



© CC Коллектив авторов, 2022
УДК [616.831-005.1 : 611.018.1]-076.5
DOI: 10.24884/1607-4181-2022-29-2-32-40

А. В. Луговая*, Ю. В. Эмануэль, А. В. Артемова, Е. В. Семенова, В. В. Семенова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ БИОМАРКЕРОВ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Поступила в редакцию 11.03.2022 г.; принята к печати 23.05.2022 г.

Резюме

Цель — провести сравнительный анализ динамики биомаркеров апоптоза и аутофагии в периферической крови пациентов в остром периоде ишемического инсульта (ИИ) и сопоставить с динамикой тяжести неврологического дефицита по шкале NIHSS (шкала инсульта Национального института здоровья) и объемом очага поражения головного мозга по результатам магнитно-резонансной томографии. Оценить роль изучаемых показателей в прогнозе исхода острого периода заболевания.

Методы и материалы. Обследованы 56 пациентов в остром периоде впервые развившегося атеротромботического ИИ. Контрольную группу составили 29 здоровых доноров. Пациентам проводили динамическое клиничко-неврологическое обследование в 1-е, 7-е и 14-е сутки от начала заболевания. В эти же временные интервалы оценивали динамику экспрессии биомаркеров апоптоза и аутофагии в периферической крови методом проточной цитометрии и сопоставляли с показателями неврологического статуса в 1-е, 7-е и 14-е сутки соответственно с помощью корреляционного анализа.

Результаты. Статистически достоверное повышение экспрессии аннексина V и каспазы-3, по сравнению с группой контроля, отмечалось на протяжении всего исследования во всех популяциях лейкоцитов с максимальным повышением показателей в первые 24 ч. Повышенные уровни экспрессии аннексина V и каспазы-3 положительно коррелировали с тяжестью неврологического дефицита и объемом повреждения головного мозга в 1-е и 7-е сутки. Выявлена прямая корреляционная зависимость между повышенными значениями биомаркеров аутофагии LC3, Cyto-ID, объемом повреждения головного мозга и тяжестью неврологического дефицита на 7-е сутки.

Заключение. Статистически значимое повышение биомаркеров апоптоза и аутофагии в периферической крови в остром периоде ИИ коррелирует с тяжестью клиничко-неврологических показателей. Роль значительного повышения каспазы-3 как предиктора неблагоприятного исхода заболевания требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: апоптоз, аутофагия, аутофагосома, острый ишемический инсульт, биомаркеры аутофагии, биомаркеры апоптоза, LC3, p62, аннексин V, каспаза-3, проточная цитометрия, клиническая лабораторная диагностика

Для цитирования: Луговая А. В., Эмануэль Ю. В., Артемова А. В., Семенова Е. В., Семенова В. В. Оценка динамики биомаркеров аутофагии и апоптоза в остром периоде ишемического инсульта методом проточной цитометрии. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.* 2022;29(2):32–40. DOI: 10.24884/1607-4181-2022-29-2-32-40.

* Автор для связи: Анна Владимировна Луговая, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8. E-mail: lugovaya2710spb@icloud.com.

Anna V. Lugovaya*, Yuliya V. Emanuel, Anastasia V. Artemova, Ekaterina V. Semenova, Varvara V. Semenova

Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

ASSESSMENT OF THE DYNAMICS OF AUTOPHAGY AND APOPTOSIS BIOMARKERS IN THE ACUTE PERIOD OF ISCHEMIC STROKE USING FLOW CYTOMETRY

Received 11.03.2022; accepted 23.05.2022

Summary

The objective was to conduct a comparative analysis of the dynamics of biomarkers of apoptosis and autophagy in the peripheral blood of patients in the acute period of ischemic stroke (IS) and compare it with the dynamics of the severity of

neurological deficit according to the NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) and the volume of the brain lesion according to the results of magnetic resonance imaging (MRI). To assess the role of the studied parameters in the prognosis of the outcome of the acute period of the disease.

Methods and material. We examined 56 patients in the acute period of newly developed atherothrombotic IS. The control group consisted of 29 healthy donors. Patients underwent a dynamic clinical and neurological examination on the 1st, 7th and 14th days from the onset of the disease. At the same time intervals, the dynamics of the expression of biomarkers of apoptosis and autophagy in peripheral blood was evaluated by flow cytometry and compared with neurological status indicators on the 1st, 7th, and 14th days, respectively, using correlation analysis.

Results. A statistically significant increase in the expression of annexin V and caspase-3 compared with the control group was observed throughout the study in all populations of leukocytes with a maximum increase in the first 24 hours. Increased expression levels of annexin V and caspase-3 positively correlated with the severity of neurological deficit and the amount of brain damage on the 1st and 7th days. A direct correlation was found between increased values of autophagy biomarkers LC3, Cyto-ID, the amount of brain damage, and the severity of neurological deficit on the 7th day.

Conclusion. A statistically significant increase in biomarkers of apoptosis and autophagy in the peripheral blood in the acute period of IS correlates with the severity of clinical and neurological parameters. The role of a significant increase in caspase-3 as a predictor of adverse disease outcome requires further study.

Keywords: apoptosis, autophagy, acute ischemic stroke, autophagy biomarkers, apoptosis biomarkers, LC3, p62, annexin V, caspase-3, flow cytometry, clinical laboratory diagnostics

For citation: Lugovaya A. V., Emanuel Yu. V., Artemova A. V., Semenova E. V., Semenova V. V. Assessment of the dynamics of autophagy and apoptosis biomarkers in the acute period of ischemic stroke using flow cytometry. *The Scientific Notes of Pavlov University*. 2022;29(2):32–40. (In Russ.). DOI: 10.24884/1607-4181-2022-29-2-32-40.

