

*На правах рукописи*



МОРОЗОВ Сергей Александрович

**ЛИМФОИДНЫЕ И МИЕЛОИДНЫЕ КЛЕТКИ С  
ИММУНОРЕГУЛЯТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ У ПАЦИЕНТОВ В ОСТРОМ  
ПЕРИОДЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ).

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор  
член-корреспондент РАН

**Черных Елена Рэмовна**

**Официальные оппоненты:**

**Повещенко Ольга Владимировна**, доктор медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией клеточных технологий «Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии», филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук»

**Салмина Алла Борисовна**, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией экспериментальной нейрцитологии отдела исследований мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии»

**Ведущее учреждение:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «   » \_\_\_\_\_ 2021 года в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 по адресу: 630099, г.  
Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте  
<http://niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Облеухова Ирина Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы.

Ишемический инсульт (ИИ) остается важнейшей медико-социальной проблемой в силу высоких показателей заболеваемости, смертности и инвалидизации [Гусев Е.И., 2001; WSO, 2015]. Ограниченные терапевтические возможности при инсульте связывают с недостаточным пониманием патогенеза данного заболевания. До недавнего времени инсульт считался исключительно сосудистой патологией. Однако многочисленные клинические и экспериментальные данные о причастности иммунных клеток и их медиаторов к повреждению и репарации нервной ткани поставили под сомнение эту догму [Rayasam et al., 2018]. В настоящее время ключевая роль в патогенезе ИИ отводится иммунным реакциям в ответ на ишемическое повреждение нервной ткани [Jin R, Yang G et al., 2010; Iadecola C. et al., 2020].

Поврежденные в условиях ишемии клетки мозга высвобождают молекулы опасности (DAMPs) и мозгоспецифические антигены, которые активируют клетки врожденного и приобретенного иммунитета [Cieslak M. et al., 2013; Ziegler-Heitbrock et al., 2010; Urra X. et al., 2009], индуцируя воспалительный ответ и адаптивные иммунные реакции на локальном и системном уровне. Одновременно, ишемическое повреждение через гипоталамо-гипофизарную ось запускает нейрогуморальный ответ и, как следствие, выброс в циркуляцию глюкокортикоидов и катехоламинов. Поэтому в отличие от локального воспаления, системный воспалительный ответ быстро сменяется иммуносупрессией [Iadecola C. et al., 2020].

Иммунный ответ играет двойственную роль. Контролируемые реакции врожденного иммунитета направлены на ограничение повреждения, защиту от патогенов, активацию процессов репарации и запуск механизмов feed-back регуляции воспалительного ответа через активацию симпатoadреналовой системы [Schwartz M., London A., et al., 2009]. Избыточный воспалительный ответ, напротив, приводит к дополнительному повреждению нервной ткани и является причиной глубокой иммуносупрессии, приводящей к инфекционным осложнениям [Qin X. et al., 2020]. Кроме того, персистенция адаптивных иммунных реакций чревата развитием атрофии коры головного мозга и деменции [Leys D. et al., 2005]. Соответственно, клетки иммунной системы, регулирующие выраженность воспаления, могут являться новыми прогностическими биомаркерами и мишенями терапевтических воздействий. Учитывая, что первые 24-48 часов, соответствующие запуску врожденного иммунитета, являются наиболее критичным периодом ИИ, изучение лимфоидных и миелоидных клеток с иммунорегуляторной активностью в остром периоде инсульта, а также исследование их взаимосвязи с тяжестью, характером течения и исходом инсульта представляется несомненно актуальным.

Большой интерес в этом плане представляют субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, среди которых Т-хелперы 1 типа (Th1) стимулируют, а Т-регуляторные клетки (Treg) подавляют провоспалительный фенотип макрофагов и микроглии [Heusinkveld M. et al., 2011; Okeke E.V. et al., 2019]. Важное значение в регуляции воспалительного ответа придается также субпопуляциям миелоидных супрессорных клеток (МС) и моноцитов. Системный воспалительный ответ сопровождается мобилизацией в кровотоки незрелых костномозговых миелоидных клеток, которые способны приобретать иммуносупрессорный фенотип [Veglia F. et al., 2018]. Субпопуляции циркулирующих

моноцитов за счет продукции активных метаболитов кислорода и провоспалительных цитокинов могут обладать провоспалительной и нейродеструктивной активностью (Sampath P. et al., 2016). С другой стороны, классические моноциты, благодаря экспрессии CCR2, способны мигрировать в ткани мозга и поляризоваться в макрофаги M2 фенотипа с противовоспалительной и нейрорегенеративной активностью [Franca C.N. et al., 2017; Zhang J.H. et al. 2012].

Несмотря на важную потенциальную роль лимфоидных и миелоидных иммунорегуляторных клеток в патогенезе ИИ, интерпретация роли Treg в остром периоде инсульта остается неоднозначной, а сведения о содержании Th1 и MС при ИИ практически отсутствуют. Исследования моноцитов ограничены несколькими противоречивыми публикациями, согласно которым повышенное содержание промежуточных моноцитов может ассоциироваться как с более благоприятным неврологическим восстановлением [Urra X. et al., 2010], так и прогрессированием зоны инфаркта [Kaito M. et al., 2013]. Вышеизложенное определило цель и задачи настоящего исследования.

**Цель работы:** оценить патогенетическую и прогностическую значимость лимфоидных и миелоидных клеток с иммунорегуляторной активностью в остром периоде ишемического поражения головного мозга.

**Задачи:**

1. Оценить параметры, характеризующие системную воспалительную реакцию в остром периоде ИИ, в том числе у больных с различной тяжестью, течением и исходами заболевания.

2. Исследовать в остром периоде ИИ количественное содержание субпопуляций CD4+Т-клеток (CD4+CD25<sup>hi</sup>; CD4+IFN $\gamma$ +), моноцитов (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, CD14+CD16<sup>++</sup>) и миелоидных супрессорных клеток (Lin-HLA-DR-CD33<sup>+</sup>; Lin-HLA-DR-CD33+CD66<sup>+</sup>; HLA-DR-CD14<sup>+</sup>) и их взаимосвязь с тяжестью инсульта и выраженностью системной воспалительной реакции.

3. Изучить взаимосвязь лимфоидных и миелоидных иммунорегуляторных клеток (субпопуляций CD4+Т-клеток, моноцитов и миелоидных супрессорных клеток) с развитием ранних инфекционных осложнений.

4. Исследовать взаимосвязь субпопуляций CD4+Т-клеток, моноцитов и миелоидных супрессорных клеток с эффективностью функционального восстановления через 3 месяца после инсульта.

5. Оценить прогностическую значимость исследуемых субпопуляций клеток в качестве ранних предикторов инфекционных осложнений и неблагоприятного 3-х месячного исхода ИИ.

**Научная новизна**

В работе впервые охарактеризовано количественное содержание лимфоидных и миелоидных клеток с иммунорегуляторной активностью в первые 24-48 часов постинсультного периода у пациентов с ишемическим поражением головного мозга. Показано, что развитие системной воспалительной реакции, проявляющейся возрастанием абсолютного количества лейкоцитов, нейтрофильно-лимфоцитарного индекса (НЛИ) и концентрации С-реактивного белка (СРБ), в остром периоде ИИ ассоциировано с достоверным возрастанием клеток с фенотипом Treg (CD4+CD25<sup>hi</sup>) и снижением Th1 (CD4+IFN $\gamma$ +); уменьшением доли классических (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) и увеличением промежуточных/альтернативных (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>/CD14+CD16<sup>++</sup>)

моноцитов, а также увеличением ранних, P-МС (Lin–HLA-DR–CD33+), моноцитарных, M-МС (CD14+HLA-DR–) и гранулоцитарных, Г-МС (Lin–HLA-DR–CD33+CD66+). При этом доля CD4+IFN $\gamma$ + и CD16+ моноцитов находится в прямой-, а содержание CD4+CD25<sup>hi</sup>, CD14++CD16- и Lin–CD33+ клеток в обратной корреляционной связи с показателями системного воспаления. Получены новые данные о взаимосвязи исследуемых субпопуляций иммунных клеток с развитием инфекционных осложнений. Установлено, что повышенное количество CD4+CD25<sup>hi</sup> и пониженное содержание CD4+IFN $\gamma$ + более чем 2-кратно снижает риск развития инфекционных осложнений у больных со средне-тяжелым и тяжелым ИИ. Также впервые продемонстрирована позитивная взаимосвязь иммуносупрессорных субпопуляций лимфоидных и миелоидных клеток с благоприятным исходом ИИ. В частности, выявлена прямая корреляционная взаимосвязь CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, М-МС (CD14+HLA-DR–) и ГМ-МС (Lin–HLA-DR–CD33+CD66+) с эффективностью функционального восстановления через 3 месяца после ИИ. Кроме того, установлено, что пациенты с благоприятным 3-месячным исходом отличаются в остром периоде от оппозитной группы более высоким содержанием CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, более низким количеством CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток, 4-х кратно меньшим индексом CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25<sup>hi</sup> и более высоким содержанием М-МС (CD14+HLA-DR–).

