

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи



МОРОЗОВ СЕРГЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

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

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор,  
член-корреспондент РАН  
Е.Р. Черных

Новосибирск  
2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. ИММУНОПАТОГЕНЕЗ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА</b> (Обзор литературы)	
1.1. Введение.....	11
1.2. Иммунный ответ на ишемическое повреждении головного мозга как патогенетическая основа инсульта.....	13
1.3. Локальный (интрацеребральный) иммунный ответ на острое ишемическое поражение головного мозга .....	15
1.4. Системные проявления иммунитета в остром периоде ишемического инсульта .....	21
1.5. Адаптивные иммунные реакции при ишемическом повреждении головного мозга .....	26
1.6. Лимфоидные и миелоидные клетки с иммунорегуляторной активностью в периферической крови в остром периоде ИИ.....	29
1.6.1. CD4+ Т-клетки с регуляторной активностью.....	30
1.6.2. Субпопуляции циркулирующих моноцитов.....	33
1.6.3. Субпопуляции миелоидных супрессорных клеток.....	37
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	
2.1. Характеристика больных, включенных в исследование.....	41
2.2. Иммунологические исследования.....	43
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	
<b>3.1 Оценка параметров системного воспалительного ответа в остром периоде ишемического инсульта у больных с различной тяжестью и исходами заболевания.....</b>	<b>45</b>
3.1.1 Характеристика больных .....	45

3.1.2 Системный воспалительный ответ в зависимости от тяжести и патогенетического варианта ИИ.....	47
3.1.3. Системный воспалительный ответа при различных вариантах течения и исхода ИИ.....	50
<b>3.2. Субпопуляции иммунных клеток с регуляторной активностью у больных ИИ в остром периоде и их взаимосвязь с тяжестью и системным воспалительным ответом</b>	
3.2.1. Субпопуляции Т-клеток с регуляторной активностью.....	53
3.2.2. Субпопуляции моноцитов.....	56
3.2.3. Субпопуляции миелоидных супрессорных клеток.....	60
<b>3.3. Характеристика клеток с иммунорегуляторной активностью у пациентов с ИИ, оппозитных по развитию инфекции</b>	
3.3.1. Субпопуляции Т-клеток с регуляторной активностью .....	67
3.3.2. Субпопуляции моноцитов.....	70
3.3.3. Субпопуляции миелоидных супрессорных клеток.....	72
3.3.4. Оценка влияния различных субпопуляций клеток с регуляторной активностью на риск развития инфекционных осложнений...	73
<b>3.4. Характеристика иммунных клеток с регуляторной активностью у пациентов с различной эффективностью восстановления через 3 месяца после ИИ</b>	
3.4.1. Субпопуляции Т-клеток с регуляторной активностью.....	74
3.4.2. Субпопуляции моноцитов.....	77
3.4.3. Субпопуляции миелоидных супрессорных клеток.....	78
3.4.4. Оценка влияния различных субпопуляций клеток с регуляторной активностью на риск развития неблагоприятного исхода.....	80
<b>3.5. Прогностическая значимость субпопуляций иммунных клеток в качестве потенциальных биомаркеров при ИИ.....</b>	<b>80</b>
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>85</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>94</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>96</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность исследования**

Ишемический инсульт (ИИ) является важнейшей медико-социальной проблемой в силу высоких показателей заболеваемости, смертности и инвалидизации взрослого населения [1, 2]. Значимость данной патологии во многом обусловлена увеличением частоты инсульта среди молодежи [4], повышенным риском повторных инсультов и отдаленными последствиями в виде нарушения когнитивных функций [5].

Многочисленные клинические и экспериментальные данные о причастности иммунных клеток и их медиаторов к повреждению и репарации нервной ткани при ишемическом поражении головного мозга поставили под сомнение догму о том, что ИИ является исключительно сосудистым заболеванием [6]. Согласно современным представлениям, патогенез ИИ связывают с активацией клеток врожденного и приобретенного иммунитета, опосредующих воспалительные и адаптивные иммунные реакции в ответ на ишемическое повреждение нервной ткани [7, 8]. Иммунный ответ играет двойственную роль. Контролируемые реакции врожденного иммунитета, лежащие в основе локальных и системных воспалительных реакций, направлены на ограничение очага повреждения, защиту от патогенов и активацию репаративного ответа [6, 9]. Кроме того, умеренно выраженная воспалительная реакция через активацию симпатoadреналовой системы индуцирует запуск механизмов регуляции, направленных на ограничение локального и системного иммунного ответа [10]. В то же время гиперергический ответ клеток врожденного иммунитета приводит к дополнительному повреждению нервной ткани и может являться причиной глубокой постинсультной иммуносупрессии, обуславливающей инфекционные осложнения [11,12,13]. В свою очередь, персистенция адаптивных иммунных реакций чревата развитием атрофии коры головного мозга и деменции [14]. Соответственно, клетки иммунной системы, участвующие в регуляции врожденных и адаптивных иммунных реакций,

могут оказывать существенное влияние на характер течения и исходы постинсультного периода, а также являться прогностическими биомаркерами [15].

Регуляция воспалительного ответа осуществляется с участием клеток адаптивного и врожденного иммунитета, среди которых большое внимание привлекают субпопуляции CD4+Т-лимфоцитов, миелоидных супрессорных клеток и моноцитов (как непосредственных регуляторов, так и резерва для генерации макрофагов и дендритных клеток). В популяции CD4+Т-лимфоцитов Т-хелперы 1 типа (Th1) активируют провоспалительный фенотип макрофагов и микроглии [16], тогда как Т-регуляторные клетки с супрессорной активностью (Treg) подавляют провоспалительную активность клеток врожденного иммунитета [17]. Возрастание Treg в мозговой ткани и периферической крови выявлено с первых дней после ишемического поражения мозговой ткани [18,19]. Тем не менее, интерпретация роли Treg остается неоднозначной. По мнению одних авторов, Treg при ИИ оказывают протективные эффекты [20, 21, 22, 23], по данным других - демонстрируют повреждающее действие [24, 25]. Содержание циркулирующих Th1 в остром периоде ИИ у человека не исследовано. В модели инсульта у мышей показано, что интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ) - продуцирующие Т-клетки проявляют выраженный нейро-воспалительный и тромбогенный эффект [26], а снижение уровня IFN- $\gamma$  уменьшает выраженность неврологического дефицита [27].

Сведения о роли моноцитов при ИИ, представленных в циркуляции тремя субпопуляциями клеток (классические, промежуточные и неклассические моноциты) [12], немногочисленны и неоднозначны. В отдельных исследованиях показано возрастание доли промежуточных моноцитов в остром периоде ИИ [28, 29]. Однако, если по данным первого исследования эти клетки обладают протективным эффектом, то по данным второго – ассоциируются с прогрессированием зоны инфаркта.

Еще меньше известно о миелоидных супрессорных клетках (МС). Системный воспалительный ответ сопровождается мобилизацией в кровотоки незрелых костномозговых миелоидных клеток, которые способны приобретать иммуносупрессорный фенотип [30]. Причем раннее увеличение МС при сепсисе является предиктором нозокомиальных инфекций и плохого прогноза [31]. Следует отметить, что экспансия МС происходит не только при сепсисе, но и системном воспалительном ответе неинфекционного генеза. Повышенный уровень гранулоцитарных МС описан также в модели окклюзии среднемозговой артерии у мышей [32]. В то же время содержание МС в остром периоде ИИ у человека остается до настоящего времени не охарактеризованным, а их роль – неясной.

Важно подчеркнуть, что острый период инсульта, соответствующий запуску реакций врожденного иммунитета (опосредующих воспалительную реакцию), является наиболее критичным периодом. Тем не менее, изменения в содержании клеток с иммунорегуляторной активностью в первые дни инсульта у пациентов с различным течением и исходами заболевания, остаются мало изученными. Открытым также остается вопрос – является ли возрастание в остром периоде клеток с иммуносупрессорной активностью исключительно неблагоприятным фактором, связанным с риском развития инфекций [33], или компенсаторной реакцией, направленной на подавление воспаления и ограничение вторичных повреждений [34, 3].

Учитывая вышесказанное, была сформулирована **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<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) и миелоидных супрессорных клеток (lin-HLA-DR-CD33<sup>+</sup>; lin-HLA-DR-CD33<sup>+</sup>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<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) моноцитов, а также увеличением ранних, Р-МС (Lin-HLA-DR-CD33<sup>+</sup>), миелоидных, М-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. 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-хкратно 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.

### **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 $\gamma$ + Т-клеток) и миелоидных (уменьшение CD14+CD16- и увеличение CD14++CD16+ и CD14+CD16++ моноцитов, а также возрастание Lin-HLA-DR-CD33+CD66-, CD14+ HLA-DR- и Lin-HLA-DR-CD33+CD66+ миелоидных супрессоров) клеток, уровни которых коррелируют с выраженностью системной воспалительной реакции.

2.Содержание Т-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  $CD4+CD25^{hi}/CD4+IFN\gamma+$ , а также относительное содержание CD14+ HLA-DR- 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»

## **Апробация работы**

Основные положения работы представлены и обсуждены на отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ в 2017, 2018, 2019 г; 12-ом международном конгрессе по повреждениям мозга (Новый Орлеан, 29 марта -1 апреля, 2017 г.), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 15–18 ноября 2017 года), 4-ом объединенном иммунологическом форуме, Новосибирск, Россия, июнь 2019 г. Апробация диссертации состоялась 28 января 2021 г на семинаре клинического отдела ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии.

## **ГЛАВА 1. ИММУНОПАТОГЕНЕЗ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

### **1.1 Введение**

Ишемический инсульт (ИИ) остается важнейшей медико-социальной проблемой во всем мире, занимая лидирующие позиции по заболеваемости, смертности и инвалидизации взрослого населения. По данным WSO (World stroke organization) ежегодно инсульт регистрируется у 17,3 млн. человек [35, 36]. Данная патология является второй по значимости причиной смерти и ведущей причиной длительной инвалидизации. Смертность от цереброваскулярных заболеваний в экономически развитых странах

составляет 11-12% и уступает лишь смертности от заболеваний сердца и опухолей всех локализаций [37, 38, 39]. Постинсультная инвалидизация занимает 1-е место среди всех причин инвалидизации. К труду возвращаются 20% лиц, перенесших инсульт, при том, что  $\frac{1}{3}$  болеющих инсультом – люди трудоспособного возраста [40].

Несмотря на успехи в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний, риск инсульта увеличился с 22,8% в 1990 году до 24,9% в 2016 году [41]. Другой тревожной тенденцией стало увеличение частоты инсультов среди молодежи [4], связанной с резким увеличением традиционных факторов риска инсульта, таких как гипертония, ожирение, гиперлипидемия, курение и злоупотребление психоактивными веществами [42]. Выжившие после инсульта подвергаются высокому риску повторных инсультов и долгосрочных последствий, приводящих к потере трудоспособности. Одно из самых тревожных из них - когнитивные нарушения. У пациентов, перенесших инсульт, риск развития деменции возрастает вдвое [5]. Ишемические поражения способствуют манифестации когнитивных нарушений при болезни Альцгеймера, являющейся основной причиной нейродегенеративной деменции у пожилых людей [43].

По данным Европейских многоцентровых проспективных исследований, 40% пациентов, перенесших ИИ, на период 3-х месячного наблюдения имеют неблагоприятный исход [44]. Ранняя оценка риска такого исхода чрезвычайно важна с точки зрения оптимизации медицинской помощи, в частности, принятия решений об использовании более агрессивных методов лечения или включения отдельных пациентов в клинические испытания. Своевременное прогнозирование исхода инсульта позволяет при назначении корректного лечения избежать летального исхода для больного и уменьшить неврологический дефицит [45]. За последние два десятилетия в этом направлении достигнуты значительные успехи, в частности, выявлены клинические факторы неблагоприятного исхода [46]. Так, установлена важная роль воспаления и ранних инфекционных

осложнений в качестве предиктора летальности и грубой инвалидизации [47]. В клинической практике для прогнозирования исходов ИИ обычно используется шкала инсульта национального института здоровья – NIHSS. При значениях NIHSS <10 баллов вероятность благоприятного исхода составляет 60–70%, а при уровне >20 – 4–16 %. Однако эта шкала не позволяет с высокой точностью оценивать риск неблагоприятного исхода у отдельного пациента. Учитывая этот факт, в последние годы активно ведется поиск новых биомаркеров в качестве монопредикторов или в дополнение к шкале NIHSS [48]. Поскольку выраженность воспалительной реакции и инфекционные осложнения связаны с особенностями иммунного ответа, оценка показателей иммунитета в качестве потенциальных прогностических биомаркеров привлекает особое внимание. Предполагается, что добавление иммунных биомаркеров может существенно повысить эффективность существующих прогностических клинических моделей и сделать их более персонализированными [49, 50].