* **Corresponding author:** Anna V. Lugovaya, Pavlov University, 6-8, L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, 197022, Russia. E-mail: lugovaya2710spb@icloud.com.

ВВЕДЕНИЕ

Острый ишемический инсульт (ИИ) является актуальной медицинской и социальной проблемой. Высокая смертность и инвалидизация, сопровождающие острый ИИ, диктуют необходимость создания новых алгоритмов профилактики, диагностики и прогноза исхода заболевания. Помочь в этом могут надежные биологические маркеры и высокотехнологичные методы лабораторной диагностики [1–3].

Результаты новейших исследований свидетельствуют о том, что апоптоз, аутофагия и некроз являются основными механизмами гибели нейронов при остром ИИ [4, 5]. Тем не менее до конца не ясно, какой из этих процессов преобладает на конкретном этапе ишемического каскада и в большей степени влияет на исход заболевания.

В экспериментах установлено, что аутофагия, как и апоптоз, активируется в пенумбре [4, 6, 7]. По мнению ряда авторов [8–10], выяснение путей, которые лежат в основе патогенетических механизмов, действующих в пенумбре и, как было показано, влияющих на распространение аутоиммунного постишемического воспаления, имеет большой клинический интерес для разработки новых терапевтических стратегий. Считается, что поврежденные апоптозом и аутофагией нейроны в зоне пенумбры можно восстановить, в отличие от нейронов, погибших по механизму некроза, локализующихся в зоне ишемического ядра и не подлежащих регенерации [11, 12].

Исследования в области нейроиммунологии позволили установить сигнальные белки, инициирующие как апоптотическую, так и аутофагическую гибель клеток головного мозга при остром ИИ [13, 14]. Эти белки действуют либо синергично за счет создания общих модулей, либо альтернативно, в качестве переключателей с одной клеточной про-

граммы на другую. По мнению ученых [7, 11], исследование перекрестных взаимодействий между апоптозом и аутофагией и их отдельными медиаторами в патогенезе острого ИИ представляет большой интерес. Сравнительная оценка динамики концентрации биомаркеров аутофагии и апоптоза в периферической крови пациентов с острым ИИ в сопоставлении с динамикой тяжести неврологического дефицита и объемом поражения головного мозга поможет глубже понять перекрестные взаимодействия между этими процессами на разных этапах острого периода ишемического инсульта.

Таким образом, апоптоз и аутофагия представляют собой перспективные задачи для исследования с целью разработки принципиально новых методов диагностики и прогноза исхода острого ИИ.

Цель исследования — оценить динамику экспрессии биомаркеров апоптоза и аутофагии на лейкоцитах периферической крови пациентов в остром периоде ишемического инсульта и сопоставить с динамикой тяжести неврологического дефицита по шкале NIHSS и объемом очага поражения головного мозга по результатам магнитно-резонансной томографии (МРТ) в 1-е, 7-е и 14-е сутки от начала заболевания соответственно. Оценить значение изучаемых показателей в прогнозе исхода острого периода заболевания.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

В соответствии с поставленной целью были обследованы 56 пациентов (42 мужчины и 14 женщин) в возрасте от 45 до 60 лет (средний возраст — $(54,1 \pm 4,5)$ года) в остром периоде впервые развившегося ИИ (атеротромботический патогенетический вариант). Пациенты были включены в исследование в первые 24 ч от начала заболевания и составили основную группу. В качестве контрольной группы были обследованы 29 здоровых

лиц по полу и возрасту, сопоставимые с больными острым ИИ.

Исследованием предусмотрены следующие критерии включения: возраст от 45 до 60 лет; верифицированный с помощью МРТ впервые выявленный острый ИИ в системе внутренней сонной артерии (атеротромботический патогенетический вариант); пол пациентов – мужской, женский; не более 24 ч от начала развития заболевания; неврологическая симптоматика не более 13 баллов по шкале NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale – шкала инсульта Национального института здоровья).

Основные критерии исключения: возраст менее 45 или более 60 лет; повторный инсульт; геморрагический инсульт либо спонтанное субарахноидальное кровоизлияние; наличие сахарного диабета в анамнезе.

Пациентам проводили динамическое клинико-неврологическое обследование с оценкой выраженности неврологического дефицита по шкале NIHSS, исследование объема очага поражения методом МРТ головного мозга, тестирование по модифицированной шкале Рэнкина в 1-е, 7-е и 14-е сутки от начала заболевания.

Динамику экспрессии биомаркеров апоптоза и аутофагии на лейкоцитах периферической крови (ПК) оценивали в первые 24 ч от начала заболевания, на 7-е и 14-е сутки (начало периода реабилитации) методом проточной цитометрии. Для анализа каждой пробы использовали цельную кровь. Для оценки аутофагии проводили пермеабиллизацию мембраны с последующим окрашиванием исследуемых образцов моноклональными антителами (МКАТ) к основным показателям аутофагии – LC3 и p62 (*Biorbyt Explore Bioreagents*, UK).

