

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ. ФИЗИОЛОГИЯ**  
**ORIGINAL ARTICLE. PHYSIOLOGY**

DOI: 10.22363/2313-0245-2019-23-1-19-24

**ДЕФЕНЗИНЫ- $\alpha$  В РАННЕМ ВОЗРАСТЕ У КРЫС  
ПРИ ОСТРОЙ СОМАТИЧЕСКОЙ БОЛИ**

**И.М. Быков<sup>1</sup>, В.В. Алексеев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов, Россия

В этой статье приведены результаты исследований реакции  $\alpha$ -дефензинов на острую соматическую боль у новорожденных крыс и в раннем пубертатном периоде. Исследования проводились на белых беспородных крысах в течение трех часов после болевого воздействия. Уровень  $\alpha$ -дефензинов определяли методом иммуноферментного анализа. В ходе экспериментов было выявлено краткосрочное увеличение уровня  $\alpha$ -дефензинов у новорожденных животных и животных раннего пубертатного периода. В то же время у животных месячного возраста наступает двухфазная, лабильная реакция увеличения уровня  $\alpha$ -дефензинов в периферической крови.

В настоящее время пристального внимания заслуживает изучение антимикробных полипептидов как факторов врожденного иммунитета, к которым микроорганизмы не выработали толерантность.

Наиболее изученным представителем этой группы полипептидов являются дефензины. Их антимикробная активность очевидна [1].

Диапазон действия дефензинов чрезвычайно широк. Мишенью их повреждающего действия являются микробы, грибы, вирусы, они участвуют в формировании воспаления, в том числе и развивающегося на иммунологической основе [2].

В числе продуцентов дефензинов выступают нейтрофилы. Они обнаружены в гранулах их лизосом [3–5] — это  $\alpha$ -дефензины, которые по мере продукции поступают в кровь [6].

Учитывая, что раздражение  $\alpha$ -адренорецепторов нейтрофилов катехоламинами повышает их функциональную активность [7] среди прочих эффектов следует ожидать и увеличение продукции  $\alpha$ -дефензинов. Острая боль, как очевидный стрессор, приводит к запуску симпатoadреналовой системы. На этом основании правомерен интерес к изучению содержания  $\alpha$ -дефензинов в периферической крови животных, которая может иметь свои особенности как во времени эксперимента, так и в возрастном аспекте.

**Цель:** изучить реакцию  $\alpha$ -дефензинов на острую соматическую боль у новорожденных крыс и в раннем пубертатном периоде.

**Ключевые слова:** боль, крысы, альфа-дефензины, нейтрофилы

*Ответственный за переписку:* Быков Илья Михайлович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 350063, ул. им. М. Седина, 4, г. Краснодар, Россия

Быков И.М. SPIN-код: 9977-6613, ORCID: 0000-0001-7325-5360

Алексеев В.В. SPIN-код: 9982-7420, ORCID: 0000-0002-8055-2184

**Для цитирования:**

Быков И.М., Алексеев В.В. Дефензины- $\alpha$  в раннем возрасте у крыс при острой соматической боли // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2019. Т. 23. No 1. С. 19–24. DOI: 10.22363/2313-0245-2019-23-1-19-24.

**For citation:**

Bykov I.M., Alekseev V.V. (2019). Defensins- $\alpha$  at an early age in rats with acute somatic pain. *RUDN Journal of Medicine*, 23 (1), 19–24. DOI: 10.22363/2313-0245-2019-23-1-19-24.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были выполнены на белых беспородных крысах трех возрастных групп: новорожденные (3—4-дневные) ( $n = 32$ ), прозревшие (12—15-дневные) ( $n = 32$ ), месячные (30—35-дневные) ( $n = 36$ ). Каждая группа распределялась на контрольную и экспериментальную подгруппы. У второй подгруппы моделировалась острая соматическая боль (ОСБ) путем электрокожного раздражения рецепторной зоны корня хвоста крысы, достигая 3—4 степени интенсивности на основании критериев А.В. Вальдмана и Ю.Н. Васильева в модификации В.Г. Овсянникова [8]. После моделирования ОСБ осуществлялся забор материала через 2, 30, 60, 120 и 180 минут. Концентрацию  $\alpha$ -дефензинов в сыворотке крови крыс определяли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов фирмы Cloud-Clone Corp (США). Приготовление растворов стандартов, конъюгатов А и В, промывочного буфера проводили согласно инструкции к набору.