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Выявленные изменения в содержании лимфоидных и миелоидных клеток с иммунорегуляторной активностью и корреляционные связи исследуемых субпопуляций с уровнем СРБ и НЛИ расширяют представления об иммунопатогенезе ИИ, свидетельствуя о взаимосвязи лимфоидных и миелоидных клеток с выраженностью воспалительного ответа в остром периоде ИИ. Наличие обратной корреляционной взаимосвязи между Treg и Th1 в совокупности с данными о более высоком содержании Treg и низком уровне Th1 в группах пациентов с отсутствием инфекционных осложнений (в сравнении с оппозитной группой) свидетельствует о позитивной роли возрастания Treg в первые 24-48 часов постинсультного периода и их непричастности к развитию инфекционных осложнений. Выявленная прямая сопряженность CD4+CD25<sup>hi</sup>, CD14+HLA-DR– и Lin–HLA-DR–CD33+CD66+ клеток с эффективностью 3-х месячного восстановления, а также данные о более высоком содержании указанных субпопуляций в группе пациентов с благоприятным исходом свидетельствуют о прямой взаимосвязи функционального восстановления с количеством лимфоидных и миелоидных иммуносупрессорных субпопуляций. При этом наличие обратной корреляционной связи Treg с уровнем СРБ при отсутствии таковой для моноцитарных МС свидетельствует о различных механизмах протективного действия указанных субпопуляций.

Практическая значимость работы заключается в оценке прогностической значимости исследуемых субпопуляций в качестве иммунных предикторов течения и исхода ИИ. Установлено, что индекс CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25<sup>hi</sup>, а также относительное содержание CD14+HLA-DR– миелоидных супрессоров в периферической крови пациентов в остром периоде ИИ являются биомаркерами течения и исхода ИИ. На основании оценки этих параметров разработаны прогностические модели, позволяющие оценивать риск развития ранних инфекционных осложнений и

неблагоприятного 3-х месячного исхода. При этом показано, что комбинация данных биомаркеров с баллом NIHSS улучшает качество прогноза.

### **Методология и методы исследования**

В работе использован дизайн проспективного когортного обсервационного исследования, в которое был включен 61 пациент с ИИ. При поступлении (в течение первых 24-48 часов) у пациентов оценивали выраженность системной воспалительной реакции и содержание лимфоидных и миелоидных клеток с иммунорегуляторной активностью. Далее в процессе проспективного наблюдения у всех пациентов оценивалось развитие ранних (в течение 28 дней) инфекционных осложнений и исход через 3 месяца. Для исследования взаимосвязи отдельных субпопуляций с выраженностью системной воспалительной реакции, развитием инфекционных осложнений и исходом использовался корреляционный анализ и оценка относительного риска; для оценки прогностической значимости – ROC анализ.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Острый период ИИ характеризуется достоверными изменениями в содержании субпопуляций лимфоидных (возрастание CD4+CD25<sup>hi</sup> и снижение CD4+IFN $\gamma$ + T-клеток) и миелоидных клеток (уменьшение CD14+CD16<sup>-</sup> и увеличение CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> и CD14+CD16<sup>++</sup> моноцитов, а также возрастание Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33+CD66<sup>-</sup>, CD14+HLA-DR<sup>-</sup> и Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33+CD66<sup>+</sup> миелоидных супрессоров), уровни которых коррелируют с выраженностью системной воспалительной реакции.

2. Содержание T-клеток с фенотипом Treg, Th1 и моноцитарных миелоидных супрессоров в остром периоде ИИ взаимосвязано с риском развития инфекционных осложнений) и характером исхода.

3. Индекс соотношения CD4+CD25<sup>hi</sup>/CD4+IFN $\gamma$ +, а также относительное содержание CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> миелоидных супрессорных клеток в первые 24-48 часов после ИИ характеризуются прогностической значимостью в качестве предикторов развития ранних инфекционных осложнений и неблагоприятного 3-х месячного исхода.

### **Степень достоверности, апробация результатов и личное участие автора**

Достоверность полученных результатов подтверждается логично выстроенным алгоритмом работы, достаточной выборкой исследования, использованием современных иммунологических методов и адекватных методов статистической обработки. Основные положения работы доложены и обсуждены на международных и российских конгрессах. Автор участвовал в разработке дизайна исследования, критериев включения и исключения, формировании и заполнении регистрационных карт, анализе медицинской документации. Результаты иммунологических исследований, представленные в работе, получены при непосредственном участии автора на базе лаборатории клеточной иммунотерапии и лаборатории клинической иммунологии НИИФКИ. Автором лично проведена статистическая обработка результатов и интерпретация экспериментальных данных.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, включая 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ, и 1 тезисы в зарубежном журнале (WoS, Q2).

## **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, пяти глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 123 страницах машинописного текста, включающего 34 таблицы и 6 рисунков. Работа выполнена на базе лаборатории клеточной иммунотерапии и иммунологической лаборатории клиники иммунопатологии НИИФКИ, а также 2-го неврологического отделения ГБУЗ НСО «ГКБ №1»

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В исследование включались пациенты, поступавшие на лечение во 2-ое неврологическое отделение ГБУЗ НСО «ГКБ №1» с диагнозом острого нарушения мозгового кровообращения. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИФКИ (№ 127). Основными критериями включения являлись: возраст от 40 до 80 лет; впервые возникший ишемический инсульт в бассейне средней мозговой артерии; госпитализация не позже 48 часов от начала заболевания, тяжесть инсульта  $\geq 5$  баллов по шкале NIHSS и наличие письменного информированного согласия. Клинический диагноз с определением подтипа ишемического инсульта по критериям TOAST основывался на данных анамнеза, клиническом и инструментальном исследовании, данных нейровизуализации (КТ головного мозга и дуплексное УЗИ брахиоцефальных артерий и сердца).

Степень тяжести неврологического дефицита определяли по шкале NIHSS (шкала инсульта национальных институтов здоровья США, Brott T., Adams H.P., 1989). Развитие ранних инфекций (в течение 28 дней) диагностировали по модифицированным критериям американских центров по контролю и профилактики заболеваний (CDC). Функциональный исход оценивали по модифицированной 6-бальной шкале Рэнкина (mRS). Пациенты с уровнем 3-х и менее баллов (умеренная инвалидизация) были отнесены в группу с благоприятным исходом, а с уровнем более 3-х баллов (грубая инвалидизация, летальный исход или вегетативный статус) – в группу с неблагоприятным исходом.

Исследуемую группу составил 61 пациент, включая 32 (52,4%) мужчины и 29 (47,6 %) женщин с медианным возрастом 68 лет. В 54,1% случаев диагностировался атеротромботический, в 32,8 % – кардиоэмболический вариант ИИ; и в 13,1% случаев этиология инсульта оставалась неуточненной. В контрольную группу вошли 36 сопоставимых по полу и возрасту условно здоровых донора.

Лабораторные исследования проводили в первые 24-48 часов после инсульта. Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли стандартно центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. Относительное содержание различных субпопуляций клеток среди свежeweделенных МНК исследовали методом проточной цитофлюориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson, США) с использованием соответствующих моноклональных антител (BD PharMingen, NJ, USA). Т-клетки с фенотипом хелперов 1-го типа (Th1) и Т-регуляторных клеток (Treg) оценивали как CD4+IFN- $\gamma$ + и CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-лимфоциты, соответственно, с использованием FITC-меченных анти-CD25, PerCP-меченных анти-CD4 и PE-меченных анти-IFN- $\gamma$  моноклональных антител (BD

PharMingen, США). Фиксацию и пермеабиллизацию клеток для оценки внутриклеточной экспрессии IFN- $\gamma$  проводили с помощью коммерческого набора растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences). Относительное содержание классических (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), промежуточных (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) и альтернативных (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) моноцитов оценивали в популяции МНК с использованием FITC- и PE-меченых моноклональных анти-CD14 и анти-CD16 антител, соответственно (BD PharMingen, США). Миелоидные супрессорные клетки (МС) оценивали по содержанию ранних (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66<sup>-</sup>), гранулоцитарных (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD66<sup>+</sup>) и моноцитарных (HLA-DR<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>) МС с использованием анти-Lineage Cocktail 1 (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56; FITC, «BD Biosciences», США), анти-CD14 (FITC, «BD Biosciences»), анти-CD33 (PE-Cy 5, «BD Biosciences», США), анти-CD66b (APC, «BioLegend», США), анти-HLA-DR (FITC, «Сорбент», Россия; PE, PerCP/Cy 5.5 «BD Biosciences») моноклональных антител в соответствии с рекомендациями Bronte V. et al., 2016. О выраженности системной воспалительной реакции судили по концентрации СРБ и показателям крови (лейкоцитоз, СОЭ, нейтрофильно-лимфоцитарный индекс).