## **1.2 Иммунный ответ на ишемическое повреждение головного мозга как патогенетическая основа инсульта**

Ведущая роль в патогенезе ИИ отводится иммунной системе. На сегодняшний день продемонстрировано, что иммунные клетки вовлечены во все стадии ишемического воспаления, включая острые нарушения внутрисосудистого кровоснабжения, повреждения паренхимы мозга, процессы очищения и репарации [6].

Разрушение клеток и белков внеклеточного матрикса в условиях ишемии приводит к высвобождению молекул «опасности», которые индуцируют быструю активацию клеток врожденного иммунитета, а позже реакции адаптивного иммунитета. Активация микроглии приводит к высвобождению цитокинов и хемокинов, которые, в свою очередь, способствуют рекрутированию из циркуляции нейтрофилов и других клеток врожденного иммунитета. Продуцируя активные метаболиты кислорода,

цитокины, металлопротеиназы и другие медиаторы, клетки врожденного иммунитета индуцируют и опосредуют воспалительную реакцию, которая является ключевым звеном патогенеза ишемического поражения мозга [8]. Контролируемая активация клеток врожденного иммунитета необходима для защиты от патогенов, ограничения зоны повреждения, элиминации клеточного детрита и является неременным атрибутом запуска репаративных процессов [51]. В то же время избыточная или пролонгированная активация клеток врожденного иммунитета, сопровождаемая гиперпродукцией провоспалительных медиаторов и вызывающая повторные волны рекрутирования лейкоцитов в ткани мозга, оказывает нейродеструктивное действие и поддерживает постишемическое воспаление [52, 8]. Так, выраженность воспалительной реакции ассоциирована с тяжестью инсульта и является причиной развития вторичных повреждений [53]. Кроме того, чрезмерная воспалительная реакция оказывает негативное влияние на процессы репарации в головном мозге и функциональное восстановление [54].

Адаптивный иммунный ответ манифестирует через несколько дней с момента острого нарушения кровообращения, имеет аутоиммунную направленность, не связан с повреждением паренхимы мозга в остром периоде и направлен на стимуляцию процессов восстановления повреждений в центральной нервной системе [56]. Тем не менее, при нарушениях иммунной регуляции сенсibilизированные к мозгоспецифическим антигенам Т-клетки, могут оказывать деструктивные эффекты, вызывать атрофию коры головного мозга и развитие деменции в отдаленном периоде инсульта [14].

Иммунный ответ при ИИ развивается как на локальном, так и системном уровне, поскольку высвобождающиеся из поврежденных клеток мозговой ткани молекулы «опасности» и цитокины проникают в кровоток и активируют системный иммунитет, мобилизуя иммунные клетки из лимфоидных органов и кишечника. При этом в отличие от длительного

воспаления в зоне инфаркта и пенумбры (ткани, окружающей зону инфаркта), системный иммунный ответ быстро сменяется иммуносупрессией, что проявляется развитием лимфопении и функциональными нарушениями иммунных клеток [55]. Развитие иммуносупрессии при ишемическом повреждении мозга обусловлено активацией симпатoadреналовой системы. Повреждение головного мозга запускает нейрогуморальный ответ (через гипоталамо-гипофизарную ось и вегетативную нервную систему), что приводит к активации надпочечников и секреции глюкокортикоидов и катехоламинов, оказывающих ингибирующий эффект на лимфоидные органы и иммунные клетки [57]. Данная реакция носит адаптационный характер, поскольку направлена на ограничение воспалительных и аутоиммунных реакций, но при избыточной выраженности является причиной инфекционных осложнений и связанной с инфекцией летальностью, а также подавляет процессы репарации [58].

Таким образом, иммунная система тесно взаимосвязана с критическими событиями, определяющими тяжесть инсульта, характер его течения и исход. С этих позиций оценка иммунных параметров, и, в особенности, иммунорегуляторных клеток, способных модулировать реакции врожденного и приобретенного иммунитета, открывает новые возможности для прогноза течения и исходов ишемического инсульта и выявления новых мишеней терапевтического воздействия.

### **1.3. Локальный (интрацеребральный) иммунный ответ на острое ишемическое поражение головного мозга**

#### ***Клетки врожденного иммунитета***

Запуск иммунного ответа при ИИ обусловлен быстрой активацией клеток врожденного иммунитета (начиная с момента артериальной окклюзии) и последующим проникновением их в зону ишемии, а также активацией резидентных клеток мозга. Сигналом к активации микроглии является высвобождение молекул «опасности» некротическими клетками в

условиях ишемии. Эти молекулы получили название «ассоциированных с опасностью молекулярных паттернов» (DAMPs) или аларминов, и включают различные белки (HMGB1, белки теплового шока, S100B), аденозинтрифосфат (АТФ), ДНК, РНК, сульфат гепарина, окисленные липопротеиды низкой плотности,  $\beta$ -амилоид, гиалуронан и другие молекулы. DAMPs связываются с рецепторами, распознающими патоген-ассоциированные молекулярные структуры патогенов (PAMPs), и активируют клетки микроглии к продукции медиаторов (цитокины, хемокины, нитрооксид, свободные радикалы кислорода), запускающих воспалительный ответ [53]. При попадании в циркуляцию указанные молекулы и провоспалительные цитокины активируют также циркулирующие иммунные клетки и индуцируют их миграцию в ткани мозга. При этом нарушение гематоэнцефалического барьера, индуцированное медиаторами воспаления, во многом способствует миграции лейкоцитов в мозговую ткань [61]. Активированные лейкоциты продуцируют активные метаболиты кислорода, протеолитические ферменты, лейкотриены и цитокины, включая фактор активации тромбоцитов, и тем самым усиливают вазоконстрикцию и агрегацию тромбоцитов, поддерживая нейровоспалительный ответ [62].

### ***Активация микроглии***

Активированная микроглия может приобретать не только M1 провоспалительный M1 фенотип и вовлекаться в воспалительный каскад, но и M2 противовоспалительный/репаративный фенотип и участвовать в подавлении воспаления и восстановлении поврежденных тканей. Видимо, этим объясняется ухудшение исхода инсульта при истощении микроглии [63]. Участие клеток с M2 фенотипом в подавлении воспаления и репарации опосредуется продукцией противовоспалительных медиаторов – интерлейкина-10 (IL-10), трансформирующего рост фактора  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-13 (IL-13), а также ростовых



(инсулиноподобный фактор роста-1; IGF-1) и различных нейротрофических факторов [64].

### ***Рекрутирование нейтрофилов***

Наряду с микроглией участниками локального иммунного ответа в остром периоде ИИ являются клетки врожденного иммунитета, попадающие в мозговую ткань из периферической крови. Усиление экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках и проницаемости гематоэнцефалического барьера способствует выходу лейкоцитов из кровяного русла и проникновению их в паренхиму мозга [65]. Рекрутирование нейтрофилов опосредуется участием хемокинового рецептора CCR2 и регистрируется уже в первые часы с момента инсульта [66]. Нейтрофилы способны оказывать как деструктивный (нейтрофилы первого типа), так и нейропротективный (нейтрофилы второго типа) эффект. Последний опосредуется альтернативно-активированными нейтрофилами (2-го типа), которые экспрессируют аргиназу-1 и обладают противовоспалительной активностью [67, 68].

### ***Рекрутирование моноцитов***

Рекрутирование циркулирующих моноцитов в зону инфаркта и пенумбры в модели инсульта происходит через 24 часа после окклюзии артерии [69] и опосредуется взаимодействием CCR2 с лигандом CCL2. Первоначально считалось, что дифференцированные из моноцитов макрофаги усиливают ишемическое повреждение [70]. Однако позже выяснилось, что макрофаги моноцитарного происхождения (мо-МФ) также участвуют в подавлении воспалительного ответа. Двойственная функция макрофагов так же, как и клеток микроглии, обусловлена существованием как минимум двух функциональных типов макрофагов. Макрофаги M1 фенотипа обладают провоспалительными свойствами и обеспечивают защиту от патогенов, но при этом оказывают нейротоксический эффект, тогда как M2 клетки участвуют в элиминации клеточного детрита, подавляют

воспаление и стимулируют нейрогенез, рост и миелинизацию аксонов, синаптогенез и ангиогенез [71, 72].

Активация микроглии достигает пика на 2-3 сутки и продолжается до нескольких недель [64]. В эти сроки (подострая фаза ишемического инсульта) включаются восстановительные механизмы, направленные на ограничение воспаления и стимуляцию аксонального ремоделирования нервной ткани, требующего участия М2-микроглии [73]. Однако при церебральной ишемии репаративный потенциал клеток микроглии нарушается, поскольку они прогрессивно приобретают М1 провоспалительный фенотип [74]. В этой ситуации недостаточность нейропротективной активности микроглии восполняется рекрутированием периферических моноцитов и поляризацией их в М2 клетки [51]. В экспериментальных исследованиях, позволяющих дифференцировать микроглию и мо-МФ, показано, что микроглия обеспечивает фагоцитоз клеточного детрита только в первые сутки после церебральной ишемии, а в более поздние сроки фагоцитарная функция и подавление воспалительного процесса в ишемизированной ткани мозга опосредуется в большей степени мо-МФ [88]. По сравнению с клетками микроглии, мо-МФ характеризуются более высокой фагоцитарной активностью [100], большей резистентностью к повреждающему действию ишемии [88] и могут играть более важную роль в процессах нейрональной пластичности и ремоделировании при церебральной ишемии [74, 142].

Попадая в зону ишемии, мо-МФ снижают экспрессию CCR2 и повышают экспрессию CX3CR1, что свидетельствует о смене М1-провоспалительного фенотипа на М2-противовоспалительный фенотип. Этим может объясняться тот факт, что блокирование миграции мо-МФ ухудшает исход инсульта [144, 60, 145]. Мигрирующие в зону ишемии мо-МФ экспрессируют маркеры альтернативной активации, включая Arg1, YM1 (Chil3) и CD206 (Mrc1), что свидетельствует об их протективной роли. Однако позже мо-МФ вновь приобретают провоспалительный фенотип, который может способствовать хроническому воспалению [74].

Продemonстрирована также позитивная роль мо-МФ в ангиогенезе. Так, у мышей Ccr2-/-, с отсутствием миграции мо-МФ в зону ишемии выявлялась сниженная экспрессия TGF- $\beta$ 1, тромбоспондина и коллагена-4, обуславливающая нестабильность сосудов, геморрагическую трансформацию и снижение ангиогенеза [60, 74]. Помимо периферической крови, резервуаром моноцитов, которые впоследствии мигрируют в головной мозг, является селезенка [76]. В остром периоде инсульта численность моноцитов с про- и противовоспалительной активностью в селезенке значительно снижается, что ассоциировано с возрастанием количества моноцитов в мозговой паренхиме [76]. Причем спленэктомия, предшествующая окклюзии мозговой артерии, снижает количество инфильтрирующих моноцитов в мозговой ткани, не сказываясь на размерах ишемического поражения [35].

### ***Рекрутирование дендритных клеток***

Еще одной субпопуляцией клеток, рекрутируемых в острую фазу из циркуляции в ишемизированную зону головного мозга, являются дендритные клетки (ДК) [77]. ДК представляют собой наиболее профессиональные антигенпрезентирующие клетки с высокой миграционной способностью и включают две субпопуляции миелоидных ДК (сDC1 и сDC2), плазмацитоидные ДК и ДК моноцитарного происхождения (мо-ДК) [78]. Миелоидные сDC2 идентифицированы у мышей как основная популяция, вносящая вклад в ишемическое повреждение мозга, поскольку данный тип клеток секретирует IL-23, индуцируя экспрессию IL-17 в  $\gamma\delta$  Т-клетках и инфильтрацию нейтрофилов [79]. У человека описана популяция ДК, которые выявляются в головном мозге в периваскулярном пространстве в непосредственной близости от Т-клеток, что указывает на их возможную роль в презентации антигенов в зоне ишемии [26].