Все манипуляции с экспериментальными животными проводили в соответствии с Прика-

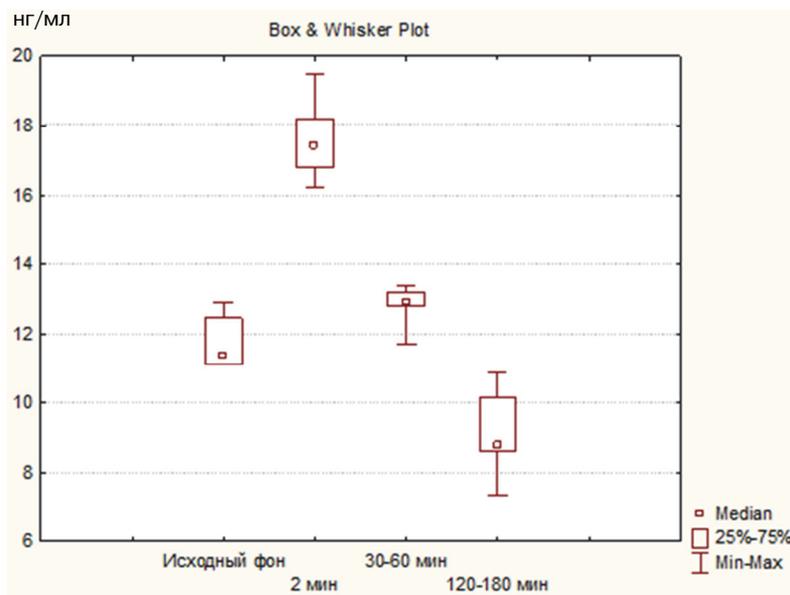
зом министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» от 23 августа 2010 г. [9].

Статистическое сравнение данных проводилось на основе U-критерия Манна—Уитни. Критическое значение уровня значимости ( $p$ ) принималось равным 0,05. Результаты расчетов представлены как медиана с квантилями и интервалом значений  $Me [Q_{0,25}; Q_{0,75}] (Min—Max)$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

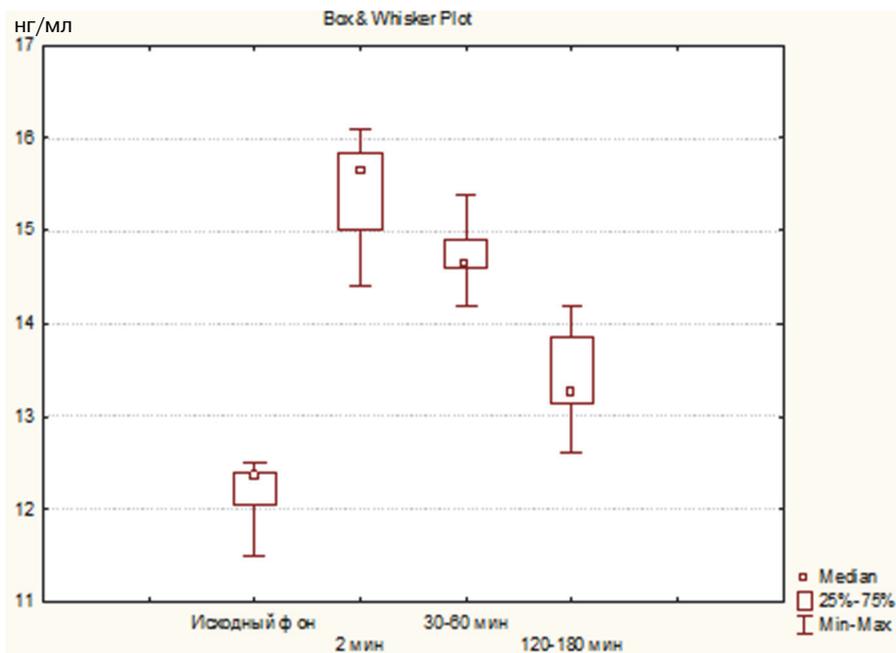
К моменту завершения внутриутробного развития особей их нейтрофилы уже продуцируют  $\alpha$ -дефензины [10].