Статистическая обработка данных производилась с использованием программы Statistica 6.0 и Graph Pad Prism 9.0. Данные представлены в виде значений медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR, 25–75% квартили). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни (pU) и W-критерий Вилкоксона (pW), для сравнения частот – критерий точного метода Фишера или хи-квадрат. Корреляционную связь оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (rs). Для оценки влияния факторов на развитие инфекции или неблагоприятного исхода рассчитывали относительный риск (RR) по формуле Вольфа. Оценку прогностической значимости проводили с использованием ROC-анализа. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

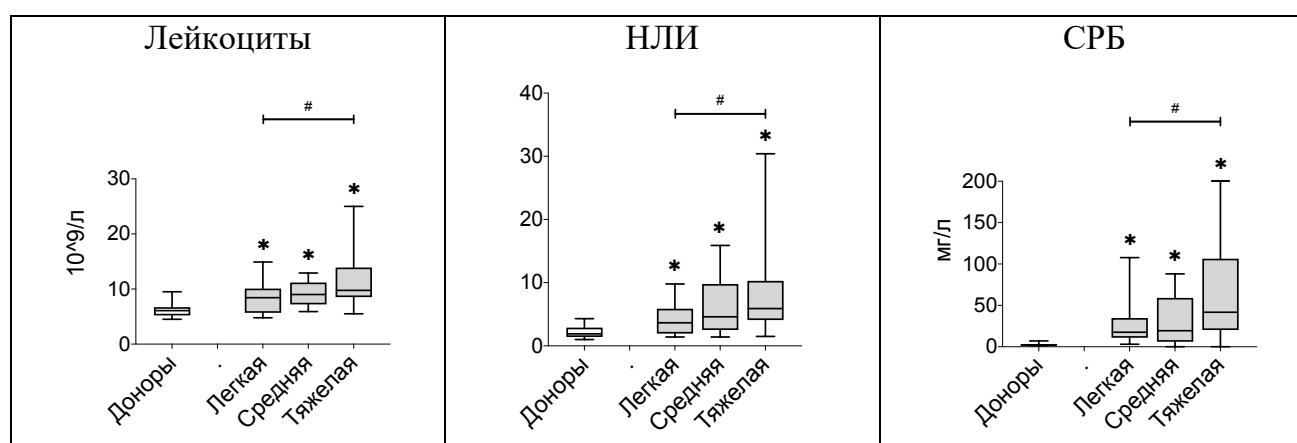
Поскольку поводом для настоящего исследования послужило предположение, что иммунные клетки могут влиять на клиническое течение инсульта путем регуляции воспалительного ответа, отправной точкой стало изучение взаимосвязи системной воспалительной реакции с тяжестью инсульта, развитием инфекционных осложнений и исходом. Анализ клинических и демографических показателей в исследуемой группе пациентов (табл.1) показал, что ИИ легкой степени тяжести диагностировался у 16, средней – у 15 и тяжелой – у 30 пациентов. Таким образом, доля пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести составила более 70%. Пациенты с ИИ легкой, средней и тяжелой степенью тяжести не различались значимо по возрасту и полу. Развитие инфекционных осложнений выявлялось у 32,8% больных и регистрировалось в среднем на 7-е сутки. В 9-ти случаях диагностировалась пневмония, в 11 – мочевиная инфекция. Неблагоприятный исход в сроки через 3 месяца отмечался у 36,1% больных.



Таблица 1 – Клинические и демографические показатели пациентов с ИИ в исследуемой группе

Параметры	Общая группа	Степень тяжести		
		Легкая (NIHSS≤7)	Средняя (NIHSS 8-12)	Тяжелая (NIHSS >12)
Количество; n, (%)	61	16 (26,2%)	15 (24,6%)	30 (49,2%)
Возраст (лет); Me (Min-Max)	68 (40-80)	66 (40-80)	65 (54-77)	70 (53-80)
Пол (Мужчины); n (%)	32 (52,4)	10 (62,5)	5 (50)	17 (56,6)
Инфекционные осложнения; n (%)	20 (32,8)	1 (6,25)	5 (33,3)	14 (46,7)
28-суточная летальность; n (%)	11 (18,0)	0 (0)	3 (20)	8 (26,6)
Неблагоприятный исход (mRs >3); n (%)	22 (36,0)	1 (6,25)	5 (33,3)	16 (53,3)

При сравнении показателей системного воспаления в группах больных с различной тяжестью ИИ (рис.1) абсолютное количество лейкоцитов, уровень НЛИ и концентрация СРБ были повышены уже при легкой степени тяжести, нарастали по мере утяжеления инсульта и при тяжелом инсульте были достоверно выше, чем при инсульте легкой степени тяжести. Взаимосвязь воспалительного ответа с тяжестью инсульта подтверждалась также наличием прямых корреляционных взаимосвязей балла NIHSS с уровнем лейкоцитоза ( $R=0,36$ ;  $p=0,0047$ ;  $n=61$ ), НЛИ ( $R=0,37$ ;  $p=0,0033$ ;  $n=61$ ) и СРБ ( $R=0,36$ ;  $p=0,0047$ ;  $n=61$ ).



**Рисунок 1** – Параметры воспалительного ответа у пациентов с ИИ различной степени тяжести. \* - достоверность различий с донорами; # - достоверность различий с больными легкой степени тяжести.

Для исследования взаимосвязи воспалительной реакции с развитием инфекционных осложнений и исходом был проведен сравнительный анализ показателей воспаления в группах с наличием и отсутствием инфекции, а также у пациентов с благоприятным и неблагоприятным 3-х месячным исходом. Поскольку инфекционные

осложнения и неблагоприятные исходы за исключением одного случая регистрировались только у пациентов с инсультом средней и тяжелой степени тяжести, оппозитные по инфекции и исходу группы формировали из числа пациентов с NIHSS  $\geq 8$ . Инфекционные осложнения в этой группе отмечались у 19/45 (42,2 %), а неблагоприятные исходы – у 21/45 (46,7%) больных.

Таблица 2 – Показатели системного воспаления у пациентов с ИИ, оппозитных по развитию инфекционных осложнений и 3-месячным исходам

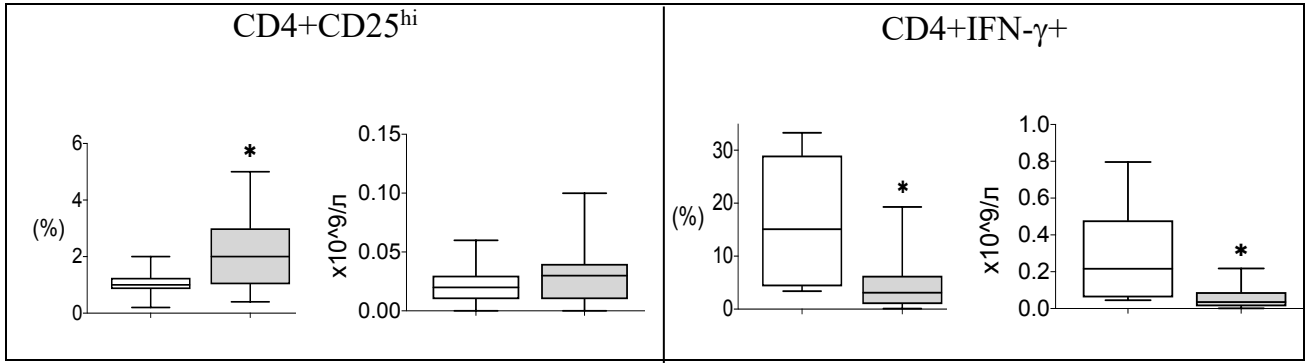
	Инфек. (+) n=19	Инфек. (-) n=2	$P_U$	Неблагоприятный исход; n=21	Благоприятный исход; n=24	$P_U$
Лейкоциты ( $\times 10^9/\text{л}$ )	11,9 (8,9-15,5)*	9,2 (7,5-10,4)*	0,019	12,4 (9,3-15,3)*	8,9 (8,1-10,4)*	0,014
НЛИ	9,2 (4,9-14,9)*	4,7 (2,5-7,2)*	0,008	7,5 (4,9-13,4)*	4,9 (2,6-7,2)*	0,02
СРБ (мг/л)	64,6 (36,1-8,1)*	21,2 (11,1-59,1)*	0,003	63,3 (39,1-87,7)*	21,1 (11,1-42,0)*	0,01

Примечание: \* - достоверность различий с донорами,  $P_U$  – достоверность различий между оппозитными группами; U-критерий Манна-Уитни.

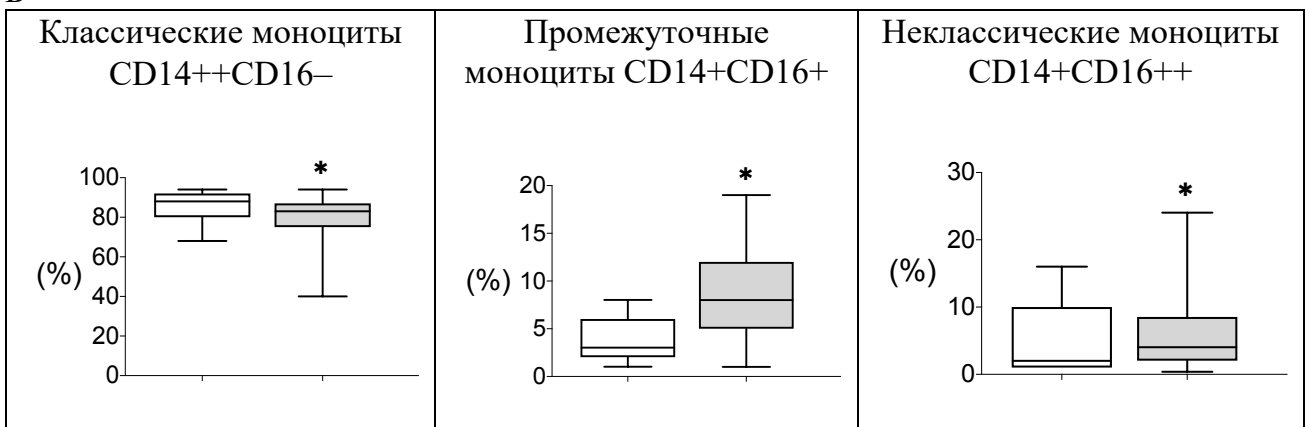
Как видно из данных таблицы 2, абсолютное количество лейкоцитов, концентрация СРБ и НЛИ у пациентов с развившейся впоследствии инфекцией были достоверно выше, чем в группе без инфекции. Аналогичным образом, показатели системного воспаления в остром периоде в группе с неблагоприятным исходом были выше, чем в группе с благоприятным исходом. Таким образом воспалительный ответ прямо ассоциировался с тяжестью инсульта и был более выраженным у пациентов, которые впоследствии имели инфекционные осложнения и неблагоприятный исход через 3 месяца.