### ***Рекрутирование НК-клеток***

НК клетки также участвуют в патогенезе ишемического повреждения мозга. НК клетки экспрессируют CX3CR1 (рецептор к фракталкину),

рекрутируются в ответ на продукцию фракталкина ишемизированными нейронами и способны оказывать прямой и непрямой нейротоксический эффекты, опосредованные действием IFN- $\gamma$  и перфорина [80, 81].

### ***Клетки приобретенного иммунитета***

Лимфоциты выявляются в области ишемического поражения через 24 часа после окклюзии среднемозговой артерии и характеризуются повреждающим действием, которое не связано с антигенной специфичностью, экспрессией костимуляторных молекул и усилением тромбообразования [82,83]. Наибольшую популяцию составляют CD8+Т-лимфоциты с цитотоксической активностью, которые оказывают нейродеструктивный эффект через продукцию IFN- $\gamma$  и высвобождение перфорина. Деструктивный эффект Т-клеток может быть также обусловлен действием прооксидативных ферментов и генерацией Т-клетками супероксидных радикалов [84]. Истощение Т-клеток, подавление их миграции и/или функциональной активности оказывает защитное действие в модели очаговой ишемии головного мозга [85, 86]. В более поздние сроки повреждающее действие Т-клеток может быть связано с IL-17, продуцируемым  $\gamma\delta$  Т-клетками, которые рекрутируются под действием продуцируемого макрофагами IL-23 [87]. Таким образом, повреждающий эффект Т-клеток в остром периоде инсульта обусловлен активацией и инфильтрацией антиген-неспецифических Т-клеток и продукцией ими провоспалительных медиаторов и цитокинов.

В отличие от эффекторных лимфоцитов, участвующих в ишемическом повреждении головного мозга, роль Treg, инфильтрирующих ишемизированную область, менее однозначна. Ряд авторов предполагает, что Treg играют важную роль в развитии иммунологической толерантности при экспериментальной ишемии. В условиях ишемического повреждения иммуносупрессия может быть целесообразной, предотвращая аутоиммунные реакции направленные против мозговой ткани, учитывая, что нарушение гематоэнцефалического барьера после инсульта позволяет клеткам

иммунной системы сталкиваться с новыми тканеспецифичными мозговыми антигенами в очаге ишемии и периферической крови [89]. Протективные свойства Treg, предположительно связаны со способностью этих клеток подавлять воспалительный ответ и подтверждаются тем, что истощение Treg в модели ИИ существенно усиливает поражение мозга и ухудшает функциональные исходы [89]. С другой стороны, более поздние исследования модели ИИ на мышах DEREГ с деплецией Treg с помощью дифтерийного токсина, показывают, что истощение Treg не влияет на объем зоны инфаркта [91].

Имеются также данные о негативном эффекте Treg, связанном с повреждением микрососудов и усилением ишемического поражения мозга. Так, по данным Stubbe et al. деплеция Treg в модели инсульта не сказывается негативно на неврологическом восстановлении или даже оказывает протективный эффект [132].

Повреждающее действие Treg в остром периоде инсульта является антиген-неспецифическим и связано со способностью этих клеток усиливать взаимодействие тромбоцитов с эндотелиальными клетками [24].

#### **1.4. Системные проявления иммунитета в остром периоде ишемического инсульта**

Нарушение гематоэнцефалического барьера в остром периоде инсульта способствует проникновению провоспалительных цитокинов и DAMPs в кровеносное русло, активации клеток врожденного иммунитета в периферической крови, центральных и периферических органах иммунной системы (лимфатические узлы, селезенка, лимфоидная ткани кишечника), и в итоге запуску системного воспалительного ответа [176, 57, 177]. Длительная персистенция такой активации может приводить к развитию полиорганной недостаточности [178] и снижению когнитивных функций в позднем периоде инсульта [61].

Важная роль в индукции системного иммунного ответа также отводится гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, активация которой вызывает сначала стимуляцию иммунного ответа, а затем – иммуносупрессию. Так, возрастание уровня IL-1 после инсульта стимулирует высвобождение гипоталамусом кортикотропин-рилизинг-гормона, который, попадая в кровь, индуцирует секрецию адренокортикотропного гормона (АКТГ) из передней доли гипофиза, а последний стимулирует секрецию глюкокортикоидов корой надпочечников [205]. Надпочечники могут также активировать иммунный ответ на периферии через гуморальные механизмы или катехоламины [208]. Высвобождение катехоламинов и стероидов, стимулирует мобилизацию иммунных клеток из костного мозга, селезенки и кишечника [179, 55].

Системный иммунный ответ в остром периоде экспериментального инсульта манифестирует повышенными уровнями провоспалительных цитокинов и хемокинов (IL-6, IFN- $\gamma$ , CXCL1) в сыворотке крови, а также повышенной продукцией медиаторов воспаления (TNF, IL-6, IL-2, CCL2 и CXCL2) циркулирующими иммунными клетками и клетками селезенки в первые часы после окклюзии мозговой артерии. Этот ответ является временным и проходит в течение 24 часов после инсульта [180, 47]. Системные проявления иммунного ответа в виде лейкоцитоза и возрастания в крови медиаторов воспаления наблюдаются и у больных с ИИ [181]. Концентрация провоспалительных цитокинов в остром периоде ИИ резко возрастает [182, 204], а уровни IL-6 в сыворотке крови коррелируют с тяжестью инсульта и неблагоприятным исходом [183].

Одним из проявлений системной воспалительной реакции является возрастание соотношения нейтрофилов и лимфоцитов, уровень которого является прогностическим маркером 60-дневной и 90-дневной летальности при ишемическом инсульте [184, 185]. Источником лейкоцитов на периферии, помимо костного мозга, является селезенка, сокращение которой приводит к выбросу в циркуляцию спленоцитов [99]. У человека сокращение

размеров селезенки выявляется у 40% пациентов. Для этих пациентов характерны более выраженная тяжесть инсульта и более высокий уровень воспалительной реакции, в частности, более высокие концентрации в крови IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-13 и IL-10 [185]. Причину мобилизации клеток селезенки связывают с активацией симпатической нервной системы [187] и повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов и хемокинов (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, MCP-1, MIP-2, CCR1, CCR2, CCR7 и IP-10) [47; 99]. В экспериментальных исследованиях спленэктомия или облучение селезенки перед или сразу после окклюзии мозговой артерии приводит к уменьшению размеров инфаркта и улучшению неврологического восстановления [50, 188]. В этом аспекте терапевтический потенциал стволовых клеток в моделях ишемического поражения головного мозга может быть в значительной мере опосредован их способностью подавлять провоспалительный ответ со стороны селезенки [189, 112]. Способность статинов уменьшать индуцированную инсультом периферическую иммунодепрессию в том числе связывают ослаблением ими атрофии селезенки [95].

Активация циркулирующих клеток врожденного иммунитета в остром периоде ИИ подтверждается также при исследованиях транскриптома [192]. При этом, как показали экспериментальные исследования, изменения в компартментах иммунных клеток выявляются не только в циркуляции, но и костном мозге, селезенке, лимфатических узлах и кишечнике [193, 45].

Индукцированная ишемическим поражением головного мозга активация иммунной системы на периферии быстро сменяется иммунодепрессией, которая является причиной постинсультных инфекций – основной причиной смертности [203]. Тяжелые инфекции, возникающие после инсульта, связаны с повышенным риском смерти и худшим функциональным восстановлением независимо от исходных характеристик пациентов или лечения [202].

Фаза иммунодепрессии проявляется снижением количества лимфоцитов, увеличением концентрации противовоспалительного цитокина

IL-10, подавлением активности моноцитов, в частности, уменьшением экспрессии HLA-DR молекул и продукции провоспалительных цитокинов, повышенным уровнем апоптоза лимфоцитов и атрофией лимфоидных органов [102, 13, 201]. Иммунная недостаточность клинически проявляется присоединением пневмонии и мочевой инфекции, часто являющихся непосредственной причиной летальности при инсульте [193,13]. Частота выявления пневмонии и инфекции мочевыводящих путей у пациентов в постинсультном периоде достигает 30% [190]. Следует отметить, что развитие инфекций сопряжено с более обширными размерами ишемического поражения мозга и более выраженной иммунодепрессией. Так, по данным литературы, пациенты с инфекционными осложнениями характеризуются более высокими уровнями IL-10 и IL-6 и меньшим содержанием CD4+ Т-клеток [10].

Развитие иммунной недостаточности в первую очередь обусловлено активацией симпатoadреналовой системы и повышенным высвобождением глюкокортикоидов и катехоламинов [193, 37]. Действительно, повышенный уровень кортизола в сыворотке крови у пациентов с ИИ является предиктором летального исхода [37, 117]. Многие типы клеток иммунной системы экспрессируют  $\beta_2$ -адренорецепторы, и выброс катехоламинов ингибирует антигенпрезентирующую функцию дендритных клеток и моноцитов, индуцируя толерогенные дендритные клетки, а также вызывает анергию Т-лимфоцитов и генерацию Treg [200, 199]. Глюкокортикоиды также индуцируют толерогенные свойства антигенпрезентирующих клеток, в частности, снижают их способность стимулировать Th1- и Th17-лимфоциты и усиливают способность индуцировать Treg [197]. Возрастание уровня глюкокортикоидов и катехоламинов сопровождается усилением апоптоза лимфоцитов и переключением иммунного ответа с Th1 на Th2; атрофией первичных и вторичных лимфоидных органов; экспансией Treg [191, 47]. Органы иммунной системы имеют хорошую симпатическую иннервацию, и активация симпатической нервной системы усиливает выброс



катехоламинов. Кроме того, катехоламины секретируются Т-клетками. Поэтому, гиперактивация симпатoadреналовой системы при инсульте приводит к глубокой иммуносупрессии [118]. Значение глюкокортикоидов и катехоламинов в развитии иммунодепрессии и инфекционных осложнений подтверждается тем фактом, что пациенты с инфекционными осложнениями отличаются более высокими уровнями этих медиаторов [117], а антагонисты стероидов или  $\beta$ -адренергических рецепторов (пропранолол) в моделях экспериментального инсульта снижают уровень апоптоза лимфоцитов и чувствительность к инфекциям [191]. Аналогичным образом, пациенты, принимающие бета-блокаторы, имеют меньший риск ранней летальности [196].

Учитывая, что локальное нейровоспаление поддерживается нейродеструктивным действием рекрутированных с периферии иммунных клеток, биологическая значимость постинсультной иммуносупрессии заключается в индукции толерантности периферических иммунных клеток и подавлении их миграции в пораженный мозг. Действительно, угнетение антигенной презентации в условиях иммунодепрессии способствует формированию толерогенного ответа, который направлен на предотвращение избыточных воспалительных и аутоиммунных реакций. При таком рассмотрении «контролируемая» иммуносупрессия является механизмом feed-back регуляции, направленной на предупреждение развития вторичных повреждений и длительного нейровоспалительного ответа в головном мозге. В то же время чрезмерная или пролонгированная иммуносупрессия чревата развитием инфекционных осложнений, которые приводят к летальному исходу [190]. Присоединение инфекции может также потенцировать воспалительную реакцию и провоцировать развитие аутоиммунных реакций за счет усиления экспрессии костимуляторных молекул и презентации антигенов. Например, в модели экспериментального ишемического-реперфузионного повреждения введение липополисахарида (прототип бактериальной инфекции) усиливает атрофию головного мозга и

обуславливает неблагоприятный исход через 1 мес после моделирования инсульта [45], что объясняется повышением экспрессии костимуляторной молекулы B7.1, сенсibilизацией Т-клеток к антигенам мозговой ткани и индукцией Th1 ответа [40, 121].