У новорожденных крыс уровень дефензина- $\alpha$  низкий в сравнении с животными другого возраста. Медианные значения ( $Me_{\alpha-d}$ ) его содержания в крови составляют 11,7 нг/мл. Интерквартильный диапазон умеренный [ $Q_{0,25} = 11,1$  нг/мл;  $Q_{0,75} = 12,5$  нг/мл], минимальное содержание зарегистрировано на отметке 11,1 нг/мл, максимальное — 12,9 нг/мл (рис. 1).



**Рис. 1.** Динамика изменения содержания  $\alpha$ -дефензинов в сыворотке крови у новорожденных крыс до и после нанесения аллогенного раздражения

**Fig. 1.** Dynamics of changes in the content of  $\alpha$ -defensins in the serum of newborn rats before and after the application of allogenic irritation



**Рис. 2.** Динамика изменений содержания  $\alpha$ -дефензинов в сыворотке крови у прозревших крыс до и после нанесения аллогенного раздражения

**Fig. 2.** Dynamics of changes in the content of  $\alpha$ -defensins in the blood serum of the mature rats before and after the application of algogenic irritation

Через две минуты после острой боли у новорожденных крыс содержание  $\alpha$ -дефензинов — 17,6 нг/мл ( $Me_{\alpha-d}$ ) при  $Q_{0,25} = 16,8$  нг/мл,  $Q_{0,75} = 18,2$  нг/мл,  $min = 16,2$  нг/мл,  $max = 19,5$  нг/мл ( $p < 0,01$  относительно значений контрольной группы).

Спустя 30—60 минут после острой боли  $Me_{\alpha-d} = 12,9$  нг/мл [ $Q_{0,25} = 12,8$  нг/мл;  $Q_{0,75} = 13,2$  нг/мл] ( $min = 11,7$  нг/мл,  $max = 13,4$  нг/мл ( $p < 0,01$ )).

Снижение содержания  $\alpha$ -дефензина ниже контрольного уровня значений наблюдается после 120—180 минут от начала эксперимента ( $Me_{\alpha-d} = 9,2$  нг/мл; [ $Q_{0,25} = 8,6$  нг/мл;  $Q_{0,75} = 10,2$  нг/мл]) ( $p < 0,01$ ). Минимальное содержание  $\alpha$ -дефензинов в этом исследовании — 7,3 нг/мл, а максимальное — 10,9 нг/мл.

Таким образом, острое болевое воздействие манифестируется подъемом содержания  $\alpha$ -дефензинов, но эта реакция не стойкая и быстро истощаема. Уровень  $\alpha$ -дефензинов в крови после ОСБ сопровождается всплеском показателей, однако они достаточно быстро приближаются к конт-

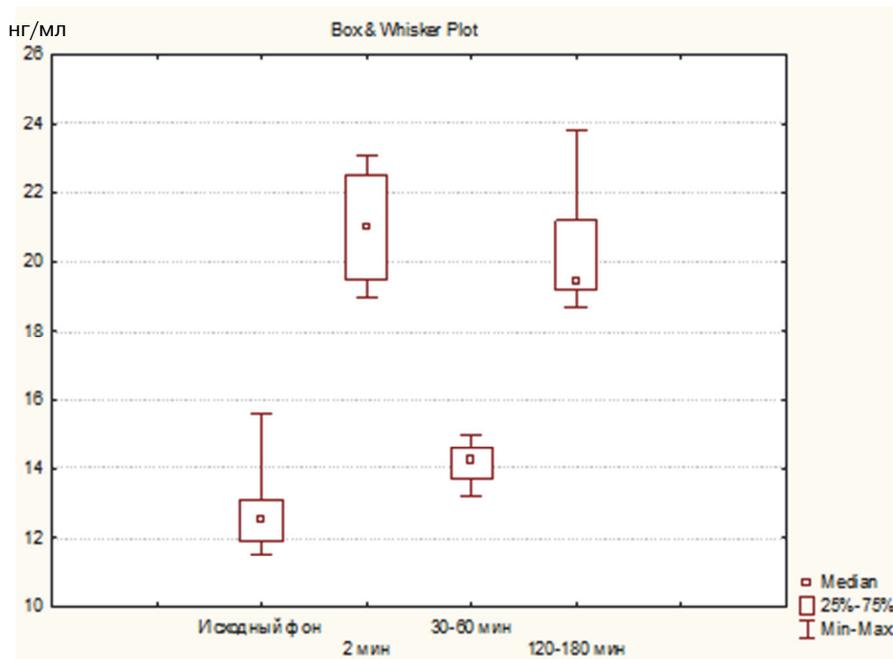
рольным значениям, а к концу эксперимента падают ниже исходных цифр. Наблюдаемую реакцию возможно расценить как быстро истощаемую и астеничную.