Для количественного определения аутофагосом в циркулирующих клетках ПК применяли набор для детекции аутофагии (CYTO-ID® Autophagy detection kit 2.0), содержащий индикаторный краситель Cyto-ID, конъюгированный с флуорохромом FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианат). Этот катионный амфифильный зонд специфически распознает аутофагические вакуоли на всех стадиях аутофагии: преаутофагосомы → аутофагосомы → аутофаголизосомы.

Пробоподготовку анализируемых образцов осуществляли в соответствии с инструкциями поставляемых наборов реагентов. Затем опытные пробы и контрольные образцы анализировали на проточном цитометре MoFlo TM Astrios EQ (*Beckman Coulter*, USA).

Интенсивность экспрессии биомаркеров апоптоза и аутофагии оценивали как в общей, так и в каждой отдельной популяции лейкоцитов – лимфоцитарной, моноцитарной и гранулоцитарной.

Уровень апоптоза лейкоцитов ПК анализировали по количеству аннексина V и каспаза-

3-«позитивных» клеток с помощью коммерческих наборов для проточной цитометрии «Annexin-V-FITC Apoptosis Detecton Kit» (*Abcam*, UK) и «Caspase-3, Active Form, mAb Apoptosis Kit: FITC» (*Beckman Coulter*, USA) соответственно.

Внутриклеточную экспрессию биомаркеров аутофагии оценивали по количеству LC3- и p62-«позитивных» клеток в каждой отдельной исследуемой популяции (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) и в общей популяции лейкоцитов.

Количество активных аутофагосом оценивали по средней интенсивности флуоресценции (MFI – mean fluorescence intensity) красителя Cyto-ID.

Все исследуемые показатели (биомаркеры апоптоза и аутофагии, уровень неврологического дефицита, объем очага поражения) оценивали одновременно – в 1-е, 7-е и 14-е сутки от начала заболевания. В указанные дни всем пациентам осуществляли забор венозной крови, рассчитывали баллы по шкале NIHSS, проводили МРТ головного мозга. С целью сравнительного анализа динамики биомаркеров апоптоза и аутофагии в сопоставлении с динамикой тяжести неврологического статуса проводили корреляционный анализ между средними значениями биомаркеров апоптоза, аутофагии и средними значениями показателей неврологического дефицита и объема поражения головного мозга в 1-е, 7-е и 14-е сутки соответственно.

Для статистической обработки полученных данных использовали непараметрический критерий Вилкоксона – Манна – Уитни для сравнения средних, корреляционный анализ по Спирману. Обработка материала проведена с использованием пакета программ «Statistica 11.0» (*StatSoft*, USA, Windows 10). Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии значимых различий) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

За период наблюдения (14 дней) у 44 (78,6 %) пациентов наблюдалась положительная динамика общего состояния и регресс общемозговых симптомов. У 10 (17,8 %) пациентов состояние осталось неизменным, 2 (3,6 %) пациента умерли на 26-е и 31-е сутки от начала заболевания.

При анализе динамики неврологического статуса пациентов по шкале NIHSS выявлено, что неврологический дефицит в 1-е сутки ИИ варьировал от 6 до 13 баллов (в среднем $10,9 \pm 2,4$ балла). На 7-е сутки острого периода ИИ у 78,6 % пациентов выраженность неврологического дефицита была достоверно ниже, чем в 1-е сутки ($p < 0,05$) и составляла в среднем $7,9 \pm 2,9$ балла. На 14-е сутки отмечалась уменьшение среднего показателя неврологического дефицита до $5,3 \pm 3,3$ балла.

Объем повреждения вещества головного мозга, выявленный при МРТ в 1-е сутки от начала забо-

Таблица 1

**Динамика биомаркеров апоптоза в периферической крови пациентов
в остром периоде ишемического инсульта**

Table 1

**Dynamics of apoptosis biomarkers in the peripheral blood of patients
in the acute period of ischemic stroke**

Показатель	Исследуемые популяции лейкоцитов								
	I группа								
Биомаркеры апоптоза	гранулоциты			моноциты			лимфоциты		
	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
Аннексин V, % позитивных клеток	2,2	1,6	1,3	1,5	2,1	1,9	1,8	1,4	1,1
Каспаза-3, % позитивных клеток	0,08	0,09	0,07	0,09	0,06	0,08	0,06	0,04	0,05
II группа									
Биомаркеры апоптоза	гранулоциты			моноциты			лимфоциты		
	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
Аннексин V, % позитивных клеток	64,5***	26,8**	15,1**	38,9***	18,5**	10,1*	27,9**	10,9*	5,3*
Каспаза-3, % позитивных клеток	10,4**	5,3*	2,6*	8,9**	3,8*	2,1*	5,4*	2,2*	1,9*

Примечание: I группа – группа контроля (n=29); II группа (основная) – пациенты с острым ИИ (n=56); * – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны (p<0,05); ** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны (p<0,01); *** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны (p<0,001).

ления, варьировал от 10 до 315 см³ (в среднем (105,6±8,4) см³). За 14 дней исследования статистически значимых изменений размера очага повреждения не отмечалось.

Результаты оценки динамики биомаркеров апоптоза в остром периоде ИИ приведены в табл. 1.