Чтобы выяснить, сопровождается ли системная воспалительная реакция количественными изменениями лимфоидных и миелоидных клеток с регуляторной активностью, у больных в первые 24-48 часов после инсульта было исследовано содержание субпопуляций CD4+ Т-клеток, моноцитов и миелоидных супрессоров (рис.2). По сравнению с донорами у пациентов отмечалось возрастание Т-клеток с фенотипом Treg (CD4+CD25<sup>hi</sup>), которое проявлялось достоверным повышением их относительного количества и выраженным трендом к увеличению абсолютного содержания ( $p=0,06$ ;  $n=61$ ). Одновременно наблюдалось достоверное снижение относительного и абсолютного содержания Т-клеток с фенотипом Th1 (CD4+IFN- $\gamma$ +). При оценке субпопуляций моноцитов выявлялось достоверное снижение доли классических (CD14++CD16-) моноцитов, и возрастание промежуточных (CD14++CD16+) и неклассических (CD14+CD16++) моноцитов. Относительное содержание субпопуляций МС (Р-МС, М-МС и Г-МС) у больных было существенно повышено.

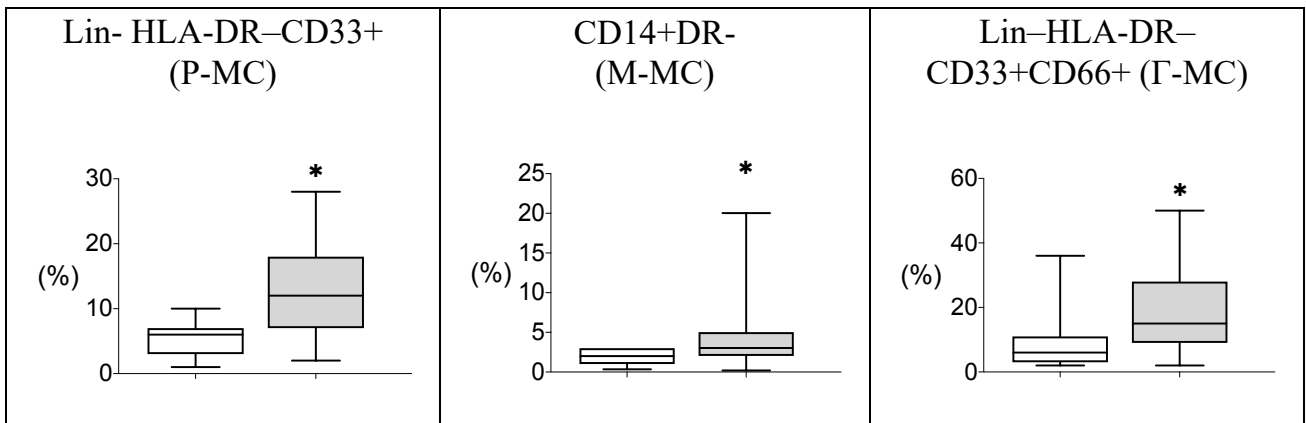
A



Б



В



**Рисунок 2** – Субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток, моноцитов и МС в остром периоде ИИ

\* - достоверность различий с донорами. □ – доноры ■ – больные.

Исследование взаимосвязи между тяжестью ИИ и содержанием субпопуляций CD4<sup>+</sup> Т-клеток не выявило какой-либо сопряженности. Относительное и абсолютное количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> и CD4<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup> Т-клеток значительно не различалось в группах больных с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести инсульта и не коррелировало с баллом NIHSS. Аналогичным образом, мы не выявили взаимосвязи между тяжестью ИИ и содержанием классических, промежуточных и неклассических моноцитов. В то же

время умеренная, но достоверная обратная корреляционная связь выявлялась между баллом NIHSS и субпопуляцией P-МС у пациентов с NIHSS >5 (R=-0,36; p= 0,007; n=54), т.е. после исключения из общей группы пациентов с наиболее легкой тяжестью ИИ.

Анализ взаимосвязи исследуемых субпопуляций лимфоидных и миелоидных клеток с выраженностью воспалительной реакции показал (табл.3), что в общей группе больных абсолютное количество CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток обратно коррелировало с концентрацией СРБ и НЛИ. В то же время относительное и абсолютное содержание CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток и индекс CD4+IFN $\gamma$ + /CD4+CD25<sup>hi</sup> находились в прямой корреляционной связи с уровнем СРБ. Относительное содержание CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток также прямо коррелировало с НЛИ. В группе пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести выявленные корреляционные связи сохранялись и были еще более выраженными.

Таблица 3 – Корреляционная взаимосвязь субпопуляций CD4+Т-клеток с параметрами воспаления у пациентов с ИИ

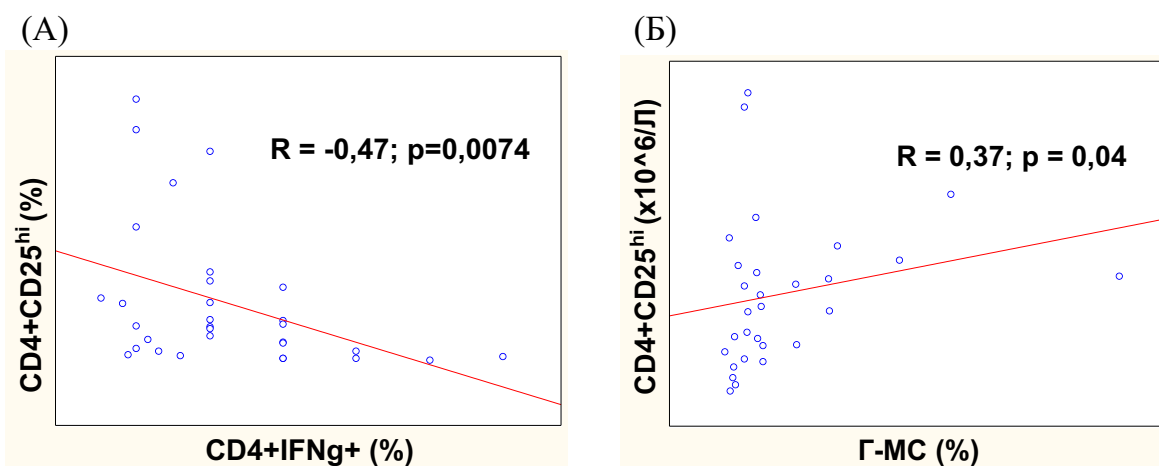
Параметры	Общая группа (n=41-61)		NIHSS $\geq$ 8 (n=31-45)	
	СРБ (мг/л)	НЛИ	СРБ (мг/л)	НЛИ
CD4+CD25 <sup>hi</sup> (%);	R= - 0,1; p= 0,46	R= - 0,001; p= 0,99	R= - 0,25; p= 0,09	R= - 0,1; p= 0,49
CD4+CD25 <sup>hi</sup> (x 10 <sup>9</sup> /л);	<b>R= - 0,31</b> ; p= 0,016	<b>R= - 0,53</b> ; p= 0,0001	<b>R= - 0,41</b> ; p= 0,006	<b>R= - 0,64</b> ; p= 0,0008
CD4+IFN $\gamma$ + (%)	<b>R= 0,48</b> p= 0,002	<b>R= 0,36</b> ; p= 0,047	<b>R= 0,55</b> ; p= 0,0014	R= 0,36; p= 0,047
CD4+IFN $\gamma$ + (x 10 <sup>9</sup> /л);	<b>R= 0,40</b> ; p= 0,01	R= - 0,1; p= 0,7	<b>R= 0,48</b> ; p= 0,006	R= 0,01; p= 0,99
Индекс CD4+IFN $\gamma$ +/ CD4+CD25 <sup>hi</sup>	<b>R= 0,41</b> ; p= 0,008	R= 0,22; p= 0,15	<b>R= 0,54</b> ; p= 0,002	R= 0,33; p= 0,07

Примечание: R- коэффициент корреляции по Спирмену.

Более того, в этой группе между содержанием клеток с фенотипом Treg и Th1 выявлялась обратная взаимосвязь (рис.3А).

Взаимосвязь системной воспалительной реакции с субпопуляциями циркулирующих моноцитов выявлялась только у пациентов с NIHSS $\geq$ 8. Относительное содержание CD16+ моноцитов (промежуточные + неклассические моноциты) прямо коррелировало с концентрацией СРБ (R=0,36; p=0,04; n=31), тогда как между классическими моноцитами и концентрацией СРБ регистрировалась обратная корреляционная связь (R=-0,39; p=0,03; n=31).

Среди МС - единственной субпопуляцией, которая обратно коррелировала с уровнем СРБ, было содержание миелоидных клеток с фенотипом Lin-CD33+ (R= -0,41; p= 0,037; n=26). Учитывая, что МС могут оказывать противовоспалительный эффект опосредовано через генерацию Treg, мы также проанализировали взаимосвязь субпопуляций МС с содержанием CD4+CD25<sup>hi</sup> клеток и выявили прямую корреляцию между долей гранулоцитарных МС (Lin-HLA-DR-CD33+CD66+) и количеством CD4+CD25<sup>hi</sup> клеток (рис. 3Б).