У прозревших в норме уровень содержания  $\alpha$ -дефензинов незначительно выше, чем у новорожденных.  $Me_{\alpha-d} = 12,4$  нг/мл [ $Q_{0,25} = 12,1$  нг/мл;  $Q_{0,75} = 12,4$  нг/мл].  $Min$  — 11,5 нг/мл, а  $Max$  — 12,5 нг/мл (см. рис. 2).

Сразу после болевого воздействия уровень  $\alpha$ -дефензинов повышается.  $Me_{\alpha-d} = 15,7$  нг/мл ( $p < 0,01$ ). Наблюдается реакция менее рельефна, чем у новорожденных [ $Q_{0,25} = 15,0$  нг/мл;  $Q_{0,75} = 15,9$  нг/мл]. Значения в выборке колеблются от 14,4 до 16,1 нг/мл.

Через 30—60 минут наблюдается тенденция к падению содержания исследуемого фактора  $Me_{\alpha-d} = 14,7$  нг/мл. При этом его уровень не достигает контрольных цифр ( $p < 0,001$ ) [ $Q_{0,25} = 14,6$  нг/мл;  $Q_{0,75} = 14,9$  нг/мл].  $Min$  в выборке — 14,2 нг/мл,  $Max$  — 15,4 нг/мл.

В течение последующего времени график снижения  $\alpha$ -дефензинов сохраняет пологий харак-



**Рис. 3.** Динамика изменений содержания  $\alpha$ -дефензинов в сыворотке крови у животных месячного возраста до и после аллогенного раздражения

**Fig. 3.** Dynamics of changes in the content of  $\alpha$ -defensins in the serum of animals of one month of age before and after allogeinic irritation

тер и не достигает контрольного уровня ( $p < 0,01$ ) при  $Me_{\alpha-d} = 13,3$  нг/мл [ $Q_{0,25} = 13,2$  нг/мл;  $Q_{0,75} = 13,9$  нг/мл] и 12,6 нг/мл (min) и 14,2 нг/мл (max).

У прозревших животных ответная реакция  $\alpha$ -дефензинов на болевой стимул менее выражена, чем у новорожденных животных.

Кроме того, в динамике всего исследования уровень  $\alpha$ -дефензинов превышает контрольные значения, хотя его снижение в динамике очевидно.

У крыс месячного возраста содержание  $\alpha$ -дефензинов близко по своим значениям к результатам предыдущих исследований и составляет 12,5 нг/мл, при этом нижняя квантиль ( $Q_{0,25}$ ) 11,9 нг/мл, нижняя квантиль ( $Q_{0,75}$ ) 13,1 нг/мл при 11,5 нг/мл (min), 15,6 нг/мл (max).

Спустя 2 минуты после болевого воздействия наблюдается повышение уровня  $\alpha$ -дефензинов в крови. Он равен 21,0 нг/мл — различие в сопоставлении с контролем высоко значимо ( $p < 0,01$ ) [ $Q_{0,25} = 19,5$  нг/мл;  $Q_{0,75} = 22,5$  нг/мл]. Компактность ряда менее выражена, нежели в предыдущих сериях опытов, минимальное

значение — 19,0 нг/мл, а максимальное — 23,1 нг/мл.