Статистически достоверное повышение содержания аннексин V- и каспаза-3-«позитивных» клеток, по сравнению с группой контроля, отмечалось на протяжении всего исследования во всех популяциях лейкоцитов с максимальным повышением показателей в первые 24 ч от начала заболевания. Полученные результаты подтверждаются данными литературы об усилении спонтанного апоптоза клеток периферической крови у пациентов в остром периоде ИИ [3]. Самые высокие значения биомаркеров апоптоза выявлены в популяции гранулоцитов. Наблюдается отчетливая тенденция к снижению интенсивности апоптоза лейкоцитов к 14-м суткам, что, вероятно, свидетельствует о включении компенсаторных противоапоптотических механизмов и согласуется с результатами нашего предыдущего исследования, показавшего повышение концентрации белка ингибитора апоптоза Bcl-2 в сыворотке пациентов с острым ИИ с 11-го по 14-й день от начала заболевания [15]. Как известно, семейство Bcl-2 включает в себя как противоапоптотические белки Bcl-2 и Bcl-xL, так и проапоптотические белки Bax, Bim, Bik и Bak [9, 16]. Согласно данным литературы [4, 9], избыток

противоапоптотических белков семейства Bcl-2 защищает ткань мозга от ишемии.

Самые низкие показатели апоптоза выявлены в популяции лимфоцитов, что свидетельствует об их ускользании от апоптоза, приводящему к проникновению через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), где они принимают активное участие в иммуноопосредованной деструкции пораженного участка мозговой ткани. [17].

Выраженная прямая корреляционная связь между повышенным уровнем экспрессии аннексина V в общей популяции лейкоцитов и тяжестью неврологического дефицита по шкале NIHSS, а также объемом повреждения головного мозга выявлена в 1-е и 7-е сутки от начала заболевания (r = 0,73; p<0,01 и r = 0,68; p<0,05 соответственно).

Повышенный уровень экспрессии каспазы-3 положительно коррелировал с тяжестью неврологического дефицита (NIHSS>10) и объемом повреждения головного мозга (>50 см³) уже в 1-й день после дебюта ИИ (r = 0,71; p<0,05 и r = 0,75; p<0,01 соответственно) и в течение последующих 7 дней. Следует подчеркнуть, что максимальные значения экспрессии каспазы-3 (>20 %) были выявлены у 12 пациентов, 2 из которых умерли на 26-е и 31-е сутки от начала заболевания, а у 10 клинико-неврологический статус остался без изменения. У каждого из этих пациентов объем повреждения ткани мозга составлял >50 см³, и отмечались исходно высокие баллы неврологического дефицита.

Таблица 2

Сравнительная оценка динамики биомаркеров аутофагии в периферической крови пациентов в остром периоде ишемического инсульта в зависимости от объема поражения паренхимы головного мозга

Table 2

Comparative assessment of the dynamics of autophagy biomarkers in the peripheral blood of patients in the acute period of ischemic stroke, depending on the volume of damage to the brain parenchyma

Показатель	Исследуемые популяции лейкоцитов								
<i>Па группа</i>									
Биомаркеры аутофагии	гранулоциты			моноциты			лимфоциты		
LC3, % позитивных клеток	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
		2,9	9,6	1,5	1,8	13,1	2,3	1,8	10,6
p62, % позитивных клеток	6,4	3,1	2,3	1,6	2,5	1,1	2,1	4,5	3,3
Cyto-ID (СИФ)	4,1	14,4	3,1	2,9	15,9	1,8	5,3	13,9	2,1
<i>Пб группа</i>									
Биомаркеры аутофагии	гранулоциты			моноциты			лимфоциты		
LC3, % позитивных клеток	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
		6,5*	10,4	11,1**	4,9*	9,5	8,9*	8,9**	10,9
p62, % позитивных клеток	8,4	2,3	2,5	9,1**	2,8	2,1*	4,4*	2,2*	1,9
Cyto-ID (СИФ)	10,3*	12,5	12,1**	7,8*	11,5	10,9**	10,1	8,9	9,6**

Примечание: СИФ – средняя интенсивность флюоресценции (приведены медианные значения); Па группа – пациенты с острым ИИ с объемом поражения вещества головного мозга менее 50 см³ и (n = 35); Пб группа – пациенты с острым ИИ с объемом поражения вещества головного мозга более 50 см³ (n = 21); LC3 – показатель активации аутофагии; p62 – показатель ингибирования аутофагии; Cyto-ID – краситель, встраивающийся в активные аутофагосомы при активации аутофагии; * – различия по изучаемому показателю с группой сравнения статистически достоверны (p < 0,05); ** – различия по изучаемому показателю с группой сравнения статистически достоверны (p < 0,01).

Результаты оценки динамики биомаркеров аутофагии приведены в табл. 2.

При анализе экспрессии биомаркеров аутофагии была выявлена сильная прямая корреляционная зависимость между повышенными значениями LC3, интенсивностью флюоресценции Cyto-ID и объемом повреждения головного мозга на 7-е сутки исследования (r = 0,78; p < 0,01 и r = 0,83; p < 0,01 соответственно). В связи с тем, что в периферической крови здоровых лиц экспрессия биомаркеров аутофагии не определяется, основная группа пациентов была разделена на две подгруппы (Па и Пб): с объемом поражения паренхимы головного мозга менее 50 см³ и более 50 см³ соответственно (табл. 2).

Как видно из данных табл. 2, у пациентов Пб группы отмечалось статистически значимое достоверное повышение экспрессии белка LC3 и средней интенсивности флюоресценции красителя Cyto-ID, по сравнению со Па группой, в 1-е и 14-е сутки во всех исследуемых популяциях лейкоцитов на протяжении всего исследования. При этом во всех популяциях лейкоцитов выявлены высокие значения белка p62 в 1-е сутки с последующим снижением.