**Рисунок 3** – Корреляционная взаимосвязь CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток с содержанием CD4+IFNγ+ Т клеток (А) и Г-МС (Б)

Полученные данные свидетельствуют о том, что в отличие от CD4+IFNγ+ Т-клеток и CD16+ моноцитов, проявляющих в остром периоде ИИ провоспалительную активность, CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клетки, классические моноциты и Lin-CD33+ миелоидные клетки обладали, напротив, противовоспалительным потенциалом. При этом наличие прямой корреляционной связи CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток с долей Г-МС позволяет предполагать, что ограничение воспалительного ответа в остром периоде ИИ осуществляется с участием как лимфоидных, так и миелоидных супрессорных клеток.

Учитывая, что помимо противовоспалительного эффекта экспансия супрессорных субпопуляций может способствовать постинсультной иммуносупрессии и развитию инфекционных осложнений, на следующем этапе была исследована взаимосвязь анализируемых субпопуляций CD4+ Т-клеток, моноцитов и МС с лимфопенией (как наиболее ярким проявлением постинсультной иммуносупрессии) и инфекционными осложнениями.

Абсолютное количество лимфоцитов в остром периоде ИИ было достоверно снижено (табл. 4). Лимфопения (<1,34x10<sup>6</sup>/л; нижний порог нормативного диапазона)

**Таблица 4** – Содержание лимфоцитов у больных ИИ

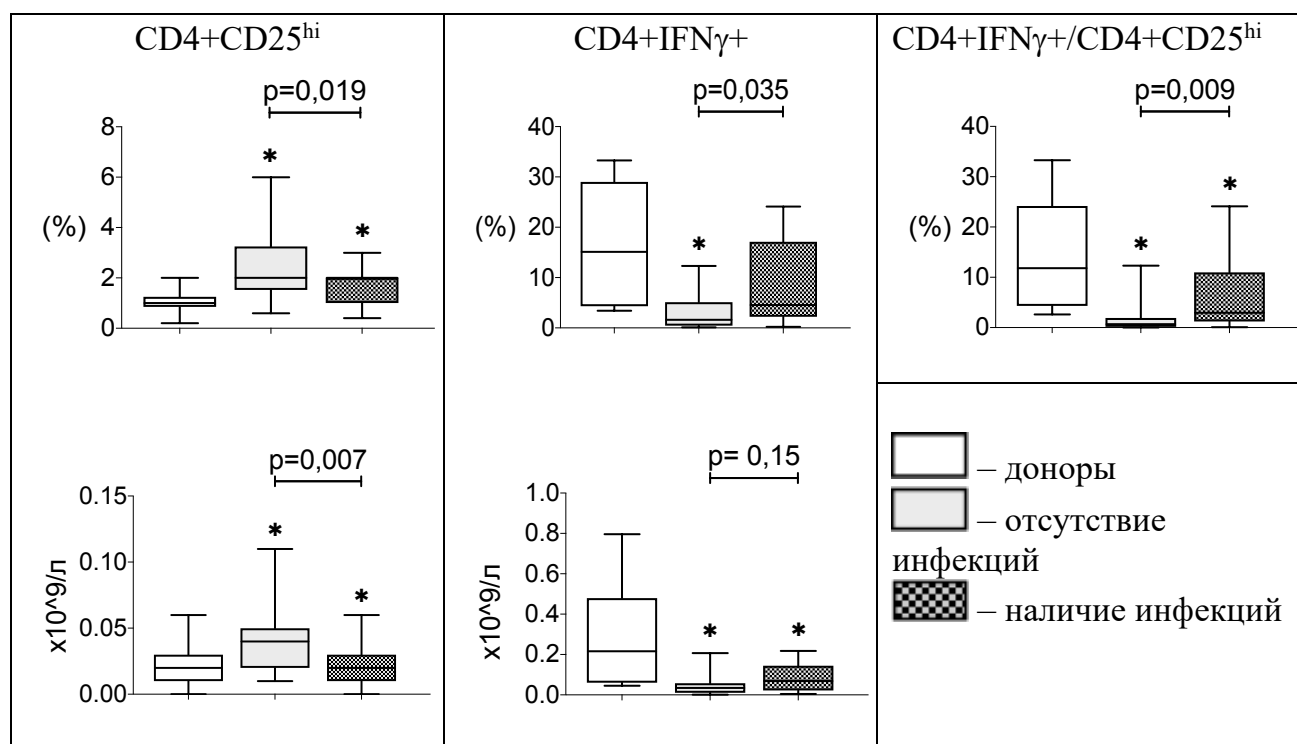
Параметры	Доноры	ИИ (общая группа) n=61	ИИ NIHSS≥8 n=45	NIHSS≥8 Инф (+) n=19	NIHSS≥8 Инф (-) n=26	P
Лимфоциты (x10 <sup>9</sup> /л)	1,89 1,44-2,39	1,43* 1,0-1,96	1,36* 1,01-2,01	1,27* 0,77-1,64	1,53 1,08-2,09	P <sub>U</sub> =0,07
Частота лимфопении	0%	45,9% 28/61	49% 22/45	68,4% 13/19	34,6% 9/26	P <sub>ТМФ</sub> =0,067

Примечание: \* - достоверность различий с донорами P<sub>U</sub> – достоверность различий между оппозитными группами больных; U-критерий Манна-Уитни; P<sub>ТМФ</sub> – критерий точный метод Фишера

выявлялась в общей группе у 45,9% пациентов. В группе со среднетяжелым и тяжелым инсультом частота лимфопении составляла 49%, причем у пациентов с развившейся

впоследствии инфекцией лимфопения регистрировалась в 2 раза чаще, чем в оппозитной группе. Следует отметить, что больные с лимфопенией не отличались от оппозитной группы по относительному содержанию CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток ( $P_U=0,42$ ), Р-МС ( $P_U=0,36$ ), М-МС ( $P_U=0,77$ ) и Г-МС ( $P_U=0,29$ ), тогда как доля CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток у больных с лимфопенией (Me=5,8%; IQR 3,4-16,4) 4-хкратно превышала таковую в группе без лимфопении (Me=1,35%; IQR 0,5-3,24;  $P_U=0,004$ ). При этом между абсолютным количеством лимфоцитов и относительным содержанием CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток выявлялась обратная корреляционная связь ( $R=-0,41$ ;  $p=0,02$ ).

Сравнительный анализ субпопуляций CD4+Т-клеток, в группах с развитием и отсутствием инфекционных осложнений показал (рис. 4), что пациенты обеих групп характеризовались в остром периоде возрастанием CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток и снижением CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток, однако у пациентов без инфекционных осложнений эти изменения были более выраженными. В результате абсолютное количество CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток в группе с отсутствием инфекции было достоверно выше, а относительное содержание CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток – достоверно ниже, чем у пациентов с инфекционными осложнениями. При этом индекс CD4+IFN $\gamma$ + /CD4+CD25<sup>hi</sup> у пациентов с инфекцией 4-кратно превышал таковой в группе с отсутствием инфекционных осложнений.



**Рисунок 4** – Т-клетки с регуляторной активностью у пациентов с отсутствием и наличием инфекционных осложнений. \*-достоверность различий с донорами,  $p<0,05$ .

Анализ субпопуляций моноцитов в оппозитных по инфекции группах не выявил достоверных различий в содержании классических, промежуточных и неклассических моноцитов. Единственной особенностью было более высокое значение индекса соотношения промежуточных и неклассических моноцитов в группе с инфекцией за счет менее выраженного возрастания неклассических и более выраженного увеличения промежуточных моноцитов (табл. 5). При оценке МС, различий в содержании ранних,

гранулоцитарных и моноцитарных МС у пациентов с наличием и отсутствием инфекционных осложнений также не выявлялось. Относительное количество Р-МС, Г-МС и М-МС в оппозиционных по инфекции группах было повышено в одинаковой степени.

Таблица 5 – Субпопуляции моноцитов и МС в группах пациентов с наличием и отсутствием инфекционных осложнений

Исследуемые параметры, Me (LQ-UQ)	Доноры n=20 (1)	Пациенты с наличием инфекции n=11-19 (2)	Пациенты с отсутствием инфекции n=21-26 (3)	P <sub>U</sub> (2-3)
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> (классические)	89,5 (86,0-92,0)	83,5 (77,0-88,0)*	83,0 (77,0-87,0)**	0,86
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> (промежуточные)	3,0 (2,0-5,0)	8,5 (5,0-12,0)**	8,0 (4,0-9,0)**	0,37
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> (неклассические)	2,0 (1,0-3,0)	2,5 (1,0-4,0)**	4,0 (2,0-7,0)**	0,17
Индекс CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> / CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>	2,0 (1,0-3,3)	3,4 (2,5-5,0)	1,78 (0,8-3,5)	0,044
Lin-HLA-DR-CD33 <sup>+</sup> (P-МС)	0,5 (0,29-0,6)	1,54 (1,24-2,7)*	1,4 (0,96-1,82)*	0,98
CD14 <sup>+</sup> HLA-DR-	2,0 (1,0-3,0)	2,8 (2,0-4,0)*	3,0 (2,0-5,0)*	0,98
Lin-HLA-DR-CD33 <sup>+</sup> CD66 <sup>+</sup> (Г-МС)	0,058 (0,034-3,008)	0,33 (0,24-0,38)*	0,23 (0,13-0,84)*	0,81
HLA-DR-CD33 <sup>+</sup> CD66 <sup>+</sup> (от Lin-)	0,57 (0,43-1,2)	1,76 (1,0-3,2)*	2,25 (1,2-4,2)*	0,32

Примечание: \* - достоверность различий с донорами; p<0,05

Таким образом, из всех исследуемых параметров, ассоциированные с инфекцией различия были выявлены для CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  и индекса CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ /CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>.