Таким образом, негативная роль постинсультной иммуносупрессии может заключаться не только в присоединения инфекций, но и в потенцировании аутоиммунных реакций, вызывающих неврологические расстройства в отдаленном периоде. При этом важным механизмом, способствующим активации аутореактивных клонов, может быть деплеция CD4<sup>+</sup> Т регуляторных клеток вследствие постишемической лимфопении.

### **1.5. Адаптивные иммунные реакции при ишемическом повреждении головного мозга**

Ишемическое повреждение приводит к гибели клеток и высвобождению большого количества аутоантигенов, о чем свидетельствует повышенный уровень мозгоспецифических антигенов в сыворотке крови больных ИИ – основного белка миелина, креатин-киназы, нейрон-специфической энолазы и белка s100, концентрация которых коррелирует с размерами инфаркта [122]. Эти антигены через кровь, цереброспинальную жидкость, оболочку обонятельного нерва, а также после захвата антигенпрезентирующими клетками мозговой ткани переносятся в лимфоузлы, где активируют лимфоциты. Презентация мозгоспецифических антигенов на фоне повышенного содержания провоспалительных цитокинов, индуцирующих созревание дендритных клеток ДК, вызывает развитие адаптивных клеточных и гуморальных иммунных реакций [124]. Поскольку антигенами при церебральной ишемии выступают разрушенные фрагменты собственной мозговой ткани (фрагменты нейральных, глиальных и эндотелиальных клеток и внеклеточного матрикса), адаптивный иммунный ответ имеет аутоиммунную направленность. Проявлениям такого ответа

является появление на периферии сенсibilизированных к тканевым антигенам эффекторных Т-клеток и мозгоспецифических антител [123].

### ***Т-клеточный адаптивный ответ.***

Иммунный ответ Т-клеток к мозгоспецифическим антигенам описан в клинике и эксперименте [39, 121]. У пациентов с инсультом дендритные клетки и макрофаги лимфоидной ткани, дренирующей ЦНС, отличаются повышенным содержанием мозгоспецифических антигенов [124].

Поскольку миелинизация нервных волокон играет важную роль в функционировании нейронов [125], повреждение миелина аутореактивными Т-клетками может вызывать развитие церебральной атрофии, когнитивных расстройств и негативно сказываться на эффективности неврологического восстановления [126]. Так, пациенты, перенесшие в раннем периоде инфекцию, характеризуются впоследствии более выраженным Th1 ответом к белкам миелина и антигену астроцитов (GFAP) и неблагоприятным прогнозом [39]. Аналогичным образом, введение миелин-реактивных спленоцитов иммунодефицитным мышам при экспериментальном инсульте ухудшает неврологический исход [127]. Такой же эффект в модели инсульта наблюдается при введении липополисахарида, который усиливает Th1 ответ спленоцитов к мозгоспецифическим антигенам, и вследствие этого повышает летальность и ухудшает неврологический исход [121]. Негативный эффект аутореактивных Т-клеток у человека обсуждается также в аспекте развития атрофии мозга и деменции у выживших после инсульта [14].

С другой стороны, запуск адаптивного иммунного ответа совпадает по времени с фазой регенеративных процессов, и в литературе имеются данные о позитивных эффектах аутореактивных Т-клеток [198], связанных с индукцией нейропротективного и противовоспалительного фенотипа Т-клеток в условиях их примирения нейральными антигенами [206]. Одним из возможных механизмов протективной активности Т-клеток может быть продукция Т-клетками нейротрофических и регуляторных факторов [20,

128]. Так, Т-клетки способны поддерживать нейрогенез [129], и этот эффект опосредован антигенспецифическими CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, через продукцию фактора роста нервов, нейротрофического фактора головного мозга и нейротрофина-3 [130, 131].

Разнонаправленные эффекты адаптивного иммунного ответа могут быть обусловлены субпопуляционной принадлежностью Т-клеток, направленностью и силой иммунного ответа, а также антигенной специфичностью. Показано, что более высокая активность Т-клеток, специфичных к основному белку миелина, ассоциирована с тяжестью инсульта, размерами инфаркта и худшим исходом, а высокая реактивность Т-клеток, специфичных к нейрональным антигенам (ассоциированному с микротрубочками антигену-2 NR-2A рецептора NMDA), сопряжена с меньшими размерами инфаркта и лучшими отдаленными исходами [124].

Одной из популяций Т-клеток, генерируемых при ишемическом повреждении мозга и мигрирующих в зону ишемического повреждения, являются регуляторные CD4<sup>+</sup> Т-клетки с супрессорной активностью (Treg). В модели экспериментального инсульта показано, что Treg появляются в зоне ишемии с первых дней и впоследствии их численность нарастает [132]. Появление Treg в ишемической ткани в ранние сроки отражает неспецифическую миграцию Т-клеток на фоне воспаления и нарушения гематоэнцефалического барьера. В то же время в более поздние сроки увеличение численности Treg в циркуляции, селезенке и головном мозге является отражением адаптивного иммунного ответа. Обладая супрессорной активностью, Treg могут защищать головной мозг от ишемического поражения, подавляя воспалительный ответ. Так, по данным литературы, Treg продуцируют противовоспалительные цитокины (TGF- $\beta$ , IL-10), ингибирующие системный и локальный воспалительный ответ; подавляют продукцию металлопротеиназы-9, предотвращая нарушения гематоэнцефалического барьера; ингибируют функционирование эффекторных Т-клеток и активацию микроглии [132, 89]. Усиление

активности Treg, а также адаптивный перенос Treg или их генерация *in vivo* в модели инсульта, характеризуются нейропротективным эффектом [15, 89, 38]. Наряду с иммуномодулирующей активностью, позитивный эффект Treg может быть обусловлен стимулирующим влиянием на нейрогенез [22] и неоваскуляризацию [23].

### ***Гуморальный иммунный ответ.***

Участие В-клеток в патогенезе ИИ подтверждается появлением в сыворотке крови антител к мозгоспецифическим антигенам [134]. В литературе нет данных о негативном влиянии аутоантител на исход инсульта. Напротив, складывается впечатление, что В-клетки и продуцируемые аутоантитела могут играть протективную роль в патогенезе ишемического поражения головного мозга. Так, интрацеребральное введение В-клеток дефицитным по В-лимфоцитам мышам в модели экспериментального инсульта приводит к уменьшению зоны инфаркта [95]. Протективный эффект может быть связан с присутствием среди В-лимфоцитов регуляторных В-клеток, которые способны ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов Т-клетками. Действительно, интрацеребральное введение регуляторных В-клеток в остром периоде экспериментального инсульта снижает выраженность воспалительного ответа и улучшает функциональное восстановление [92]. Кроме того, протективная роль В-клеток может быть связана с продукцией аутоантител, распознающих молекулы фосфорилхолина, которые входят в состав окисленных липидов низкой плотности, мембран апоптотических клеток и клеточной стенки *Streptococcus pneumoniae*. Указанные антитела могут опосредовать элиминацию окисленных липопротеидов и апоптотических клеток, а также участвовать в защите от пневмококковой инфекции [93]. У человека ИИ сопряжен с выраженным уменьшением пула циркулирующих и селезеночных В-клеток (атрофия селезенки) [47]. При этом неврологическое восстановление прямо коррелирует с количеством CD19+ В-клеток [95].

## **1.6 Лимфоидные и миелоидные клетки с иммуnoreгуляторной активностью в периферической крови в остром периоде ИИ**

Как известно, регуляция воспалительного ответа осуществляется с участием клеток адаптивного и врожденного иммунитета, среди которых большое внимание привлекают субпопуляции CD4+Т-лимфоцитов, миелоидных супрессорных клеток и моноцитов (как непосредственных регуляторов, так и резерва для генерации макрофагов и дендритных клеток).

### **1.6.1. CD4 Т-клетки с регуляторной активностью**

Популяция CD4+Т-лимфоцитов содержит клетки, способные как усиливать, так и подавлять воспалительный ответ. К первым относятся Т-хелперы 1 типа (Th1), ко вторым – Т-регуляторные клетки супрессорной активностью (Treg).

Провоспалительная активность Th1 опосредуется продукцией IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , а также способностью этих клеток индуцировать M1 провоспалительный фенотип макрофагов и микроглии [16, 97]. В модели экспериментального инсульта продемонстрировано, что ишемическое поражение мозга приводит к выраженной активации периферической иммунной системы (включая клетки селезенки), что проявляется усилением продукции IFN- $\gamma$  и других провоспалительных цитокинов [98, 98]. Th1, продуцирующие IFN- $\gamma$ , проявляют выраженный нейровоспалительный и тромбогенный эффект [20]. Негативная роль IFN- $\gamma$  подтверждается тем, что спленэктомия оказывает нейропротективное действие, а введение IFN- $\gamma$  отменяет этот эффект [99]. Продукция IFN- $\gamma$  клетками селезенки потенцирует вторичное повреждение в головном мозге за счет усиления экспрессии провоспалительного белка IP-10, а блокирование IFN- $\gamma$  с помощью нейтрализующих антител – уменьшает объем ишемического поражения мозга и улучшает функциональные исходы [27]. Проведенные недавно Xiao et al. исследования показали, что ингибция ИФН $\gamma$ -продуцирующих Т-клеток селезенки после экспериментального инсульта под

действием IL-33 также уменьшает объем инфаркта и неврологический дефицит [104]. С другой стороны, имеются сведения, что, хотя IFN- $\gamma$  играет важную роль в индукции воспаления при экспериментальном инсульте, Т-лимфоциты не являются существенным источником данного цитокина [105]. Сведения об изменениях IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток и их патогенетической/прогностической значимости в первые дни после ИИ у человека отсутствуют.

Treg представляют гетерогенную популяцию клеток с супрессорной активностью, которая в популяции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов представлена клетками с высокой экспрессией рецептора к  $\alpha$ -цепи IL-2 (CD25), имеющими фенотип CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>. Treg характеризуются также низкой экспрессией или отсутствием рецептора к IL-7 (CD127) и экспрессируют внутриклеточно транскрипционный фактор FoxP3 [106]. Следует отметить, что популяция CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток на 78-84% представлена CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> лимфоцитами, и только минорная часть этих клеток не несет CD25 или экспрессирует его на низком уровне [106]. С другой стороны, показано, что сепарированные CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> клетки на 97% являются FoxP3-позитивными [107]. Также известно, что FoxP3 обратно коррелирует с экспрессией CD127 и стратегия гейтирования по CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> фенотипу позволяет получить до 91,4% FoxP3 позитивных клеток [107]. Поэтому в клинической практике для идентификации Treg часто оценивают клетки с иммунофенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> или CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>.

У человека выделяют две популяции – естественные и индуцированные Treg, источником которых являются, соответственно, тимус и периферические CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-клетки. При этом до настоящего времени в научном сообществе не сложилось однозначного мнения о возможности фенотипически дифференцировать указанные субпопуляции [109, 110]. Обе субпопуляции Treg способны ингибировать функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета, играя важную роль в подавлении воспалительной реакции, регуляции иммунного ответа и поддержании периферической

толерантности [17, 111]. Супрессорный эффект Treg опосредуется продукцией противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGF- $\beta$ ), экспрессией иммуносупрессивных молекул (CTLA-4, CD39, PD-1), истощением IL-2 за счет связывания с высокоаффинным рецептором CD25, секрецией цитолитических молекул, таких как гранзимы и перфорин [112].

Данные экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что Treg могут оказывать нейропротективный эффект путем подавления воспалительной реакции, активности эффекторных Т-клеток и активации микроглии [20]. Позитивный эффект Treg может быть также обусловлен угнетением активности астроцитов и астроглиоза [113], стимулирующим влиянием на выживаемость и продукцию миелина олигодендроцитами [114], усилением нейрогенеза [22], и образования новых сосудов [21, 23]. С другой стороны, Treg могут вызывать повреждение микрососудов и потенцировать ишемическое поражение головного мозга [24], а также участвовать в индукции иммуносупрессии, являющейся ведущей причиной инфекционных осложнений и летальности при ИИ [25].