Белок LC3, являющийся убиквитин-подобным белком, представляет собой надежный маркер аутофагии, так как его содержание в исследуемом

биологическом материале положительно коррелирует с количеством активных аутофагосом – важнейших компонентов процесса аутофагии [5, 6]. Интенсивность флюоресценции красителя Cyto-ID также отражает интенсивность аутофагии [18].

В отличие от этих показателей, содержание p62 в исследуемом биологическом материале обратно коррелирует с интенсивностью аутофагии [13, 18].

В группе Пб высокий уровень аутофагии сохранялся на протяжении всего исследования и положительно коррелировал с объемом повреждения паренхимы мозга.

В группе Па максимальные значения биомаркеров аутофагии наблюдались на 7-е сутки и снижались к 14-му дню во всех популяциях лейкоцитов. Полученные результаты согласуются с данными литературы [19] о повышении концентрации аутофагических белков LC3 и Beclin-1 в сыворотке и спинномозговой жидкости (СМЖ) у пациентов в остром периоде ИИ, а также с данными нашего предыдущего исследования [15], показавшего нарастание уровня этих биомаркеров в сыворотке пациентов с 1-го по 7-й день от начала заболевания с последующим их снижением.

Таким образом, исследованием установлено, что у пациентов в остром периоде ИИ выявляется

усиление активации апоптоза и аутофагии клеток периферической крови, о чем свидетельствует статистически значимое, по сравнению с группой контроля, повышение экспрессии ключевых биомаркеров апоптоза и аутофагии в общей популяции лейкоцитов. Полученные результаты подтверждаются данными литературы об усилении спонтанного апоптоза мононуклеаров периферической крови [3] и повышении ключевых биомаркеров аутофагии LC3 и Beclin-1 в сыворотке крови и СМЖ [19] пациентов в остром периоде ИИ.

Представленные нами результаты могут быть объяснены тем, что в ответ на острую ишемию развиваются иммунный ответ, нейровоспаление и каскад патохимических реакций (в том числе апоптоз и аутофагия) как в очаге поражения, так и системно [3]. Показано, что в остром периоде ИИ наблюдается дисбаланс цитокинового статуса с дефицитом противовоспалительных цитокинов и повышением триады провоспалительных цитокинов — TNF α (фактор некроза опухоли- α), IL-1 β (интерлейкин-1 β) и IL-6 (интерлейкин-6), которые продуцируются как клетками микроглии, так и иммунокомпетентными клетками периферической крови, о чем свидетельствует повышение концентрации этих цитокинов в сыворотке больных в остром периоде ИИ [20, 21]. Известно, что TNF α является плейотропным цитокином, который играет ключевую роль во многих физиологических и патологических клеточных процессах, включая роль индуктора активационного апоптоза и аутофагии [3, 22].

Апоптоз и аутофагия являются сложными многоуровневыми процессами, в регуляции которых принимают участие многие факторы, в том числе содержащиеся в периферической крови [3, 4, 18, 23]. Таким образом, сигнал на активацию апоптоза и аутофагии клетки периферической крови могут получать от целого ряда медиаторов иммунного ответа и нейровоспаления, усиление продукции которых в ответ на ишемическое повреждение происходит не только в очаге поражения, но и в периферической крови. Согласно данным литературы [3, 23], медиаторами, индуцирующими активацию апоптоза клеток периферической крови, являются TNF α , IL-1 β , sFasL (растворимая форма Fas-лиганда — soluble Fas ligand), белки теплового шока-70 (HSP-70 — Heat shock proteins). Показано, что в крови пациентов с атеротромботическим вариантом острого ИИ регистрируется статистически значимое повышение этих показателей [3, 20, 21].

В последние годы представлены многочисленные доказательства участия аутофагии в регуляции продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-17, IL-18, IL-23) и хемокинов (CXCL1) [18, 20]. Показано, что взаимодействие между аутофагией и воспалением осуществляется по принципу обратной связи. В частности, TNF- α и IL-6 стимулируют активацию аутофагии так же, как и аутофагия

способствует секреции этих провоспалительных цитокинов [18, 23]. Выявлена прямая взаимосвязь между повышенными концентрациями цитокинов TNF- α , IL-6 и высоким уровнем биомаркеров аутофагии лейкоцитов периферической крови у больных ревматоидным артритом [18]. Таким образом, полученные нами результаты об активации аутофагии лейкоцитов периферической крови могут объясняться данными литературы о повышении концентрации индукторов активационной аутофагии TNF- α , IL-1 β и IL-6 в крови пациентов в остром периоде ИИ [3, 20, 21].

В результате проведенного исследования были выявлены прямые корреляционные связи между повышенными уровнями биомаркеров апоптоза, аутофагии в клетках периферической крови и показателями неврологического статуса (выраженностью неврологического дефицита и объемом поражения головного мозга) в 1-е, 7-е и 14-е сутки от начала острого ИИ. В совокупности с данными литературы полученные результаты позволяют высказать предположение, что активность апоптоза и аутофагии клеток периферической крови отражает активность этих процессов в очаге поражения на разных стадиях острого периода ИИ. Для подтверждения этой гипотезы требуются дальнейшие исследования в этом направлении.

ВЫВОДЫ

1. В остром периоде ИИ выявлено статистически значимое, по сравнению с группой контроля, повышение экспрессии ключевых биомаркеров апоптоза и аутофагии. Повышенные уровни экспрессии аннексина V и каспазы-3 положительно коррелируют с тяжестью неврологического дефицита по шкале NIHSS и объемом повреждения головного мозга в 1-е и 7-е сутки от начала заболевания.

