов воспалительного процесса в головном мозге. Как известно, ИЛ-10 является мощным регулятором иммунного ответа, ингибирующим продукцию провоспалительных цитокинов. Значительное снижение ИЛ-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 [Chaudhry A., 2011].

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что тяжелая ЧМТ сопровождается повышенной продукцией противомикробных пептидов (α -дефензинов – HNP 1-3), про- и противовоспалительных цитокинов, секреция которых в динамике развития воспалительного процесса в головном мозге имеет ряд особенностей.

В 1-е сутки после ЧМТ в плазме крови и ЦСЖ наблюдается значительное увеличение концентрации HNP 1-3. При этом уровень в плазме крови достоверно превышает их содержание в ЦСЖ в 9,7 раза. В динамике на 7-е сутки после травмы отмечалось снижение содержания HNP 1-3 как в плазме крови, так и в ЦСЖ, но более выраженное на локальном уровне – в ликворе.

Выявленная при проведении корреляционного анализа прямая корреляционная зависимость между уровнем HNP 1-3 и ИЛ-1 β в плазме крови, HNP 1-3 и содержанием белка, цитозом в ликворе в 1-е сутки, а также достоверная прямая корреляционная связь между HNP 1-3 и противовоспалительным цитокином ИЛ-10 в плазме крови и ликворе на 7-е сутки отражает динамику течения воспалительного процесса в головном мозге и может служить одним из прогностических критериев его исходов.

Информативность исследуемых биомаркеров в периферической крови и цереброспинальной жидкости в прогнозировании течения черепно-мозговой травмы

Согласно результатам проведенного исследования спектра провоспалительных и ингибирующих цитокинов, а также одного из важнейших факторов врожденного иммунитета – α -дефензинов 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 (табл.5).

Таблица 5. Корреляционная зависимость уровня ННР 1-3 и цитокинов крови и ликвора с исходами ЧМТ.

Цитокины		ШИКГ	
		1-е сутки	7-е сутки
ИЛ-10	Кровь	-0,0538	0,0169
	Ликвор	0,227	0,7**
ИФН- γ	Кровь	0,0388	0,17
	Ликвор	0,54*	-0,192
ИЛ-8	Кровь	0,0492	0,282
	Ликвор	-0,665*	-0,661*
ИЛ-6	Кровь	0,0123	0,238
	Ликвор	-0,421	-0,568*
ННР 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 достоверная.

Результаты исследования выявили достоверную сильную корреляционную связь между концентрацией ННР 1-3, ИЛ-10 и ИЛ-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 (табл.6).

Первая группа: пациенты с уровнем ННР 1-3 в ликворе на 7-е сутки после травмы менее 2000 пг/мл, ИЛ-8 более 300 пг/мл и ИЛ-10 менее 40 пг/мл – прогнозируется возможность неблагоприятного исхода ЧМТ (по ШИКГ 1-2 балла).

Вторая группа: пациенты с уровнем ННР 1-3 в ликворе на 7-е сутки после травмы 2000-4000 пг/мл, ИЛ-8 в пределах 200-300 пг/мл и ИЛ-10 в пределах 40-80 пг/мл – прогнозируется возможность условно неблагоприятного исхода (грубая инвалидизация) - по ШИКГ 3 балла.

Третья группа: пациенты с уровнем ННР 1-3 в ликворе более 4000 пг/мл, ИЛ-8 менее 300 пг/мл и ИЛ-10 более 80 пг/мл – прогнозируется возможность благоприятного исхода (частичное или полное восстановление после травмы) - по ШИКГ 4-5 баллов.

Таблица 6. Корреляционная зависимость ликворной концентрации HNP 1-3 и цитокинов на 7-е сутки с тяжестью состояния пациентов по ШИКГ

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

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что между клиническими показателями тяжести ЧМТ по шкале ком Глазго (ШКГ), включающей оценку уровня сознания, и шкале исходов ком Глазго (ШИКГ), а также ликворной концентрацией α -дефензинов (HNP 1-3), ИЛ-8 и ИЛ-10 на 7-е сутки после травмы имеется корреляционная зависимость, свидетельствующая об их важной роли в развитии воспалительного процесса в тканях мозга и целесообразности их исследования для прогнозирования тяжести течения и исходов тяжелой ЧМТ.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой (ЧМТ) в 1-е сутки после травмы в плазме крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) выявлено значительное увеличение концентрации α -дефензинов (HNP 1-3), при этом уровень в плазме крови достоверно превышал их содержание в ЦСЖ в 9,7 раза. В динамике на седьмые сутки после травмы отмечается снижение содержания HNP 1-3 как в плазме крови, так и в ЦСЖ, но более выраженное (в 2,3 раза) на локальном уровне – в ЦСЖ.

2. У больных с тяжелой ЧМТ в 1-е сутки после травмы в сыворотке крови и ЦСЖ наблюдается статистически достоверное увеличение концентрации цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- γ , ИЛ-10), при этом уровень цитокинов в ЦСЖ превышал их сывороточные значения в среднем в 1,5 раза. В динамике на 7-е сутки после травмы отмечалось снижение содержания исследуемых цитокинов в сыворотке крови и ЦСЖ, кроме ИЛ-6 и ИЛ-8, концентрация которых увеличилась в обеих биологических жидкостях в 1,5-2 раза соответственно, что способствует еще большему снижению проницаемости

гематоэнцефалического барьера, привлечению гематогенных нейтрофилов в мозг и развитию осложнений.