Значимость Treg в патогенезе ИИ у человека исследована крайне недостаточно, а результаты клинических исследований противоречивы. Так, согласно данным одних исследований, относительное количество Treg в периферической крови с первых дней после ишемического поражения мозговой ткани возрастает [18, 19, 116]. В то же время другими исследователями показано уменьшение доли Treg в периферической крови и снижение их супрессорной активности [13, 19, 194, 115], причем уменьшение этой субпопуляции сопряжено с увеличением Th17 и выраженным нарушением баланса Th17/Treg [194].

Данные о взаимосвязи Treg с исходами ИИ также неоднозначны. Urra X. et al. не выявили какой-либо зависимости между содержанием Treg в остром периоде инсульта и 3-х месячным исходом [13]. В то же время в исследованиях Santamaria-Cadavid et al. [116], выполненных на большей выборке (204 пациента) обнаружено, что более высокий уровень Treg в



острой фазе ИИ независимо связан с благоприятным функциональным исходом через 3 месяца. В свою очередь, более низкий уровень Treg в остром периоде ИИ, ассоциирован с прогрессией неврологических расстройств в раннем периоде и более обширным поражением головного мозга [116]. Поскольку Treg обладают иммуносупрессивной активностью, возрастание этих клеток в острую фазу инсульта может быть связано с повышенным риском инфекций, развитие которых сопряжено с плохим долгосрочным исходом [117]. Доклинические исследования в модели окклюзии среднемозговой артерии показали, что введение экзогенных Treg не усугубляет иммуносупрессию и снижает риск спонтанных инфекций в постинсультном периоде [135]. Клинические исследования Urra X. et. al. не обнаружили связи между уровнем Treg и развитием инфекций после инсульта [13]. Однако Santamaria-Cadavid et al. [116] показали, что более низкие уровни Treg через 48 и 72 часа с момента инсульта были независимо связаны с развитием ранних инфекций. Эти данные свидетельствуют о защитной роли Treg в плане развития инфекций. Поскольку, ведущим механизмом иммуносупрессии при ИИ является активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и симпатической нервной системы провоспалительными цитокинами [53], поэтому подавление воспаления под действием Treg может, по-видимому, уменьшать выраженность иммунодепрессии и риск развития инфекции.

### **1.6.2. Субпопуляции циркулирующих моноцитов**

В острой фазе ишемического инсульта активация микроглии и резидентных макрофагов сопровождается несколькими волнами инфильтрации поврежденной ткани иммунными клетками периферической крови, среди которых важная роль отводится моноцитам. Мигрирующие в головной мозг моноциты дифференцируются в макрофаги, обладающие мощной фагоцитарной активностью. Первоначально присутствие этих клеток рассматривалось как маркер усиления воспалительного ответа и более

выраженного поражения головного мозга. Более поздние исследования, однако, показали, что моноциты представляют гетерогенную группу клеток, включающую у человека три субпопуляции (классические, промежуточные и неклассические моноциты), и эти субтипы могут играть разную роль в патогенезе инсульта, выполняя не только деструктивную, но и протективную функцию. При этом направленность эффектов моноцитов во многом зависит от тяжести поражения и временного окна [59,60].

Моноциты представляют субпопуляцию лейкоцитов костномозгового происхождения, которые циркулируют в крови и играют важную роль в иммунном ответе не только за счет способности дифференцироваться в макрофаги и дендритные клетки, но и вследствие непосредственного участия в регуляции иммунного ответа [136, 118, 137]. Эти клетки по своей природе неоднородны и обладают высокой пластичностью. На основе экспрессии CD14 (ко-рецептор TLR4, опосредующий сигнал от LPS) и CD16 (Fc гамма-рецептор IIIa) у человека выделяют три популяции моноцитов – классические (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>), промежуточные (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>) и неклассические (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>++</sup>) моноциты [141]. Последние две популяции различаются дополнительно по маркеру Tie-2 (рецептор к ангиопоэтину-1,2), который экспрессируется промежуточными моноцитами [146] и молекуле Slan, которая экспрессируется неклассическими моноцитами [141].

Считается, что классические моноциты, мигрирующие из костного мозга в циркуляцию, дифференцируются в кровотоке через стадию промежуточных моноцитов в неклассические моноциты [141]. Классические моноциты, являющиеся аналогами провоспалительных Ly6C<sup>hi</sup> моноцитов у мышей, составляют около 80–95% циркулирующих моноцитов; являются менее зрелыми и обладают высокой фагоцитарной активностью. Высокая экспрессия хемокинового рецептора CCR2 определяет их способность мигрировать в поврежденные ткани (очаги воспаления). Данный рецептор, в основном, экспрессирован на моноцитах, относящихся к классической и промежуточной субпопуляциям.

Промежуточные моноциты составляют около 2-8% циркулирующих моноцитов и являются продуцентами активных форм кислорода (АФК). Эти клетки обладают наиболее высокой антигенпрезентирующей способностью (в силу более высокой экспрессии HLA-DR), стимулируют пролиферацию Т-клеток и участвуют в воспалительном ответе и ангиогенезе, хотя, по данным некоторых авторов могут участвовать в ограничении воспалительного ответа, являясь основными продуцентами противовоспалительного цитокина IL-10 [119].

Неклассические моноциты составляют около 2-11% циркулирующих моноцитов. Поскольку эти клетки лишены хемокинового рецептора CCR2, но высоко экспрессируют ингибитор хемокиновой миграции – рецептор к фракталкину (CX3CR1), неклассические моноциты не мигрируют в ткани, а выполняют функцию патрулирования сосудистого эндотелия (в поисках повреждений и репарации). Однако при активации эти клетки могут проявлять провоспалительный фенотип, секретируя высокие концентрации провоспалительных цитокинов и участвуя в презентации антигена и стимуляции Т-клеток [118, 137, 138].

Провоспалительная и нейродеструктивная активность моноцитов обусловлена способностью этих клеток продуцировать активные метаболиты кислорода, провоспалительные цитокины и индуцировать адаптивный иммунный ответ [138, 137]. Нейропротективный эффект связывают со способностью классических моноцитов (благодаря экспрессии CCR2) мигрировать в ткани мозга и поляризоваться в макрофаги M2 фенотипа, обладающие противовоспалительной и нейрорегенеративной активностью [139, 140]. В качестве другого механизма нейропротекции в модели окклюзии среднемозговой артерии продемонстрирована способность классических моноцитов при стимуляции низкими дозами LPS приобретать толерогенный фенотип и оказывать локальный противовоспалительный эффект после миграции в ткани мозга [143]. Протективный эффект промежуточных моноцитов может быть обусловлен их противовоспалительной активностью,

поскольку по данным ряда авторов промежуточные моноциты являются основными продуцентами противовоспалительного цитокина IL-10 [119]. Защитная функция неклассических моноцитов может объясняться их участием в контроле за присутствием в крови патогенов и репаративным потенциалом, поскольку эти клетки не экспрессируют CCR2 и их функция заключается в патрулировании сосудистого русла и поддержании целостности сосудов [139, 147].

По данным литературы, количество циркулирующих моноцитов у пациентов в остром периоде ИИ возрастает [29, 148], что приводит к уменьшению лимфоцитарно-моноцитарного индекса. При этом более выраженное повышение моноцитов и снижение лимфоцитарно-моноцитарного индекса ассоциировано с неблагоприятным исходом инсульта [148, 149, 103].

Данные литературы об изменениях структуры субпопуляций моноцитов в остром периоде ИИ, в том числе в зависимости от течения и исхода инсульта, немногочисленны и противоречивы. Urra X et al. выявили возрастание промежуточных и снижение неклассических моноцитов при отсутствии достоверных изменений в содержании классических моноцитов. В скорректированных моделях плохой исход, повышенная смертность и ранее клиническое ухудшение после инсульта были связаны с увеличением доли классических моноцитов. В то же время содержание CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> клеток (промежуточных моноцитов) находилось в обратной взаимосвязи с летальностью, а количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> клеток (неклассические моноциты) – в обратной зависимости с неблагоприятным исходом и размером зоны инфаркта, что позволило сделать заключение о протективном эффекте промежуточных и неклассических моноцитов в первые сутки ИИ [28,13].

Kaito M. C. et al, обследуя больных на момент поступления, также продемонстрировали возрастание доли промежуточных- и снижение неклассических моноцитов. Однако более высокий уровень CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>

клеток (классических моноцитов) в этом исследовании ассоциировался с прогрессированием зоны инфаркта, особенно при кардиоэмболическом варианте инсульта, а уменьшение количества неклассических моноцитов и более выраженное возрастание классических моноцитов – с последующим развитием инфекционных осложнений [29]. Эти результаты позволили сделать предположение о тканедеструктивном действии промежуточных моноцитов и протективном эффекте неклассических моноцитов в острой фазе инсульта.

В литературе обсуждается несколько возможных причин снижения неклассических моноцитов у больных ИИ. Поскольку высокая экспрессия CD16 связана с активацией моноцитов, более низкое содержание неклассических моноцитов может отражать состояние деактивации моноцитов на фоне воспалительного ответа [13, 150]. Истощение популяции неклассических моноцитов может быть также результатом повышенного уровня кортизола у пациентов с инсультом, поскольку глюкокортикоиды избирательно индуцируют апоптоз CD14-CD16+ [151]. Нельзя исключить и возможность того, что уменьшение неклассических CD14-CD16+ лимфоцитов в периферической крови связано с их миграцией в поврежденные ткани, поскольку они имеют самую высокую экспрессию молекул CD49d, опосредующих диапедез моноцитов [13].

### **1.6.3. Субпопуляции миелоидных супрессорных клеток**

Супрессорные клетки миелоидного происхождения (миелоидные супрессоры, МС) представляют гетерогенную популяцию незрелых миелоидных клеток, которые различаются по фенотипу и функциональной активности и характеризуются способностью ингибировать иммунный ответ [120, 207]. МС в периферической крови человека представлены тремя субпопуляциями – полиморфноядерными или гранулоцитарными МС (Г-МС), моноцитарными МС (М-МС) и МС ранних стадий дифференцировки – (ранние-МС; Р-МС). Все типы МС характеризуются наличием на

поверхности маркеров миелоидных клеток (CD33 и CD11b) и отсутствием или низкой экспрессией HLA-DR. Гранулоцитарные МС экспрессируют маркеры гранулоцитов CD15 или CD66b, тогда как М-МС – несут на поверхности маркер моноцитов - CD14. Исходя из этого, Г-МС имеют фенотип CD11b+CD14–CD15+ или CD11b+CD14–CD66b+, а М-МС – CD11b+CD14+HLA-DR–/loCD15–. Р-МС, составляющие смешанную группу более незрелых предшественников МС, идентифицируются как HLA-DR–CD33+клетки, не несущие линейных маркеров (Lin–), включая CD3, CD14, CD15, CD19, CD56 [152, 153].

МС оказывают ингибирующий эффект как на клетки врожденного, так и приобретенного иммунитета, обладая наиболее выраженным супрессорным действием на Т-лимфоциты. Действие МС реализуется с вовлечением различных механизмов, в частности, обусловлено деплецией L-аргинина (вследствие повышенной экспрессии аргиназы-1 или индуцибельной NO-синтазы), генерацией свободных радикалов кислорода, секрецией противовоспалительных цитокинов (TGF $\beta$  и IL-10) и индукцией Treg [12].

Экспансия МС при патологии обусловлена мобилизацией незрелых миелоидных клеток из костного мозга в циркуляцию под действием колониестимулирующих ростовых факторов (Г-КСФ, М-КСФ, ГМ-КСФ, VEGF) и патологической активацией этих клеток различными цитокинами (IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-4, и IL-6), приводящей к стрессу эндоплазматического ретикулума [120, 154, 154]. Важно отметить, что наряду с цитокинами, индукторами активация МС могут также выступать DAMP (HMGB1), хемокины (CXCL1, CXCL2) и белки острой фазы ( $\alpha$ 2-макроглобулин, сывороточный амилоид) [30, 120]. Кроме того, имеются данные о пластичности нейтрофилов и моноцитов и возможности их трансформации в МС [153].

Возрастание МС в периферической крови описано при многих патологических состояниях, сопровождающихся воспалением – инфекциях

[155], включая сепсис [156, 157], травмах [157], онкогематологических заболеваниях [157] и злокачественных солидных опухолях [158], а также аутоиммунной патологии [159].