2. Выявлена сильная прямая корреляционная связь между ключевыми биомаркерами аутофагии (LC3 и Cyto-ID), объемом повреждения головного мозга и тяжестью неврологического дефицита на 7-е сутки острого периода ИИ ($r=0,78$; $p<0,01$ и $r=0,83$; $p<0,01$ соответственно).

3. У пациентов в остром периоде ИИ с объемом поражения паренхимы головного мозга более 50 см³ отмечается статистически значимое повышение биомаркеров апоптоза и аутофагии на протяжении всего периода исследования, свидетельствующее об усилении активационного апоптоза и активационной аутофагии клеток периферической крови при обширном очаге поражения мозговой ткани. Апоптоз и аутофагия являются сложными многоуровневыми процессами, в регуляции которых принимают участие многие факторы, в том числе содержащиеся в периферической крови [3, 18, 23]. Учитывая полученные нами результаты, а также данные литературы о повышении концентрации сывороточных биомаркеров апоптоза [4]

и аутофагии [19] в остром периоде ИИ, можно предположить, что активность апоптоза и аутофагии клеток периферической крови отражает активность этих процессов в очаге поражения у пациентов в остром периоде ИИ.

Благодарности

Авторы выражают благодарность заведующему кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова Андрею Михайловичу Иванову и сотрудникам кафедры за предоставление базы для проведения исследований.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Head of the Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics of the Military Medical Academy named after S. M. Kirov Andrei Mikhailovich Ivanov and staff of the department for providing a base for research.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest

Соответствие нормам этики

Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо, и правила обращения с животными в случаях их использования в работе. Подробная информация содержится в Правилах для авторов.

Compliance with ethical principles

The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary, and the rules of treatment of animals when they are used in the study. Author Guidelines contains the detailed information.

ЛИТЕРАТУРА

1. Becker K. Autoimmune Responses to Brain Following Stroke // *Translational Stroke research*. – 2012. – Vol. 3, № 3. – P. 310–317. Doi: 10.1007/s12975-012-0154-0.
2. Lopes-Pinheiro M. A., Kooij G., Mizee M. R. et al. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2016. – Vol. 1862, № 3. – P. 461–467. Doi: 10.1016/j.bbadis.2015.10.018.
3. Константинова Е. В., Кочетов А. Г., Шостак Н. А. и др. Особенности иммунного ответа и воспалительной реакции при атеротромботическом инсульте и инфаркте миокарда // *Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. – 2015. – Т. 115, № 12. С. 48–53. Doi: 10.17116/jnevro201511512248-53.
4. Ключник Т. П., Отман И. Н., Чуканова А. С. и др. Динамика маркеров апоптоза в остром периоде ишемического инсульта // *Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. – 2018. – Т. 118, № 9. – С. 26–31. Doi: 10.17116/jnevro201811809226.
5. The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia // Y. C. Tang, H. X. Tian, T. Yi, H. B. Chen // *Protein Cell*. – 2016. – Vol. 7, № 10. – P. 699–713. Doi: 10.1007/s13238-016-0307-0.
6. Gabryel B., Kost A., Kasprowska D. Neuronal autophagy in cerebral ischemia – a potential target for neuroprotective

strategies? // *Pharmacological Reports*. – 2013. – Vol. 64, № 1. – P. 1–15. Doi: 10.1016/S1734-1140(12)70725-9.

7. Gong Z., Pan J., Shen Q. et al. Mitochondrial dysfunction induces NLRP3 inflammasome activation during cerebral ischemia/reperfusion injury // *Journal of Neuroinflammation*. – 2018. – Vol. 15, № 242. – P. 1–17. Doi: 10.1186/s12974-018-1282-6.

8. Gao B., Zhang X., Han R. et al. The endoplasmic reticulum stress inhibitor salubrinal inhibits the activation of autophagy and neuroprotection induced by brain ischemic preconditioning // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2013. – Vol. 34, № 5. – P. 657–666. Doi: 10.1038/aps.2013.34.

9. Guan R., Zou W., Dai X. et al. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke // *Journal of Biomedical Science*. – 2018. – Vol. 25, № 87. – P. 1–16. Doi: 10.1186/s12929-018-0487-4.

10. Revolution in acute ischemic stroke care: a practical guide to mechanical thrombectomy / R. B. Matthew, P. White, P. Cowley, D. J. Werring // *Practical neurology*. – 2017. – Vol. 17, № 4. – P. 252–265. Doi: 10.1136/practneurol-2017-001685.

11. Modulating autophagy in mesenchymal stem cells effectively protects against hypoxia- or ischemia-induced injury / C. Hu, L. Zhao, D. Wu, L. Li // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 1–13. Doi: 10.1186/s13287-019-1225-x.

12. Клеточная терапия при ишемическом инсульте / В. Н. Александров, Т. А. Камилова, Б. В. Мартынов, Л. И. Калюжная // *Вестн. Рос. Военно-мед. акад.* – 2013. – Т. 3, № 3. – С. 199–205.

13. Jungverdorben J., Till A., Brüstle O. Induced pluripotent stem cell-based modeling of neurodegenerative diseases: a focus on autophagy // *Journal of Molecular Medicine*. – 2017. – Vol. 95, № 7. – P. 705–718. Doi: 10.1007/s00109-017-1533-5.