Чтобы выяснить, насколько изменение этих показателей влияли на риск развития инфекционных осложнений, был проведен анализ относительных рисков (RR) для факторов повышения CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, снижения CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  и уменьшения индекса CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ /CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>. Как видно (табл. 6), повышенное содержание абсолютного количества CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, а также снижение относительного содержания CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  Т-клеток и индекса CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ /CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> более чем двукратно уменьшало риск развития инфекционных осложнений.

Таблица 6 – Взаимосвязь CD4+Т-клеток с регуляторной активностью с риском развития инфекционных осложнений

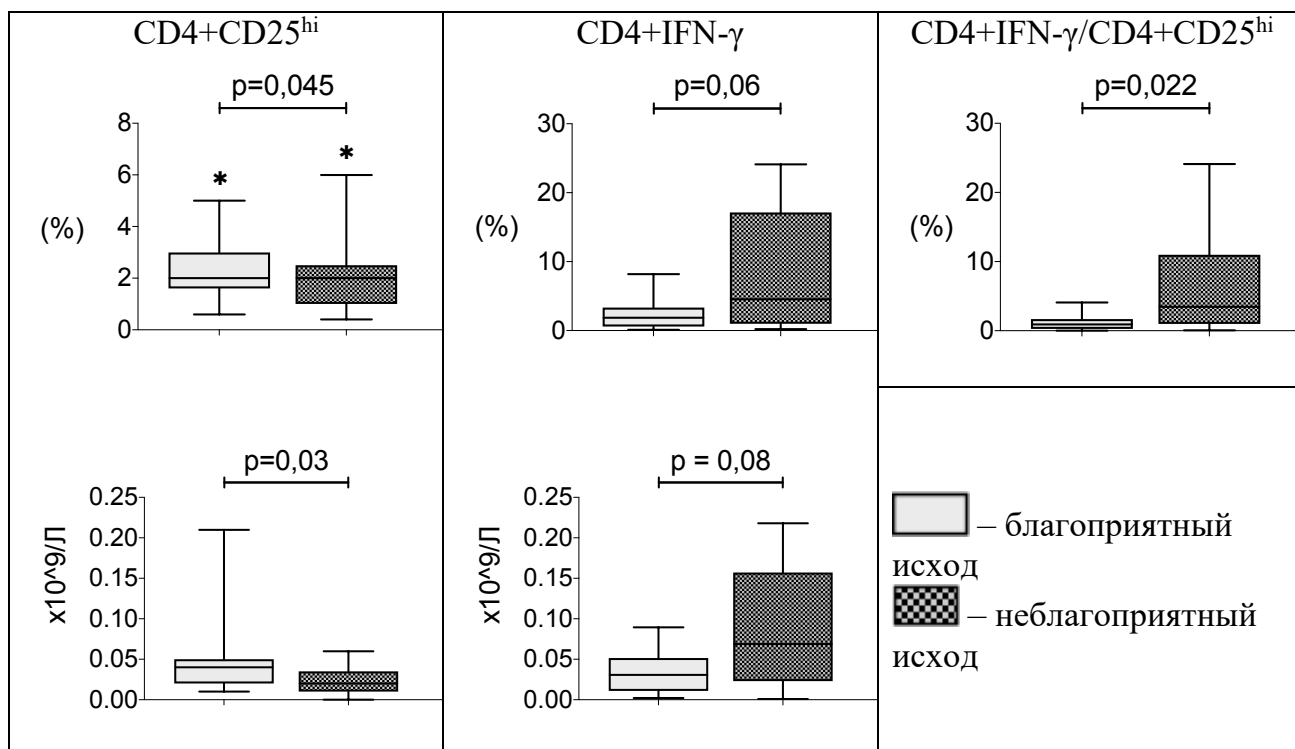
Фактор	Частота пациентов с инфекций		P <sub>ТМФ</sub>	Относительный (OR)	95% ДИ	Снижение OR
	наличие фактора	отсутствие фактора				
CD4CD25 <sup>hi</sup> >2% (>максимума у доноров)	20% (3/15)	53,3% (16/30)	0,054	0,375	0,129-1,089	0,625
CD4CD25 <sup>hi</sup> >0,036x10 <sup>9</sup> /л (> верхней квантили у доноров)	17,6% (3/17)	57,1% (16/28)	0,013	0,309	0,105-0,906	0,691
CD4+IFN-γ≥3,4% (<минимума у доноров)	27,8% (5/18)	69,2% (9/13)	0,033	0,401	0,175-0,919	0,599
Индекс CD4+IFN-γ/CD4CD25 <sup>hi</sup> <2,64 (<минимума у доноров)	30% 6/20	72,7% 8/11	0,03	0,412	0,193-0,883	0,588

Полученные данные свидетельствуют, что развитие лимфопении и инфекционных осложнений не было сопряжено с более высоким содержанием иммуносупрессорных субпопуляций лимфоидных и миелоидных клеток в первые 24-48 часов постинсультного периода. Более того, возрастание CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток и снижение CD4+IFN-γ достоверно уменьшало вероятность возникновения инфекции.

Далее была исследована возможная взаимосвязь исследуемых субпопуляций лимфоидных и миелоидных клеток с эффективностью функционального восстановления после ИИ. Корреляционный анализ выявил обратную зависимость между баллом mRs и абсолютным количеством CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток (R=-0,36; p=0,017; n=44), а также долей CD14+HLA-DR- (R=-0,4; p=0,022; n=33) и HLA-DR-CD33+CD66+ (R=-0,39; p=0,034; n=29) миелоидных супрессоров. Учитывая, что более низкий балл mRs соответствует более эффективному восстановлению, это означает, что большее содержание лимфоидных и миелоидных супрессорных клеток в остром периоде ассоциировалось с более эффективным функциональным восстановлением через 3 месяца после инсульта.

Также был проведен сравнительный анализ содержания исследуемых субпопуляций в остром периоде инсульта в группах пациентов с благоприятным (mRs ≤3) и неблагоприятным (mRs >3) 3-месячным исходом. Наличие благоприятных исходов у пациентов со среднетяжелым и тяжелым инсультом выявлялось у половины (n=22) пациентов, тогда как у другой половины (n=22) регистрировался неблагоприятный исход, включая 11 пациентов с летальным исходом и 11 – с грубой инвалидизацией. Пациенты с неблагоприятным исходом отличались достоверно меньшим относительным и абсолютным количеством CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, более высоким относительным содержанием CD4+IFN-γ+ Т-клеток и 4-кратно более высоким индексом соотношения Тх1/Трег (рис.5).





**Рисунок 5** – Иммунорегуляторные субпопуляции CD4+ Т-клеток в остром периоде ИИ в группах пациентов с благоприятным и неблагоприятным 3-месячным исходом  
\* - достоверность различий с донорами,  $p < 0,05$ .

Сравнение субпопуляций моноцитов в группах с оппозитным исходом не выявило каких-либо различий. В то же время при оценке субпопуляций МС содержание моноцитарных МС (CD14+HLA-DR-) у пациентов с неблагоприятным исходом было достоверно ниже, чем в группе с благоприятным исходом (табл.7).

**Таблица 7** – Субпопуляции моноцитов и МС в группах с благоприятным и неблагоприятным 3-месячным исходом

Параметр Me (LQ-UQ) %	Пациенты с благоприятным исходом	Пациенты с неблагоприятным исходом	$P_U$
CD14++CD16-	81,0 (75,0-84,5) *	84,0 (77,0-88,0) *	0,45
CD14++CD16+	9,0 (5,0-13,5) *	7,5 (4,0-9,0) *	0,16
CD14+CD16++	4,0 (1,0-8,0)	4,0 (2,0-6,0) *	0,78
CD14+HLA-DR-	4,0*(2,0-6,5) *	2,0 (1,0-3,0)	<b>0,03</b>
Lin-DR-D33+	1,2 (0,90-1,92) *	1,54 (1,24-2,4) *	0,25
Lin-HLA-DR-	0,23 (0,12-1,0) *	0,32 (0,2-0,38) *	0,77

Примечание: \* достоверность различий с донорами,  $p < 0,05$ ;  $P_U$  - достоверность различий между оппозитными группами пациентов.

Оценка относительного риска для параметров, значимо различающихся в группах с благоприятным и неблагоприятным исходом, показала, что повышенное абсолютное содержание CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, сниженные показатели относительного содержания CD4+IFN- $\gamma$  Т-клеток и индекса CD4+IFN- $\gamma$ /CD4CD25<sup>hi</sup>, а также возрастание CD14+HLA-DR- клеток более чем 2-кратно снижало риск развития неблагоприятного исхода (табл. 8).