Значение МС в патогенезе ишемического поражения головного мозга остается практически неисследованным. Учитывая, что МС обладают сильным иммуносупрессивным действием, можно полагать, что в остром периоде ИИ эти клетки способны подавлять воспаление и оказывать нейропротективный эффект. В модели экспериментального инсульта показано, что после окклюзии мозговой артерии возрастание Г-МС в селезенке наблюдается уже через 24 часа, а в головном мозге через 48-72 часа, причем только в ишемизированном полушарии [32]. Учитывая, что Г-МС морфологически очень схожи с нейтрофилами, можно полагать, что эти клетки присутствуют среди возросшей популяции циркулирующих и инфильтрирующих мозговую ткань нейтрофилов и могут подавлять функции рекрутируемых Т-лимфоцитов, ослабляя нейровоспаление. Одним из наиболее важных факторов, обуславливающих возрастание МС при ИИ, может быть гипоксия, которая активирует продукцию HIF-1 $\beta$  (индуцированный гипоксией фактор) макрофагами и микроглией уже через 3-6 часов после момента окклюзии артерии [160]. Кроме того, МС могут оказывать прямой нейропротективный эффект. Так, например, показано, что М-МС (CD11b+Gr-1+Ly6C+Ly6GF4/80low) через продукцию NGF способствуют росту нейритов из клеток тройничного ганглия, тем самым обеспечивая регенерацию роговичного нерва [161].

По-видимому, нельзя исключить и негативный эффект этих клеток, связанный с подавлением Т-клеточного иммунитета. Так, при сепсисе стойкое повышение Г-МС является сильным независимым предиктором нозокомиальных инфекций и плохого прогноза [31], что свидетельствует о переходе септического процесса в фазу индуцированной иммуносупрессии. С этой точки зрения чрезмерная экспансия МС может являться фактором риска развития инфекционных осложнений. Высокий уровень Г-МС в крови

пациентов в момент поступления в ОРИТ является предиктором смертности в первые 7 сут. Однако, учитывая, процитированные выше данные о протективной роли Treg в отношении развития ранних инфекций после инсульта и способности МС индуцировать генерацию Treg, можно полагать, что в острую фазу иммуносупрессорная активность МС будет направлена прежде всего на подавление воспалительного ответа, что позволит избежать в дальнейшем глубокой иммуносупрессии.

\*\*\*

Представленные выше данные со всей очевидностью свидетельствуют о том, что иммунные реакции, опосредованные клетками врожденного иммунитета, являются ключевыми звеньями патогенеза инсульта и играют двойственную роль. Высвобождающиеся поврежденными клетками молекулы опасности и воспалительные цитокины активируют клетки врожденного иммунитета, которые иницируют и опосредуют локальную и системную воспалительную реакцию. Контролируемая воспалительная реакция направлена на восстановление гомеостаза и запуск процессов репарации. В то же время, гиперергический или пролонгированный воспалительный ответ или же развитие глубокой иммунодепрессии обуславливают осложненное течение постинсультного периода и неблагоприятный исход ИИ. Механизмы, посредством которых иммунные клетки способны оказывать нейродеструктивные и протективные эффекты при ИИ, далеки от полного осмысления. Большинство данных об иммунном ответе на ишемическое повреждение головного мозга получено в моделях окклюзии среднемозговой артерии у грызунов и не может быть прямо экстраполировано на человека в силу существенных различий модели экспериментального ишемического инсульта и ишемического инсульта у человека. При этом данные литературы о роли отдельных субпопуляций иммунных клеток в остром периоде ИИ у человека немногочисленны и порой противоречивы. Тем не менее, участие клеток врожденного и адаптивного иммунитета в регуляции воспалительной реакции, противoinфекционной



защите и процессах репарации свидетельствует не только о патогенетической роли иммунных клеток, но и их значимости в качестве потенциальных биомаркеров. В этом аспекте большой интерес представляют лимфоидные и миелоидные клетки, способные регулировать воспалительный ответ. К таковым можно отнести CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты с регуляторной активностью, а также субпопуляции моноцитов и миелоидных супрессорных клеток. Оценка этих клеток в остром периоде ИИ у пациентов с различной тяжестью, характером течения и исходом ишемического поражения головного мозга представляется перспективным направлением, как в плане выявления новых прогностических биомаркеров, так и новых мишеней терапевтических воздействий.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Характеристика больных, включенных в исследование**

Работа выполнена в соответствии с принципами Хельсинской декларации о проведении исследований у людей и животных. Протоколы и методы исследования утверждены этическим комитетом НИИФКИ, Новосибирск, Россия (протокол №127). В исследование рекрутировали женщин и мужчин, находившихся на лечении во 2-ом неврологическом отделении ГБУЗ НСО «ГКБ №1» в период с 2015 по 2017 гг. с диагнозом «острое нарушение мозгового кровообращения». Критериями включения в исследование были 1) возраст от 40 до 80 лет; 2) наличие впервые возникшего ишемического инсульта в бассейне средней мозговой артерии, верифицированного в соответствии с критериями МКБ-10 методами нейровизуализации (КТ/МРТ); 3) острый период (первые 24-48 час после инсульта); 4) атеротромботический или кардиоэмболический подтип ИИ определенный на основании критериев TOAST; 5) тяжесть неврологического дефицита  $\geq 5$  баллов по шкале NIHSS; 6) наличие полной функциональной независимости до развития инсульта (0-1 балл по шкале Рэнкина); 7) подписанное пациентом (или его представителем) добровольное согласие на

участие в исследовании. Критериями исключения являлись 1) отказ пациента (или его законного представителя) от участия в исследовании; 2) наличие у пациента острого воспалительного, инфекционного, нейродегенеративного, аутоиммунного заболевания, 3) наличие выраженной почечной или печеночной недостаточности, сахарного диабета в тяжелой форме, 4) наличие повторного ОНМК, 5) наличие в анамнезе острого инфаркта миокарда, опухолевого процесса, черепно-мозговой травмы, операции на сердце и сосудах шеи, 6) прием препаратов иммуносупрессорного действия в течение 12 мес. до получения образцов крови.

Обследование пациентов проводили в первые 24-48 часа от начала заболевания – определялся балл тяжести инсульта по шкале инсульта национальных институтов здоровья США (NIHSS; Brott T., Adams H.P., 1989) и уровень функциональной независимости по модифицированной 6-балльной шкале степени инвалидизации Рэнкина (mRs). Через 3 мес. оценивался функциональный исход по модифицированной 6-балльной шкале Рэнкина (mRS). Пациенты с уровнем 3-х и менее баллов по mRs (что соответствует умеренной инвалидизации, когда пациент может самостоятельно ходить) были отнесены в группу с благоприятным исходом, а с уровнем более 3-х баллов (включающих грубую инвалидизацию, летальный исход или вегетативный статус) – в группу с неблагоприятным исходом. Развитие инфекций в течение 28 дней диагностировали по модифицированным критериям американских центров по контролю и профилактики заболеваний (CDC). Пневмония верифицировалась при наличии патологической аускультативной картины или легочных инфильтратов на рентгенограммах грудной клетки вместе с наличием одного из следующих двух критериев: продуктивный кашель с гнойной мокротой и положительными бактериологическими посевами из нижних дыхательных путей или положительные бактериологические посевы крови вместе с лейкоцитозом и повышением уровня С-реактивного белка (СРБ). Диагноз инфекции мочевыводящих путей выставлялся на основании двух из следующих

критериев: лихорадка ( $38,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), лейкоцитурия и значительная бактериурия (Harms et al., 2008 [209]). Патогенетический вариант инсульта в соответствии с критериями TOAST устанавливали на основании данных клинической картины, результатов КТ/МРТ, ультразвуковых методов исследования (УЗИ брахиоцефальных артерий и сердца), ЭКГ.

У всех пациентов оценивали следующие факторы риска ИИ: артериальную гипертензию ( $\text{АД} > 140/90\text{ мм.рт.ст.}$ ), гиперхолестеринемию (общий холестерин  $> 5,2\text{ ммоль/л}$  или прием гиполипидемических препаратов), сахарный диабет (тощаковая гипергликемия  $\geq 7\text{ ммоль/л}$ , гликированный  $\text{Hb} \geq 6,5\%$  или прием сахароснижающего препарата), мерцательная аритмия, курение, употребление алкоголя.

Контролем служили 36 сопоставимых по полу и возрасту доноров, включая 24 мужчин и 12 женщин, в возрасте от 39 до 72 лет.

### **Иммунологические исследования**

Иммунологическое обследование пациентов также проводили в первые 24-48 часов от начала заболевания. О выраженности системной воспалительной реакции судили по концентрации СРБ и показателям крови (лейкоцитоз, СОЭ, нейтрофильно-лимфоцитарный индекс). Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли стандартно центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. Относительное содержание различных субпопуляций клеток среди свежевыделенных МНК исследовали методом проточной цитофлюориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson, США) с использованием соответствующих моноклональных антител (BD PharMingen, NJ, USA).

Т-клетки с фенотипом Т-хелперов 1-го типа и Т-регуляторных клеток оценивали методом проточной цитофлюориметрии по числу  $\text{CD4+IFN-}\gamma^+$  и  $\text{CD4+CD25}^{\text{hi}}$  Т-лимфоцитов, 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). Оценку клеток проводили с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флюоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP), (BD FACSCalibur, CellQuest Software, США). Относительное содержание CD4+CD25<sup>hi</sup> и CD4+IFN- $\gamma$ + Т-клеток представлено в виде процента от количества лимфоцитов.

Относительное содержание классических (CD14++CD16-), промежуточных (CD14++CD16+) и альтернативных (CD14+CD16++) моноцитов оценивали в популяции МНК методом проточной цитофлюориметрии с использованием FITS- и PE-меченых моноклональных анти-CD14 и анти-CD16 антител, соответственно (BD PharMingen, США).

Миелоидные супрессорные клетки (МС) оценивали по содержанию ранних (lin-HLA-DR-CD33+CD66-), гранулоцитарных (lin-HLA-DR-CD33+CD66+) и моноцитарных (HLA-DR-CD14+) 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») моноклональные антитела в соответствии с рекомендациями Bronte с соавт. [153].

Статистическая обработка данных производилась с использованием программы Statistica 6.0 и Graph Pad Prism 9.0. Данные представлены в виде значения 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 ( $r_s$ ). 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  $p < 0,05$ .

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **3.1 Оценка параметров системного воспалительного ответа в остром периоде ишемического инсульта у больных с различной тяжестью и исходами заболевания**

#### ***3.1.1. Характеристика больных***

Исследуемая группа включала 61 пациента, в том числе 32 мужчин и 29 женщин в возрасте от 40 до 80 лет. Все пациенты имели ишемический инсульт в бассейне внутренней сонной артерии, подтвержденный данными КТ/МРТ. Из общего числа пациентов у 36 (59%) наблюдалась левополушарная, у 25 (41%) – правополушарная локализация инсульта. В соответствии с критериями TOAST в 54,1% случаев предполагался атеротромботический, а в 32,8 % случаях кардиоэмболический вариант ИИ. В 8 (13,1%) случаях этиология инсульта оставалась неуточненной (табл. 1). Анализ факторов риска и сопутствующих заболеваний показал, что артериальная гипертензия выявлялась у всех (100%) пациентов, мерцательная аритмия – у 42,6%, сахарный диабет – у 23%, гиперхолестеринемия у 46% больных. Курение и злоупотребление алкоголем выявлялось, соответственно, в 29,5% и 9,8% случаев. В неврологическом статусе у всех больных выявлены различной степени двигательные нарушения (контралатеральные гемипарезы или монопарезы), нарушения чувствительности, центральные парезы лицевого и подъязычного нервов, а также нарушения речи в виде афазии и дизартрии.