Содержание  $\alpha$ -дефензинов в крови снижается, но не достигая исходных значений, при этом медиана значений составляет 14,2 нг/мл ( $Me_{\alpha-d}$ ), нижняя квантиль ( $Q_{0,25}$ ) 13,7 нг/мл, верхняя квантиль ( $Q_{0,75}$ ) 14,6 нг/мл, минимальное значение в выборке 13,2 нг/мл, максимальное — 15,2 нг/мл ( $p < 0,01$ ). По прошествии 120—180 минут зарегистрирована вторая волна повышения уровня  $\alpha$ -дефензинов.  $Me_{\alpha-d} = 19,4$  нг/мл. По сравнению с контрольными значениями это различие высоко значимо ( $p < 0,01$ ) [ $Q_{0,25} = 19,4$  нг/мл;  $Q_{0,75} = 19,2$  нг/мл]. Разброс от 18,7 нг/мл — min; 23,8 нг/мл — max.

Таким образом, очевидна выраженная лабильность и нестабильность ответа в сравнении с двумя предыдущими возрастными группами.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как показало исследование  $\alpha$ -дефензинов, ответная реакция на болевое раздражение имеет

свои особенности в зависимости от возраста подопытных животных.

Новорожденные особи реагируют подъемом уровня  $\alpha$ -дефензинов, однако реакция непродолжительна и быстро истощаема.

Прозревшие животные сохраняют ту же тенденцию, но повышение содержания  $\alpha$ -дефензинов в их крови ниже, чем у новорожденных.

Реакция животных месячного возраста носит двухфазный характер, она неустойчива и лабильна.

У новорожденных повышена чувствительность  $\alpha$ -адренорецепторов нейтрофилов по отношению к катехоламинам [11]. Раздражение  $\alpha$ -адренорецепторов влечет за собой повышение функциональной активности нейтрофилов [7], это объясняет существенное и быстрое увеличение короткоживущих  $\alpha$ -дефензинов в периферической крови в ответ на действие стрессора, каким является боль. В то же время у новорожденных ограничены функциональные возможности нейтрофилов [12]. Очевидно, этим объясняется краткосрочность реакции, а то, что уровень исследуемого субстрата принимает значения ниже нормальных, также объяснимо с позиций ограниченных функциональных возможностей нейтрофилов, что и есть причина неспособности компенсации потерянного дефензина.

У прозревших животных наступает баланс активности  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов нейтрофилов, чем можно объяснить менее выраженную реакцию в сравнении с новорожденными.

Высокая лабильность и быстрая истощаемость продукции  $\alpha$ -дефензинов крысами месячного возраста вполне объяснима с общебиологических позиций о высокой и нескоординированной функциональной активности в препубертатном возрасте.

## ВЫВОДЫ

1. При острой боли наблюдается краткосрочное быстро истощаемое повышение уровня

$\alpha$ -дефензинов в периферической крови в группе новорожденных крыс.

2. У прозревших животных повышение уровня  $\alpha$ -дефензинов в ответ на боль вялое и инертное.

3. У животных месячного возраста после нанесения болевого воздействия наступает двухфазная, лабильная реакция увеличения уровня  $\alpha$ -дефензинов в периферической крови, которая закономерно сменяется его падением.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Wilson S.S., Wiens M.E., Smith J.G. Antiviral mechanisms of human defensins // *J. Mol. Biol.* 2013. № 425. P. 4965—4980.
2. Hancock R.E., Haney E.F., Gill E.E. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity // *Nat. Rev. Immunol.* 2016. № 16. P. 321—334.
3. Lehrer R., Lichtenstein A., Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells // *Annu. Rev. Immunol.* 1993. Vol. 11. P. 105—128.
4. Zeya H.I., Spitznagel J.K. Antibacterial and enzymatic basic protein from leukocyte lysosomes: separation and identification // *Science.* 1963. Vol. 142. P. 1085—1087.
5. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука, 2006. 206 с.
6. Lehrer R.I., Ganz T. Defensins of vertebrate animals // *Curr. Opin. Immunol.* 2006. Vol. 14. P. 96—102.
7. Шилов Ю.И., Орлова Е.Г., Ланин Д.В. Адренергические механизмы регуляции фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови при стрессе и введении гидрокортизола // *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2004. № 3. С. 8—13.
8. Овсянников В.Г. Очерки патофизиологии боли. Ростов н/Д.: Цветная печать, 2003. 159 с.
9. Приказ министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» от 23 августа 2010 г. // *Российская газета*, № 240, 22.10.2010.
10. Mikkel F., Kamp S., Cowland J.B., et al. Prodefensins are matrix proteins of specific granules in human neutrophils // *J. Leukoc. Biol.* 2005. Vol. 8. № 78. P. 785—793.
11. Леви Д. Адренорецепторы, их стимуляторы и блокаторы // В кн.: *Эндокринология* / Под ред. Н. Лавина. Пер. с англ. М.: Практика, 1999. С. 54—60.
12. Воронцов И.М., Мазурин А.В. Пропедевтика детских болезней. СПб., 2009. 1008 с.