3. Между показателями оценки тяжести функционального состояния головного мозга по шкале ком Глазго (ШКГ) и шкале исходов ком Глазго (ШИКГ), уровнем α -дефенинов (HNP 1-3), ИЛ-8 и ИЛ-10 в ликворе пациентов с тяжелой ЧМТ на 7-е сутки после травмы имеется сильная достоверная корреляционная зависимость, свидетельствующая об их важной роли в развитии нейровоспалительного процесса.

4. Разработаны информативные прогностические критерии тяжести течения и исходов тяжелой ЧМТ с учетом уровня α -дефенинов (HNP 1-3), ИЛ-8 и ИЛ-10 в цереброспинальной жидкости пациентов на 7-е сутки после травмы, позволяющие своевременно диагностировать развитие осложнений и назначать адекватное лечение.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

С учетом полученных результатов для прогнозирования тяжести течения и исходов тяжелой ЧМТ рекомендуется исследование на 7-е сутки после травмы в цереброспинальной жидкости пациентов уровня α -дефенинов (HNP 1-3), ИЛ-8 и ИЛ-10.

У пациентов с уровнем HNP 1-3 в ликворе на 7-е сутки после травмы с менее 2000 пг/мл, ИЛ-8 более 300 пг/мл и ИЛ-10 менее 40 пг/мл прогнозируется возможность неблагоприятного исхода ЧМТ (по ШИКГ 1-2 балла).

У пациентов с уровнем HNP 1-3 в ликворе на 7-е сутки после травмы 2000-4000 пг/мл, ИЛ-8 в пределах 200-300 пг/мл и ИЛ-10 в пределах 40-80 пг/мл – прогнозируется возможность условно неблагоприятного исхода (грубая инвалидизация) – по ШИКГ 3 балла.

У пациентов с уровнем HNP 1-3 в ликворе более 4000 пг/мл, ИЛ-8 менее 300 пг/мл и ИЛ-10 более 80 пг/мл – прогнозируется возможность благоприятного исхода (частичное или полное восстановление после травмы) – по ШИКГ 4-5 баллов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Дюкарев В. В.**, Кравчук А. Д. Клинические особенности и исходы тяжелой ЧМТ. 81-й Всероссийская научная конференция студентов и молодых учёных с международным участием «Молодёжная наука и современность», посвящённой 81-летию Курского государственного медицинского университета г. Курск 20-22 апреля 2016 г. Том 1 стр. 442.

2. **Дюкарев В. В.** Диагностические и патогенетические значения биохимических показателей при черепно-мозговой травме. VIII Конференция молодых ученых РМАНПО с международным участием "Горизонты медицинской науки" г. Москва, Материалы конференции том 1, 2017 год, стр. 155.

3. **Дюкарев В. В.**, Юдина С. М. Особенности системного и локального профиля цитокинов при тяжелой черепно-мозговой травме. Международная конференция "Актуальные направления фундаментальных и прикладных исследований" 9-10.04.2018, NorthCharleston, USA т.2 стр. 29-31.

4. **Дюкарев В. В.**, Юдина С. М. Особенности цитокинового профиля спинномозговой жидкости у больных с черепно-мозговой травмой. X Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Биотехнология и биомедицинская инженерия" г. Курск 18-19.04.2018 г. стр. 158-159.

5. **Дюкарев В. В.**, Юдина С. М., Королев А. Г. Особенности цитокинового профиля сыворотки крови и ликвора у больных с черепно-мозговой травмой. **Иммунопатология, аллергология, инфектология.** 2018; № 3: стр. 27-32.

6. **Дюкарев В. В.**, Юдина С. М., Кравчук А. Д. Состояние факторов врожденного иммунитета у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой. **Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье"**. 2019, №1, стр. 18-23.

7. **Дюкарев В.В.**, Юдина С.М., Королев А.Г., Кравчук А.Д. Информативность исследования цитокинового профиля и α -дефензинов в прогнозировании течения черепно-мозговой травмы // **Современные проблемы науки и образования.** – 2019. – № 4.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=29021> (дата обращения: 13.10.2019).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- HNp 1-3 – human neutrophil lpeptide 1-3
- АлТ – аланинаминотрансфераза
- АсТ – аспартатаминотрансфераза
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ДАП – диффузное аксональное повреждение
- ДТП – дорожно-транспортное происшествие
- ЗЧМТ – закрытая черепно-мозговая травма
- ИВЛ – искусственная вентиляция легких
- ИЛ-10 – интерлейкин-10
- ИЛ-1 β – интерлейкин-1 бета
- ИЛ-6 – интерлейкин-6
- ИЛ-8 – интерлейкин-8
- ИФН- γ – интерферон-гамма
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КТ – компьютерная томография
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- ОЧМТ – открытая черепно-мозговая травма
- ПМП – противомикробные пептиды
- САК – субарахноидальное кровоизлияние
- ТЧМТ – тяжелая черепно-мозговая травма
- ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа
- ЦНС – центральная нервная система
- ЦСЖ – цереброспинальная жидкость
- ЧМТ – черепно-мозговая травма
- ШИКГ – шкала исходов комы Глазго
- ШКГ – шкала комы Глазго