Таблица 1 Характеристика больных включенных в исследование

Показатель	
N (%)	61
Возраст (годы); Me (min-max)	68 (40-80)
Пол (мужчины); n (%)	32 (52,4)
Артериальная гипертензия; n (%)	61 (100,0)
Мерцательная аритмия; n (%)	26(42,6)
Курение; n (%)	18(29,5)
Употребление алкоголя; n (%)	6(9,8)
Сахарный диабет; n (%)	14 (23)
Гиперхолестеринемия; n (%)	28 (46)
Общий холестерин; Me (LQ-UQ), (ммоль/л)	5,3 (4,4-6,05)
Триглицериды; Me (LQ-UQ), (ммоль/л)	1,27 (0,97-1,87)
ЛПВП; Me (LQ-UQ), (ммоль/л)	1,28 (0,87-1,96)
ЛПНП; Me (LQ-UQ), (ммоль/л)	2,87 (2,45-3,57)
Индекс атерогенности, (усл.ед.)	2,3 (1,6-3,9)
ПТИ; Me (LQ-UQ), (%)	93,0 (86,2-98,2)
АПТВ; Me (LQ-UQ), (сек.)	31,0 (28,7-34,9)
МНО; Me (LQ-UQ), (усл.ед.)	1,07 (1,0-1,17)
<b>Локализация инсульта:</b>	
Левополушарный	36 (59)
Правополушарный	25 (41)
<b>Подтип ИИ; n (%)</b>	
Атеротромботический	33 (54,1)
Кардиоэмболический	20 (32,8)
Неуточненной этиологии	8 (13,1)

Примечание: ЛПВП, липопротеиды высокой плотности; ЛПНП, липопротеиды низкой плотности; ПТИ, протромбиновый индекс; АПТВ, активированное парциальное тромбопластиновое время; МНО, международное нормализованное отношение. Данные представлены в виде медианы (Me), интерквартильного диапазона, (LQ-UQ) или минимума-максимума (min-max) и частоты встречаемости (%).

Анализ распределения больных по степени тяжести (табл. 2) показал, что ИИ легкой степени 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.

Таблица 2 – Характеристика больных по степени тяжести

Параметры	Общая группа	Степень тяжести		
		Легкая (NIHSS≤7)	Средняя (NIHSS 8-12)	Тяжелая (NIHSS >12)
Количество пациентов	61	16	15	30
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)
NIHSS Me (min-max)	12 (7-17)	6 (5-7)	11 (9-11)	17 (15-20)

Примечание: данные представлены в виде медианы и диапазона минимума-максимума (Me; min-max), а также частоты встречаемости (%).

### **3.1.2 Системный воспалительный ответ в зависимости от тяжести и патогенетического варианта ИИ**

В качестве параметров системного воспалительного ответа оценивали абсолютное количество лейкоцитов, нейтрофильно-лимфоцитарный индекс (НЛИ) и концентрацию СРБ в сыворотке крови. Как видно из данных таблицы 3, больные в остром периоде ИИ характеризовались достоверным возрастанием абсолютного количества лейкоцитов, НЛИ и СРБ, что свидетельствовало о наличии системного воспаления. Для анализа взаимосвязи тяжести инсульта с выраженностью

воспалительного ответа, параметры воспаления оценили отдельно в группах с ИИ легкой, средней и тяжелой степени тяжести. Степень тяжести инсульта при NIHSS  $\leq 7$  оценивалась как легкая, при значениях 8-12 – как средняя степени и при NIHSS  $>12$  как тяжелая степени.

Таблица 3 Параметры воспалительного ответа у пациентов с ишемическим инсультом различной степени тяжести

Параметры (Ме; LQ-UQ)	Доноры	Больные	Степень тяжести		
			Легкая (NIHSS $\leq 7$ )	Средняя (NIHSS 8-12)	Тяжелая (NIHSS $>12$ )
Лейкоциты ( $\times 10^9/\text{л}$ )	6,1 (5,2-6,7)	9,4 (8,1-11,9) *	8,5 (5,8-10,1)*	9,0 (7,2-11,2)*	9,8 (8,6-13,8)*#
НЛИ	1,87 (1,4-2,9)	5,0 (3,0-7,9)*	3,7 (2,3-5,8)*	4,6 (2,5-9,7)*	8,5 (4,2-10,1)*#
СРБ (мг/л)	2,1 (1,7-4,7)	30,3 (16,7-69,0)*	17,6 (11,0-30,9)*	19,4 (6,0-59,1)*	41,7 (21,1-103,8)*#

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

# достоверность различий с больными легкой степени тяжести;  $p < 0,05$ .

Достоверное возрастание показателей воспаления регистрировалось уже у больных с легкой степенью тяжести ИИ и нарастало по мере увеличения тяжести. Так, показатели лейкоцитоза, НЛИ и СРБ при тяжелом инсульте были достоверно выше, чем при инсульте легкой степени тяжести.

Взаимосвязь между тяжестью инсульта и системным воспалительным ответом подтверждалась также наличием умеренных, но достоверных прямых корреляционных связей между абсолютным количеством лейкоцитов, НЛИ, СРБ и баллом тяжести инсульта по шкале NIHSS (табл. 4).



Таблица 4 – Корреляционная связь между тяжестью инсульта (NIHSS) и параметрами воспалительного ответа в общей группе пациентов с ИИ

Параметры	NIHSS, (n=61)
Количество лейкоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ )	R=0,36; p=0,0047
НЛИ	R=0,37; p=0,0033
СРБ (мг/л)	R=0,36; p=0,0047

Примечание: R- коэффициент корреляции по Спирмену; p-достоверность различий.

Следует отметить, что анализируемые пациенты имели в большинстве случаев либо атеротромботический либо кардиоэмболический подтип ИИ. Сравнение этих групп показало, что несмотря на тенденцию к более высокому уровню СРБ у пациентов с кардиоэмболическим вариантом ИИ, достоверных различий по тяжести инсульта и другим параметрам системного воспалительного ответа (количество лейкоцитов, НЛИ) в сравниваемых группах не выявлялось (табл.5). Поэтому в дальнейшем пациенты с различными патогенетическими подтипами ИИ анализировались совместно.

Таблица 5 – Показатели тяжести и системного воспалительного ответа у пациентов с различными патогенетическими вариантами ИИ

Параметры (Me; LQ-UQ)	Атеротромботический вариант ИИ (n=33)	Кардиоэмболический вариант ИИ (n=20)	$p_U$
NIHSS	11 (7-16)	13 (9,5-15,5)	0,53
Лейкоциты ( $\times 10^9/\text{л}$ )	9,2 (7,2-12,1)	9,4 (8,6-10,4)	0,64
НЛИ	4,2 (2,2-6,8)	4,1 (2,7-7,0)	0,94
СРБ (мг/л)	24,2 (10,8-69,0)	30,3 (19,5-90,0)	0,12

Примечание:  $p_U$  – достоверность между группами.

### 3.1.3. Системный воспалительный ответ при различных вариантах течения и исхода ИИ

При анализе характера клинического течения и исхода инсульта (табл. 6) инфекционные осложнения развились у 32,8% пациентов, причем в половине случаев они заканчивались летальным исходом. Неблагоприятный исход на период 3 мес. регистрировался у 36,0%.

Таблица 6 - Инфекционные осложнения и исходы у пациентов с различной степенью тяжести ишемического инсульта

Параметры M±m	Общая группа	Степень тяжести ИИ			
		Легкая (NIHSS≤7)	Средняя (NIHSS 8-12)	Тяжелая (NIHSS >12)	Средняя + тяжелая (NIHSS >7)
Количество пациентов; n	61	16	15	30	45
Инфекционные осложнения; n (%)	20 (32,8)	1 (6,25)	5 (33,3)	14 (46,7)	19 (42,2)
28-суточная летальность; n (%)	11 (18,0)	0 (0)	3 (20)	8 (26,6)	11 (24,4)
Неблагоприятный исход; n (%)	22 (36,0)	1 (6,25)	5 (33,3)	16 (53,3)	21 (46,7)

Примечание: данные представлены в виде частоты встречаемости (%).

Важно отметить, что летальные исходы, инфекционные осложнения и неблагоприятные исходы регистрировались (за исключением одного случая) только в группах пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести. Поэтому дальнейший анализ патогенетической и прогностической значимости клеток с регуляторной активностью проводился в объединенной группе пациентов с NIHSS ≥8. Инфекционные осложнения в этой группе отмечались у 42,2 %, а неблагоприятные исходы – у 46,7% больных.

Анализ показателей воспаления у больных ИИ со средней и тяжелой степенью тяжести ИИ в группах, оппозитных по развитию инфекционных осложнений, показал (табл. 7), что пациенты с развивающимися впоследствии инфекционными осложнениями характеризовались в остром периоде достоверно более высокими показателями СРБ, НЛИ и лейкоцитоза. Аналогичным образом, при анализе групп, оппозитных по 3-месячному исходу, показатели системного воспаления в остром периоде у пациентов с неблагоприятным исходом достоверно превышали таковые в группе с благоприятным исходом.

Таблица 7 – Показатели системного воспаления у пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести, оппозитных по развитию инфекционных осложнений и 3-месячным исходам

Параметр	Инфекция (+)	Инфекция (-)	pU	Неблагоприятный исход	Благоприятный исход	pU
Лейкоциты (x10 <sup>9</sup> /л)	11,9 (8,9-15,5)*	9,2 (7,5-10,4)*	<b>0,019</b>	12,4 (9,3-15,3)*	8,9 (8,1-10,4)*	<b>0,014</b>
НЛИ	9,2 (4,9-14,9)*	4,7 (2,5-7,2)*	<b>0,008</b>	7,5 (4,9-13,4)*	4,9 (2,6-7,2)*	<b>0,02</b>
СРБ (мг/л)	64,6 (36,1-68,1)*	21,2 (11,1-59,1)*	<b>0,003</b>	63,3 (39,1-87,7)*	21,1 (11,1-42,0)*	<b>0,01</b>
NIHSS	17,0 (12,0-0,00)	14,0 (11,0-17,0)	0,12	17,0 (13,0-21,0)	13,0 (11,0-16,0)	<b>0,01</b>

Примечание: данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона, \* достоверность различий по сравнению с донорами, pU – достоверность различий в оппозитных группах; U-критерий Манна-Уитни.

Следует отметить, что, хотя оппозитные по исходам группы значимо различались по баллу тяжести, степень различий по NIHSS была намного менее выраженной, чем выраженность различий в показателях воспаления. При этом различия по NIHSS в группах пациентов с наличием и отсутствием инфекционных осложнений были недостоверны.

Анализ параметров системного воспаления в зависимости от развития инфекционных осложнений и исходов был также проведен отдельно в группах со средней тяжестью ИИ и тяжелым ИИ. Как видно из данных таблицы 8, у пациентов со средней тяжестью ИИ достоверные различия в группах, оппозитных по инфекционным осложнениям, выявлялись только в отношении НЛИ, который был выше у пациентов с инфекцией.

Таблица 8 – Показатели системного воспаления у пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести, оппозитных по развитию инфекционных осложнений и 3-х месячным исходам

Параметр	Инфекция (+)	Инфекция (-)	p	Неблагоприятный исход	Благоприятный исход	p
ИИ средней степени тяжести						
Лейкоциты ( $\times 10^9/\text{л}$ )	9,6 (8,4-11,9)	8,8 (7,2-10,4)	0,5	9,6 (6,9-11,9)	8,8 (7,2-10,4)	0,76
НЛИ	9,7 (5,5-15,4)	3,2 (2,3-6,3)	<b>0,05</b>	5,5 (3,3-9,8)	3,2 (2,3-6,3)	0,71
СРБ (мг/л)	58,4 (56,7-64,6)	17,3 (6,0-21,3)	0,18	59,1 (58,4-64,4)	17,3 (6,0-21,3)	0,11
NIHSS	11,0 (9,0-11,0)	11,0 (9,0-11,0)	1,0	11,0 (11,0-12,0)	10,5 (9,0-11,0)	0,2
ИИ тяжелой степени тяжести						
Лейкоциты ( $\times 10^9/\text{л}$ )	12,5 (9,3-16,1)	9,4 (7,85-11,5)	<b>0,03</b>	13,0 (6,1-14,8)	8,9 (8,3-9,4)	<b>0,02</b>
НЛИ	8,1 (4,9-13,4)	5,1 (3,4-7,3)	0,1	8,3 (5,4-14,2)	5,0 (2,7-7,0)	<b>0,02</b>
СРБ (мг/л)	82 (36,1-173)	36,4 (12,4-66,2)	<b>0,017</b>	66,2 (34,7-151)	33,6 (17,8-42,0)	0,1
NIHSS	18,0 (16,0-22,0)	16,0 (14,0-19,0)	0,1	19,5 (16,5-22,0)	16,0 (15,0-17,0)	<b>0,03</b>

Примечание: рU – достоверность различий в оппозитных группах; U-критерий Манна-Уитни. p – достоверность между группами

Различия в группах пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом были наиболее выраженными в отношении СРБ, однако и в этом случае проявлялись в виде тренда. При этом оппозитные по инфекции и исходам группы больных не различались по баллу тяжести NIHSS.