© Быков И.М., Алексеев В.В., 2019  
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Поступила 27.02.2019  
Принята 14.03.2019

## DEFENSINS- $\alpha$ AT AN EARLY AGE IN RATS WITH ACUTE SOMATIC PAIN

I.M. Bykov<sup>1</sup>, V.V. Alekseev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Kuban State Medical University

<sup>2</sup>The Rostov State Medical University

**Abstract.** This article presents the results of studies on the reaction of  $\alpha$ -defensins to acute somatic pain in newborn rats and in the early puberty period. Studies were carried out on white mongrel rats for three hours after pain exposure. The level of  $\alpha$ -defensins was determined by enzyme immunoassay. During the experiments, a short-term increase in the level of  $\alpha$ -defensins in newborns and rats in the early puberty period was revealed. At the same time, in animals of one month of age a two-phase, labile reaction of an increase in the level of  $\alpha$ -defensins in peripheral blood occurs.

**Key words:** pain,  $\alpha$ -defensins, rats, neutrophils

### REFERENCES

1. Wilson S.S., Wiens M.E., Smith J.G. Antiviral mechanisms of human defensins // *J. Mol. Biol.* 2013. № 425. P. 4965—4980.
2. Hancock R.E., Haney E.F., and Gill E.E. (2016). The immunology of host defense peptides: beyond antimicrobial activity // *Nat. Rev. Immunol.* 2016. № 16. P. 321—334.
3. Lehrer R., Lichtenstein A., Ganz T. Defensin: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells // *Annu. Rev. Immunol.* 1993. Vol. 11. P. 105—128.
4. Zeya H.I., Spitznagel J.K. Antibacterial and enzymatic basic protein from leukocyte lysosomes: separation and identification // *Science.* 1963. Vol. 142. P. 1085—1087.
5. Kokryakov V.N. Essays on innate immunity. SPb.: Science, 2006. 206 p.
6. Lehrer R.I., Ganz T. Defensin of vertebrate animals // *Curr. Opin. Immunol.* 2006. Vol. 14. P. 96—102.
7. Shilov Yu.I., Orlova E.G., Lanin D.V. Adrenergic mechanisms of regulation of the phagocytic activity of peripheral blood neutrophils under stress and the introduction of hydrocortisol // *Immunopathology, Allergology, Infectology.* 2004. Number 3. P. 8—13.
8. Ovsyannikov V.G. *Essays on the pathophysiology of pain.* Rostov n/D.: Color printing, 2003. 159 p.
9. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation No. 708n “On approval of laboratory practice rules” dated August 23, 2010. *Rossiyskaya Gazeta*, No. 240, 10/22/2010.
10. Mikkel F., Kamp S., Cowland J.B., et al. Prodefensins are matrix proteins of human granules in human neutrophils // *J. Leukoc. Biol.* 2005. Vol. 8, No. 78. P. 785—793.
11. Levi D. Adrenoreceptors, their stimulants and blockers // In the book: *Endocrinology.* Ed. N. Avalanche. Per. from English. M.: Practice, 1999. P. 54—60.
12. Vorontsov I.M., Mazurin A.V. *Propedeutics of childhood diseases.* St. Petersburg, 2009. 1008 p.

© Bykov I.M., Alekseev V.V., 2019

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



Received 27.02.2019

Accepted 14.03.2018