14. Steliga A., Kowiański P., Czuba E. et al. Neurovascular Unit as a Source of Ischemic Stroke Biomarkers—Limitations of Experimental Studies and Perspectives for Clinical Application // *Translational Stroke Research*. – 2020. – Vol. 11. – P. 553–579. Doi: 10.1007/s12975-019-00744-5.

15. Apoptosis and autophagy, as inherent components of autoimmunity in the acute period of ischemic stroke / A. V. Lugovaya, N. M. Kalinina, E. R. Barancevich, A. V. Artemova // *Вестн. Санкт-Петербург. ун-та: Медицина*. – 2019. – Т. 14, № 4. – С. 295–298. Doi: 10.21638/spbu11.2019.409.

16. Zhang W., Meng A. MicroRNA-124 expression in the brains of rats during early cerebral ischemia and reperfusion injury is associated with cell apoptosis involving STAT3 // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2019. – Vol. 17, № 4. – P. 2870–2876. Doi: 10.3892/etm.2019.7220.

17. Jin W. N., Gonzales R., Feng Y. et al. Brain Ischemia Induces Diversified Neuroantigen-Specific T-Cell Responses That Exacerbate Brain Injury // *Stroke*. – 2018. – Vol. 49, № 6. – P. 1471–1478. Doi: 10.1161/STROKEAHA.118.020203.

18. Chen Y., Chang C., Chen H. et al. Association between autophagy and inflammation in patients with rheumatoid arthritis receiving biologic therapy // *Arthritis Research & Therapy*. – 2018. – Vol. 20, № 268. – P. 1–11. Doi: 10.1186/s13075-018-1763-0.

19. Li H., Qiu S., Li X. et al. Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients // *Journal of Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 13, № 359. – P. 1–8. Doi: 10.1186/s12967-015-0726-3.

20. Баранова Е. В. Маркеры воспаления у больных с различными типами мозговых инсультов // *Международ. невролог. журн.* – 2014. – Т. 5, № 67. – С. 45–48.

21. Кулеи А. А., Дробаха В. Е., Некрасова И. В. и др. Нейровоспалительные, нейродегенеративные и структурные церебральные маркеры основных клинических вариантов постинсультных когнитивных нарушений в остром периоде ишемического инсульта // *Вестн. РАМН.* – 2016. – Т. 71, № 4. – С. 304–312.

22. Баринов Э. Ф., Евтушенко С. К., Максименко Т. Л. и др. Механизмы регуляции воспаления в ишемизированном мозге (научный обзор) // *Международ. невролог. журн.* – 2013. – Т. 8, № 62. – С. 13–21.

23. Tsygan N. V., Trashkov A. P., Litvinenko I. V. et al. Autoimmunity in acute ischemic stroke and the role of blood-brain barrier: the dark side or the light one? // *Frontiers of Medicine.* – 2019. – Vol. 13, № 4. – P. 420–426. Doi: 10.1007/s11684-019-0688-6.

REFERENCES

1. Becker K. Autoimmune Responses to Brain Following Stroke // *Translational Stroke research.* 2012;3(3):310–317. Doi: 10.1007/s12975-012-0154-0.

2. Lopes-Pinheiro M. A., Kooij G., Mizze M. R., Kamermans A., Enzmann G., Lyck R. et al. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2016;1862(3):461–467. Doi: 10.1016/j.bbdis.2015.10.018.

3. Konstantinova E. V., Kochetov A. G., Shostak N. A., Shurdumova M. Kh., Eremin I. I., Lyang O. V., Skvortsova V. I. Characteristics of immune response and inflammatory reaction in atherothrombotic stroke and myocardial infarction // *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S. S. Korsakova.* 2015;115(12):48–53. (In Russ.). Doi: 10.17116/jnevro201511512248-53.

4. Klushnik. T. P., Otman I. N., Chukanova A. S., Nadareishvili G. G., Guliyeva M. S., Gusev E. I. The dynamics of markers of apoptosis in the acute period of ischemic stroke // *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S. S. Korsakova.* 2018;118(9):26–31. (In Russ.). Doi: 10.17116/jnevro201811809226.

5. Tang Y. C., Tian H. X., Yi T., Chen H. B. The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia // *Protein Cell.* 2016; 7(10):699–713. Doi: 10.1007/s13238-016-0307-0.

6. Gabryel B., Kost A., Kasprowska D. Neuronal autophagy in cerebral ischemia – a potential target for neuroprotective strategies? // *Pharmacological Reports.* 2013;64(1):1–15. Doi: 10.1016/S1734-1140(12)0725-9.

7. Gong Z., Pan J., Shen Q., Li M. and Peng Y. Mitochondrial dysfunction induces NLRP3 inflammasome activation during cerebral ischemia/reperfusion injury // *Journal of Neuroinflammation.* 2018;15(242):1–17. Doi:10.1186/s12974-018-1282-6.

8. Gao B., Zhang X., Han R., Zhang T., Chen C., Qin Z. et al. The endoplasmic reticulum stress inhibitor salubrinal inhibits the activation of autophagy and neuroprotection induced by brain ischemic preconditioning // *Acta Pharmacologica Sinica.* 2013;34(5):657–666. Doi: 10.1038/aps.2013.34.

9. Guan R., Zou W., Dai X., Yu X., Liu H., Chen O. et al. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke // *Journal of Biomedical Science.* 2018;25(87):1–16. Doi: 10.1186/s12929-018-0487-4.