Таблица 8 – Взаимосвязь Т-клеток с регуляторной активностью и М-МС с риском развития неблагоприятных исходов

Фактор	Частота пациентов с неблагоприятным исходом		P <sub>ТМФ</sub>	Относительный (OR)	95%ДИ	Снижение OR
	наличие фактора	отсутствие фактора				
CD4+CD25 <sup>hi</sup> >2%	20% (3/15)	53,3% (16/30)	0,054	0,375	0,129-1,089	0,625
CD4CD25 <sup>hi</sup> >0,036x10 <sup>9</sup> /л	17,6 (3/17)	57,1 (16/28)	0,013	0,309	0,105-0,906	0,691
CD4+IFN- $\gamma$ ≤3,4%	27,8 (5/18)	69,2 (9/13)	0,033	0,401	0,175-0,919	0,599
Индекс CD4+IFN- $\gamma$ /CD4+CD25 <sup>hi</sup> <2,64	30 (6/20)	72,7 (8/11)	0,03	0,412	0,193-0,883	0,588
CD14+HLA-DR- >3%	15,4% 2/13	55% 11/20	0,03	0,280	0,074-1,063	0,72

Выявленная взаимосвязь ряда субпопуляций, исследуемых в остром периоде ИИ, с риском развития инфекции и характером исхода позволила предположить, что эти субпопуляции могут характеризоваться прогностической значимостью, в частности, являться ранними предикторами развития инфекционных осложнений и неблагоприятного исхода ИИ. Чтобы проверить это предположение был проведен ROC-анализ.

Как известно, качество прогноза характеризуется площадью под ROC-кривой, соответствуя удовлетворительному - при значениях <0,7; хорошему при уровне 0,7-0,8 и очень хорошему при значении 0,8-0,9. Поскольку в клинической практике для прогнозирования течения и исхода широко применяется шкала NIHSS, а в качестве дополнительных биомаркеров обсуждаются показатели воспаления, было проведено сравнительное исследование прогностической значимости этих параметров в сравнении с иммунными биомаркерами. Как следует из данных таблицы 9, балл NIHSS в качестве индивидуального инструмента прогноза инфекции обладал низкой прогностической значимостью. Прогностическая значимость маркеров воспаления (СРБ и НЛИ) была несколько выше, достигая уровня хорошего качества модели.

При этом индекс CD4+IFN $\gamma$ + /CD4+CD25<sup>hi</sup> в качестве монопредиктора риска инфекции характеризовался более высокой прогностической значимостью. Площадь под кривой составляла 0,78, и при значениях индекса >1,14 развитие инфекции прогнозировалось с чувствительностью 86% и специфичностью 69% (рис. 6).

Таблица 9 – Значимость отдельных параметров в качестве предикторов инфекционных осложнений (ROC- анализ)

Параметр	AUC	P (95% ДИ)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
NIHSS	0,64	0,1 (0,47-0,8)	68	58
СРБ	0,76	0,003 (0,62-0,9)	84	57
НЛИ	0,73	0,008 (0,6-0,88)	74	58
CD4+IFN $\gamma$ +/ CD4+CD25 <sup>hi</sup>	0,78	0,009 (0,6-0,95)	86	69

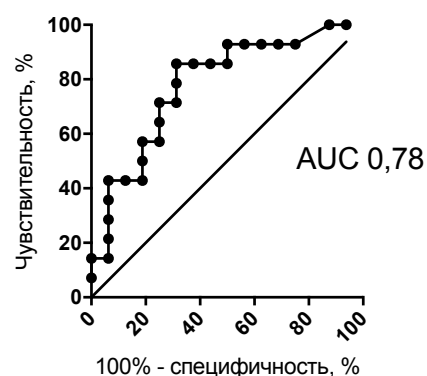


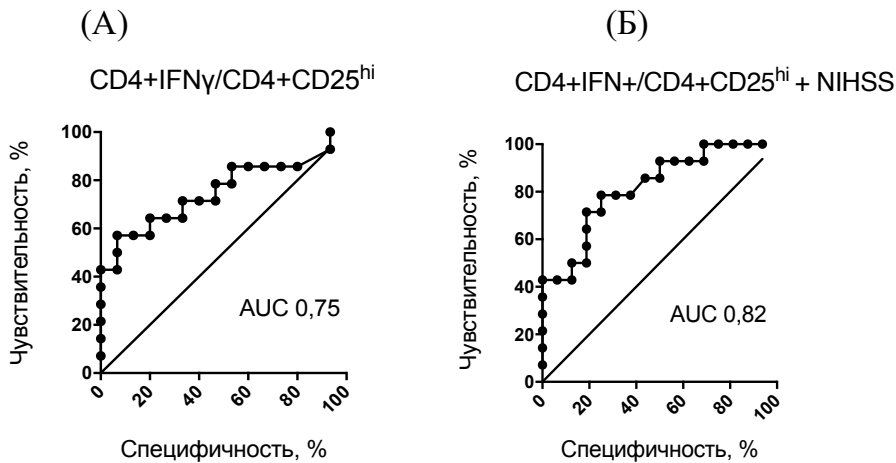
Рисунок 6 – Прогностическая значимость индекса CD4+IFN $\gamma$ +/  
CD4+CD25<sup>hi</sup> в развитии инфекционных осложнений (ROC- анализ)

При прогнозировании исхода – модели, основанные на определении балла NIHSS, уровня СРБ и НЛИ также достигали хорошего качества прогноза - площадь под ROC-кривой варьировала от 0,7 до 0,72 (табл.10). При этом площадь под ROC-кривой для индекса CD4+IFN $\gamma$ +/  
CD4+CD25<sup>hi</sup> была выше, составляя 0,75, и при значении индекса >1,19 позволяла прогнозировать неблагоприятный исход с чувствительностью 71% и специфичностью 67% (рис. 7А).

Таблица 10 – Значимость исследуемых параметров в прогнозе неблагоприятных 3-мес. исходов (ROC-анализ)

Параметр	AUC	P-достоверность (95% ДИ)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
NIHSS	0,72	0,01 (0,57-0,87)	62	57
СРБ	0,72	0,08 (0,564-0,88)	67	74
НЛИ	0,70	0,025 (0,54- 0,86)	71	65
CD4+IFN $\gamma$ +/ CD4+CD25 <sup>hi</sup>	0,75	0,02 (0,57-0,93)	71	67
CD4+IFN $\gamma$ +/ CD4+CD25 <sup>hi</sup> +NIHSS	0,82	0,003 (0,67-0,97)	79	75

Характерно, что комбинация индекса CD4+IFN $\gamma$ +/  
CD4+CD25<sup>hi</sup> с баллом NIHSS улучшала качество модели до уровня «очень хорошего» (рис. 7Б). В этом случае неблагоприятный исход прогнозировался с чувствительностью 79% и специфичностью 75%.

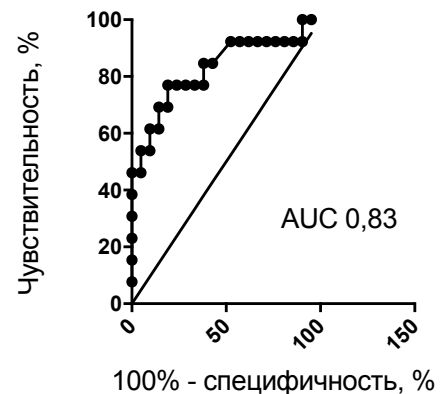


**Рисунок 7** – Прогностическая значимость индекса CD4+IFNγ+/CD4+CD25<sup>hi</sup>+ в качестве монопредиктора и в комбинации с баллом NIHSS в прогнозе неблагоприятного 3-мес. исхода (ROC-анализ)

Помимо Т-клеток с регуляторной активностью прогностическая значимость в качестве биомаркера исхода была также выявлена для относительного содержания М-МС (CD14+HLA-DR<sup>-</sup>). Площадь под кривой в данной модели составляла 0,72,

Таблица 11 – Прогностическая значимость М-МС в оценке 3-месячных исходов у больных ИИ (ROC-анализ)

Параметр	AUC	P (95% ДИ)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
М-МС	0,72	0,03 (0,55-0,9)	85%	55%
М-МС + NIHSS	0,83	0,002 (0,55- 0,9)	85%	62%



**Рисунок 8** – Прогностическая значимость М-МС + NIHSS в оценке 3-х месячных исходов у больных ИИ (ROC-анализ)

достигая хорошего качества прогноза (табл.11, рис 8). При значении относительного содержания М-МС <3,5% неблагоприятный исход прогнозировался с чувствительностью 85% и специфичностью 55%. Комбинация двух показателей - CD14+HLA-DR<sup>-</sup> клеток и балла NIHSS позволяла улучшить качество модели до уровня «очень хорошего». В этом случае площадь под кривой достигала 0,83, а специфичность увеличивалась до 62%.

Полученные данные позволяют заключить, что индекс CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25<sup>hi</sup> в остром периоде ИИ, а также относительное содержание М-МС характеризуются прогностической значимостью в качестве предиктора инфекционных осложнений и 3-месячного неблагоприятного исхода и при комбинации с баллом NIHSS улучшают качество прогноза мультифакториальной шкалы инсульта.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рабочей гипотезой настоящего исследования стало предположение, что в остром периоде ИИ количественное содержание лимфоидных и миелоидных клеток, участвующих в регуляции воспалительного ответа, может быть взаимосвязано с тяжестью, характером течения постинсультного периода (развитием инфекционных осложнений) и эффективностью неврологического восстановления (исходом), т.е. характеризоваться патогенетической и прогностической значимостью.

Проведенные исследования подтвердили прямую взаимосвязь между тяжестью инсульта и показателями системной воспалительной реакции и продемонстрировали, что у пациентов со среднетяжелым и тяжелым инсультом (NIHSS $\geq$ 8) развитие инфекционных осложнений и неблагоприятного 3-месячного исхода ассоциировано с более высокими показателями системной воспалительной реакции.