10. Matthew R. B., White P., Cowley P., Werring D. J. Revolution in acute ischemic stroke care: a practical

guide to mechanical thrombectomy // *Practical neurology.* 2017;17(4):252–265. Doi: 10.1136/practneurol-2017-001685.

11. Hu C., Zhao L., Wu D., Li L. Modulating autophagy in mesenchymal stem cells effectively protects against hypoxia- or ischemia-induced injury // *Stem Cell Research & Therapy.* 2019;10(1):1–13. Doi: 10.1186/s13287-019-1225-x.

12. Alexandrov V. N., Kamilova T. A., Martynov B. V., Kalyuzhnaya L. I. Cell therapy in ischemic stroke // *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii.* 2013; 3(43):199–205. (In Russ.).

13. Jungverdorben J., Till A., Brüstle O. Induced pluripotent stem cell-based modeling of neurodegenerative diseases: a focus on autophagy // *Journal of Molecular Medicine.* 2017; 95(7):705–718. Doi: 10.1007/s00109-017-1533-5.

14. Steliga A., Kowiański P., Czuba E., Waśkow M., Moryś J., Lietzau G. Neurovascular Unit as a Source of Ischemic Stroke Biomarkers—Limitations of Experimental Studies and Perspectives for Clinical Application // *Translational Stroke Research.* 2020;(11):553–579. Doi: 10.1007/s12975-019-00744-5.

15. Lugovaya A. V., Kalinina N. M., Barancevich E. R., Artemova A. V. Apoptosis and autophagy, as inherent components of autoimmunity in the acute period of ischemic stroke // *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Medicina.* 2019;14(4):295–298. (In Russ.). Doi: 10.21638/spbu11.2019.409.

16. Jin W. N., Gonzales R., Feng Y., Wood K., Chai Z., Dong J. F. et al. Brain Ischemia Induces Diversified Neuroantigen-Specific T-Cell Responses That Exacerbate Brain Injury // *Stroke.* 2018;49(6):1471–1478. Doi: 10.1161/STROKEAHA.118.020203.

17. Zhang W., Meng A. MicroRNA-124 expression in the brains of rats during early cerebral ischemia and reperfusion injury is associated with cell apoptosis involving STAT3 // *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2019;17(4):2870–2876. Doi: 10.3892/etm.2019.7220.

18. Chen Y., Chang C., Chen H., Hsieh C. W., Tang K. T., Yang M. C., Lan J. L., Chen D. Y. Association between autophagy and inflammation in patients with rheumatoid arthritis receiving biologic therapy // *Arthritis Research & Therapy.* 2018;20(268):1–11. Doi: 10.1186/s13075-018-1763-0.

19. Li H., Qiu S., Li X., Li M., Peng Y. Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients // *Journal of Translational Medicine.* 2015;13(359):1–8. Doi: 10.1186/s12967-015-0726-3.

20. Baranova Ye. V. Markers of inflammation in patients with different types of cerebral strokes. *Mezhdunarodnyy nevrologicheskiy zhurnal.* 2014;5(67):45–48. (In Russ.).

21. Kulesh A. A., Drobakha V. E., Nekrasova I. V., Kukulina E. M., Shestakov V. V. Neuroinflammatory, Neurodegenerative and Structural Brain Biomarkers of the Main Types of Post-Stroke Cognitive Impairment in Acute Period of Ischemic Stroke // *Vestnik RAMN.* 2016;71(4):304–312. (In Russ.).

22. Barinov E. F., Yevtushenko S. K., Maksimenko T. L., Barinova M. E., Tverdokhleba T. A., Yevtushenko I. S. Mechanisms of regulation of inflammation in the ischemic brain (scientific review) // *Mezhdunarodnyy nevrologicheskiy zhurnal.* 2013;8(62):13–21. (In Russ.).

23. Tsygan N. V., Trashkov A. P., Litvinenko I. V., Yakovleva V. A., Ryabtsev A. V., Andrey G. et al. Autoimmunity in acute ischemic stroke and the role of blood-brain barrier: the dark side or the light one? // *Frontiers of Medicine.* 2019;13(4):420–426. Doi: 10.1007/s11684-019-0688-6.

Информация об авторах

Луговая Анна Владимировна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, врач клинической лабораторной диагностики отделения лабораторной диагностики клиники, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-7690-9064; **Эмануэль Юлия Владимировна**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры неврологии и мануальной медицины Факультета последипломного образования, врач-невролог клиники, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0001-5649-6090; **Артемова Анастасия Витальевна**, ассистент кафедры неврологии и мануальной медицины Факультета последипломного образования, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-1793-3240; **Семенова Екатерина Валерьевна**, клинический ординатор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-1086-3304; **Семенова Варвара Владимировна**, клинический ординатор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-4465-3778.

Information about authors

Lugovaya Anna V., Cand. of Sci. (Med.), Assistant of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course in Molecular Medicine, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Clinic of the Department of Laboratory Diagnostics, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-7690-9064; **Emanuel Yuliya V.**, Cand. of Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Neurology and Manual Medicine, Faculty of Postgraduate Education, Neurologist of the Clinic of the Neurological Department, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0001-5649-6090; **Artemova Anastasia V.**, Assistant of the Department of Neurology and Manual Medicine, Faculty of Postgraduate Education, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-1793-3240; **Semenova V. Ekaterina**, Clinical Resident of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course of Molecular Medicine, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-1086-3304; **Semenova V. Varvara**, Clinical Resident of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course of Molecular Medicine, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-4465-3778.