Исследование лимфоидных и миелоидных клеток с регуляторной активностью показало, что развитие системной воспалительной реакции в первые 24-48 часов после ИИ сопровождается возрастанием в периферической крови клеток с фенотипом Treg (CD4+CD25<sup>hi</sup>) и снижением Т-клеток с фенотипом Th1 (CD4+IFN $\gamma$ +); повышением доли промежуточных и неклассических моноцитов и снижением классических моноцитов, а также увеличение всех субпопуляций миелоидных супрессоров (P-МС, М-МС и Г-МС). При этом выявление достоверных прямых- (для CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток и CD16+ моноцитов) и обратных (для CD4+CD25<sup>hi</sup>, CD14+CD16- и Lin-CD33+ клеток) корреляционных связей с параметрами воспаления (СРБ и НЛИ) свидетельствует о возможном вовлечении лимфоидных и миелоидных клеток в регуляцию воспалительного ответа и их взаимодействии. Так, наличие прямой корреляционной связи CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток с содержанием HLA-DR-CD33+CD66+ клеток и обратной – с уровнем CD4+IFN $\gamma$ + клеток позволяет предполагать, что увеличение МС способствует экспансии Treg, а Treg подавляют генерацию Th1.

Сравнение исследуемых субпопуляций в группах, оппозитных по развитию инфекционных осложнений, показало, что пациенты с отсутствием инфекционных осложнений характеризуются в остром периоде достоверно большим абсолютным содержанием CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, меньшей долей CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток и меньшим индексом Th1/Treg. Причем повышение (по сравнению с донорами) абсолютного содержания Treg и снижение доли Th1 более чем двукратно снижает риск развития инфекции. Исследование взаимосвязи субпопуляций лимфоидных и миелоидных клеток с исходом через 3 месяца выявило наличие прямой корреляции между эффективностью функционального восстановления и субпопуляциями CD4+CD25<sup>hi</sup>, HLA-DR-CD33+CD66+ и CD14+HLA-DR- клеток и обратной корреляции с уровнем CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток. Пациенты с благоприятным исходом характеризовались в остром периоде достоверно более высоким содержанием (относительным и абсолютным) CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, относительным количеством М-МС (CD14+ HLA-DR-) и более

низким содержанием CD4+IFN $\gamma$ + T-клеток. При этом, как и в случае с инфекционными осложнениями, повышенное абсолютное содержание Treg и сниженное относительное количество Th1 значимо снижало риск развития неблагоприятного исхода.

Полученные результаты позволяют заключить, что возрастание CD4+CD25<sup>hi</sup> Treg и снижение CD4+IFN $\gamma$ + T-лимфоцитов в остром периоде являются факторами, снижающими риск развития инфекционных осложнений и неблагоприятного исхода, что свидетельствует о позитивной роли CD4+CD25<sup>hi</sup> T-клеток и негативной роли CD4+IFN $\gamma$ + T-клеток. Протективный эффект, обусловленный возрастанием Treg и снижением Th1, очевидно, связан с ограничением воспалительной реакции, что подтверждается наличием обратной корреляционной связи CD4+CD25<sup>hi</sup> T-клеток с параметрами воспаления и долей CD4+IFN $\gamma$ + T-клеток. Позитивная взаимосвязь CD14+HLA-DR- МС с благоприятным исходом, по-видимому, не связана с противовоспалительным эффектом, поскольку доля М-МС не коррелирует с показателями воспаления. Таким образом, влияние Treg и МС на исходы опосредуются скорее всего различными механизмами.

Анализ прогностической значимости исследуемых субпопуляций в остром периоде ИИ в качестве потенциальных биомаркеров течения и исхода ИИ показал, что индекс CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25<sup>hi</sup> является информативным маркером для прогнозирования риска возникновения ранних (в течение первых 28 суток) инфекционных осложнений. Кроме того, оценка индекса CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25<sup>hi</sup> и относительного содержания моноцитарных МС (CD14+HLA-DR-) позволяет прогнозировать неблагоприятный 3-месячный исход. Причем комбинация индекса CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25<sup>hi</sup> с баллом по NIHSS улучшает качество прогноза. Таким образом, индекс Th1/Treg (CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25<sup>hi</sup>) и относительное количество миелоидных супрессорных клеток (CD14+HLA-DR-) в периферической крови в первые 24-48 час после ИИ могут рассматриваться в качестве новых кандидатных прогностических биомаркеров в дополнение к шкалам тяжести инсульта и параметрам системного воспалительного ответа.

## ВЫВОДЫ

1. Больные ИИ в первые 24-48 часов характеризуются достоверным возрастанием абсолютного количества лейкоцитов, НЛИ и СРБ, уровни которых коррелируют с баллом NIHSS и значимо выше у пациентов с инфекционными осложнениями и/или неблагоприятным исходом, что свидетельствует о взаимосвязи системной воспалительной реакции с тяжестью и характером течения заболевания.

2. Системная воспалительная реакция в остром периоде ИИ сопровождается возрастанием в периферической крови клеток с фенотипом Treg (CD4+CD25<sup>hi</sup>) и снижением T-клеток с фенотипом Th1 (CD4+IFN $\gamma$ +); уменьшением классических (CD14+CD16-) и увеличением промежуточных (CD14+CD16+) и альтернативных (CD14-CD16+) моноцитов, а также возрастанием ранних, моноцитарных и гранулоцитарных миелоидных супрессорных клеток (Lin-HLA-DR-CD33+CD66-; CD14+HLA-DR- и Lin-HLA-DR-CD33+CD66+), что указывает на сопряженность воспалительного ответа с выраженными изменениями в компартменте лимфоидных и миелоидных клеток с регуляторной активностью.

3. Содержание CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток и CD16+ моноцитов находится в прямой-, а CD4+CD25<sup>hi</sup>, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> и Lin<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup> клеток - в обратной корреляционной зависимости с параметрами воспаления (СРБ, НЛИ), что свидетельствует о вовлечении указанных субпопуляций в регуляцию системной воспалительной реакции в остром периоде ИИ.

4. Пациенты с отсутствием инфекционных осложнений в сравнении с оппозитной группой характеризуются в остром периоде более высоким абсолютным содержанием CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток и меньшим относительным количеством CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток при отсутствии различий в содержании субпопуляций МС и моноцитов. При этом возрастание CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток и снижение CD4+IFN $\gamma$ + (соответственно выше и ниже нормативного диапазона) ассоциировано более чем с двукратным уменьшением относительного риска развития инфекции.

5. Содержание CD4+CD25<sup>hi</sup> Treg и МС (CD14+HLA-DR<sup>-</sup> и HLA-DR<sup>-</sup>CD33+CD66<sup>+</sup>) в первые 24-48 час постинсультного периода находится в прямой, а CD4+IFN $\gamma$ +Th1 – в обратной корреляции с эффективностью 3-мес восстановления, что в совокупности с данными о меньшей частоте неблагоприятных исходов при повышенном содержании CD4+CD25<sup>hi</sup> и CD14+HLA-DR<sup>-</sup> клеток свидетельствует о позитивной роли Treg и МС в остром периоде ИИ.

6. Индекс соотношения CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25<sup>hi</sup> и относительное содержание CD14+HLA-DR<sup>-</sup> клеток в остром периоде инсульта характеризуются прогностической значимостью при использовании в качестве предикторов инфекционных осложнений и неблагоприятного 3-месячного исхода. При этом комбинация индекса CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25<sup>hi</sup> или относительного количества CD14+HLA-DR<sup>-</sup> клеток с баллом NIHSS улучшает качество прогноза.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Морозов С.А., Старостина Н.М., Шевела Е.Я., Штоббе А.А., Давыдова М.Н., Черных Е.Р. Характеристика клеток с иммунорегуляторной активностью в остром периоде ишемического инсульта // Мед. Иммунология. – 2017. – Т. 19. – специальный выпуск. – С.202.

2. Morozov S., Shtobbe A., Starostina N., Leplina O., Tikhonova M., Shevela E., Chernykh E. Circulating myeloid-derived suppressor cells in acute ischaemic stroke // Brain Injury. – 2017. – V. 31. – № 6-7. – P.765-766.

3. Черных Е.Р., Шевела Е.Я., Морозов С.А., Останин А.А. Иммунопатогенетические аспекты ишемического инсульта (обзор) // Мед. иммунология. – 2018. – Т. 20, – № 1. – С. 19-34. Scopus, ИФ РИНЦ 0,636

4. Морозов С.А., Пронкина Н.В., Старостина Н.М., Леплина О.Ю., Останин А.А., Штоббе А.А., Черных Е.Р. Регуляторные Т-клетки при остром ишемическом инсульте и их взаимосвязь с воспалительным ответом и развитием инфекционных осложнений // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т.13(22), – №2. – С.423-425

5. Морозов С.А., Тихонова М.А., Пронкина Н.В., Штоббе А.А., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Останин А.А., Черных Е.Р. Баланс CD4+IFN $\gamma$ + и CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток как ранний предиктор 3-месячного исхода у больных ишемическим инсультом. Мед. Иммунология. – 2020. – Т. 22. – № 4, – С. 675-684 © 2020, СПб РО РААКИ.

## Список сокращений

ИИ	Ишемический инсульт
WSO	World Stroke Organization
DAMPs	Молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждением
CD	Кластер дифференцировки
HLA-DR	Фактор МНС II класса
Th1	Субпопуляция Т-хелперных клеток 1 типа
Treg	Т-регуляторные клетки
IFN- $\gamma$	Интерферон-гамма
СРБ	С-реактивный белок
NIHSS	Шкала инсульта национальных институтов здоровья США
mRS	Модифицированная 6-бальная шкала Рэнкина