При тяжелом ИИ группы пациентов с наличием и отсутствием инфекционных осложнений значимо различались по уровню лейкоцитоза и еще в большей степени по уровню СРБ, при отсутствии различий по баллу NIHSS. В свою очередь, группы с благоприятным и неблагоприятным исходом достоверно различались по уровню лейкоцитоза и НЛИ, а также по баллу NIHSS.

Таким образом, выраженность системной воспалительной реакции у пациентов с ИИ в первые 24-48 час ассоциирована с тяжестью инсульта, а также с характером последующего клинического течения в постинсультном периоде, в частности, развитием инфекционных осложнений и эффективностью неврологического восстановления. При этом показатели системного воспаления более тесно ассоциированы с течением и исходом ИИ, чем балл по NIHSS, что наиболее ярко проявляется в отношении развития инфекционных осложнений.

### **3.2 Субпопуляции иммунных клеток с регуляторной активностью у больных ИИ в остром периоде и их взаимосвязь с тяжестью и системным воспалительным ответом**

#### ***3.2.1. Субпопуляции Т-клеток с регуляторной активностью***

Сравнительная оценка (табл. 9) относительного содержания Т-клеток с иммунорегуляторной активностью у больных ИИ и доноров выявила значимое возрастание в периферической крови доли CD4+CD25+ Т-лимфоцитов, в том числе двукратное увеличение CD4+ Т-клеток с высокой экспрессией CD25 (CD4+CD25<sup>hi</sup>), и выраженное снижение CD4 Т-клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$  (CD4+IFN $\gamma$ +). Соответственно, индекс соотношения клеток с фенотипом T $\gamma$ 1 и Treg (CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25<sup>hi</sup>) у больных был снижен практически в 8 раз.

Таблица 9 – Т регуляторные клетки в периферической крови в остром периоде ИИ

Исследуемые параметры Me (LQ-UQ)	Доноры (n=20)	Больные ИИ (n=61)
CD4+CD25 <sup>hi</sup> (%)	1,0 (1,0-1,2)	2,0 (1,1-3,0) *
CD4+CD25 <sup>hi</sup> x10 <sup>6</sup> /л	0,018 (0,01-0,03)	0,027 (0,014-0,041), p=0,06
CD4+IFN $\gamma$ +(%)	15,1 (4,3-29,0)	3,1 (0,9-6,8) *
CD4+IFN $\gamma$ + x10 <sup>6</sup> /л	0,22 (0,06-0,48)	0,038 (0,014-0,087) *
CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25 <sup>hi</sup>	11,8 (4,3-24,2)	1,5 (0,5-4,1) *

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

При сравнении относительного содержания CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> Т-клеток и их соотношения в группах пациентов с различной тяжестью ИИ (табл. 10) достоверных различий между группами пациентов с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести не выявлялось.

Таблица 10 – Показатели воспаления и уровень CD4+IFN $\gamma$  и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> Т-клеток у пациентов с различной тяжестью инсульта

Параметры	Доноры (n=20)	Степень тяжести инсульта		
		Легкая (NIHSS $\leq$ 7) n=16	Средняя (NIHSS 8-12) n=15	Тяжелая (NIHSS >12) n=30
CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (%)	15,1 (4,3-29,0)	2,9 * (1,5-5,4)	3,1 * (0,9-6,8)	3,1 * (0,9-5,8)
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> (%)	1,0 (1,0-1,2)	1,8 * (1,6-3,0)	2,0 * (1,3-3,0)	2,0 * (1,0-3,0)
Индекс CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ + / CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup>	11,8 (4,3-24,2)	1,4 * (0,85-3,2)	1,2 * (0,7-2,3)	1,6 * (0,5-6,5)

Примечание: данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); \* P<sub>U</sub><0,05 – достоверность различий с донорами; (U-критерий Манна-Уитни).

Снижение доли CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток и возрастание относительного содержания CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, обуславливающее выраженное снижение индекса CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25<sup>hi</sup>, наблюдалось во всех трех анализируемых группах с одинаковой выраженностью.

Анализ взаимосвязи субпопуляций CD4+ Т-клеток к с выраженностью воспалительной реакции показал, что абсолютное количество CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток обратно коррелировало с концентрацией СРБ и НЛИ. В то же время содержание CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток и индекс их соотношения с CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клетками находились в прямой корреляционной связи с уровнем СРБ. Взаимосвязь этих параметров с НЛИ выявлялась только для относительного количества CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток (табл.11).

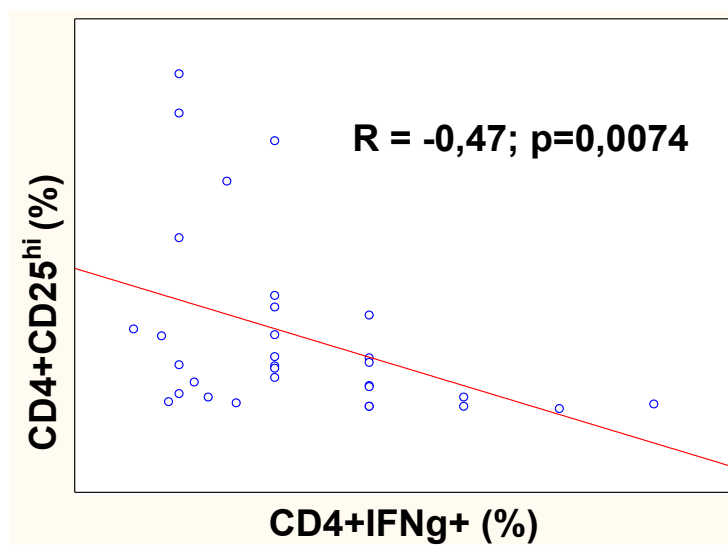
Таблица 11 – Корреляционная взаимосвязь Т-клеток с регуляторной активностью и параметрами воспаления у пациентов с ИИ

Параметр	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>6</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	<b>R=0,36</b> ; p= 0,047
CD4+IFN $\gamma$ + (x 10 <sup>6</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; p - достоверность различий.

В группе пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести (NIHSS  $\geq$ 8) выявленные корреляционные связи сохранялись и были еще более

выраженными. Более того, в этой группе между содержанием клеток с фенотипом Treg и Th1 выявлялась обратная взаимосвязь (Рис.1).



**Рисунок 1** Корреляционная взаимосвязь между относительным количеством CD4+CD25<sup>hi</sup> и CD4+IFNγ+ T-клеток

Таким образом, интенсивность системного воспалительного ответа у больных с ИИ коррелировала с количественным содержанием Т-клеток с фенотипом Treg, Th1 и их соотношением. В частности, более выраженная воспалительная реакция ассоциировалась с меньшим абсолютным количеством CD4+CD25<sup>hi</sup> клеток и большей долей CD4+IFNγ+ клеток, а также индексом CD4+IFNγ+/ CD4+CD25<sup>hi</sup>.

### 3.2.2 Субпопуляции моноцитов

Наряду с субпопуляциями Т-клеток мы также оценили в циркуляции абсолютное количество моноцитов, лимфоцитарно-моноцитарный индекс, относительное количество различных субпопуляций моноцитов и их соотношение (табл. 12). В целом по группе (n=41) у пациентов отмечалась тенденция к более высокому абсолютному содержанию моноцитов и достоверное снижение индекса соотношения лимфоцитов и моноцитов. Кроме того, регистрировалось изменение структуры циркулирующего пула



моноцитов. Так, оценка классических (CD14++CD16-), промежуточных (CD14++CD16+) и альтернативных (CD14+CD16++) моноцитов выявила значимое снижение доли классических моноцитов, и возрастание промежуточных и неклассических моноцитов. Соответственно, соотношение классических моноцитов, не несущих CD16, и CD16-экспрессирующих моноцитов (промежуточные и неклассические моноциты) снижалось в два раза. Изменений в соотношении промежуточных и неклассических моноцитов не отмечалось.

Таблица 12 – Моноциты и их субпопуляции в периферической крови больных ИИ

Исследуемые параметры, Me (LQ-UQ)	Доноры n=22	Больные ИИ n=41	P <sub>U</sub>
Моноциты (Мн) x10 <sup>6</sup> /Л	0,475 (0,408-0,590)	0,527 (0,412-0,780)	0,3
Лимфоцитарно- моноцитарный индекс	4,64 (2,87-5,73)	2,84 (1,87-4,76)	<b>0,023</b>
Классические Мн CD14++CD16- (%)	89,5 (86,0-92,0)	83,0 (76,0-87,0)	0,0033
Промежуточные Мн CD14++CD16+ (%)	3,0 (2,0-5,0)	8,0 (5,0-12,0)	0,000023
Неклассические Мн CD14+CD16++ %	2,0 (1,0-3,0)	4,0 (2,0-8,0)	0,004
Общее содержание CD16+ Мн (%)	5,3 (4,0-7,0)	12,0 (9,0-17,0)	0,000001
Индекс CD16-Мн/ CD16+Мн	15,8 (12,4-23,5)	6,9 (4,18-9,44)	0,000001
Индекс промежуточные Мн/ неклассические Мн	2,0 (1,0-3,3)	2,0 (1,0-4,0)	0,5

Примечание: P- достоверность различий с донорами; U- критерий Манна-Уитни.

При анализе взаимосвязи исследуемых параметров с тяжестью инсульта (табл.13) снижение лимфоцитарно-моноцитарного индекса было

наибольшим и достигало статистической значимости только при тяжелом ИИ. Изменения в структуре субпопуляций моноцитов, т.е. снижение классических и возрастание промежуточных и альтернативных моноцитов, было характерно как для пациентов с легкой и умеренной степенью тяжести, так и группы с тяжелым инсультом. Аналогичным образом, снижение соотношения между классическими моноцитами и популяцией (промежуточные + неклассические моноциты) отмечалось у пациентов с легкой, умеренной и тяжелой степенью тяжести.

Таблица 13 – Моноциты и их субпопуляции в периферической крови больных ИИ

Исследуемые параметры, Me (LQ-UQ)	Доноры n=22	ИИ легкой степени тяжести n=10	ИИ средней степени тяжести n=10	ИИ тяжелой степени тяжести n=21
Моноциты (Мн) $\times 10^6/\text{л}$	0,475 (0,41-0,59)	0,510 (0,338-0,683)	0,587 (0,447-0,779)	0,539 (0,419-0,826)
Лимфоцитарно-моноцитарный индекс	4,6 (2,87-5,73)	3,0 (1,50-5,87)	2,8 (1,75-5,40)	2,7 (2,12-4,29)*
Классические Мн CD14++CD16- (%)	89,5 (86,0-92,0)	82,0 (74,0-84,0)**	82,0 (79,0-87,0)*	84,0 (77,0-88,0)**
Промежуточные Мн CD14++CD16+ (%)	3,0 (2,0-5,0)	11,0 (6,0-16,0)**	7,5 (4,0-9,0)**	8,0 (5,0-10,0)**
Неклассические Мн CD14+CD16++ %	2,0 (1,0-3,0)	5,0 (3,0-9,0)**	4,0 (2,0-6,0)*	4,0 (2,0-7,0)**
Общее содержание CD16+ Мн (%)	5,3 (4,0-7,0)	15,0 (12,0-23,0)**	12,0 (6,0-17,0)**	12,0 (9,0-16,0)**
Индекс CD16-Мн/CD16+Мн	15,8 (12,4-23,5)	5,3 (3,3-7,1)**	7,3 (4,6-13,5)**	7,1 (4, 8-9,5)**
Индекс промежуточные Мн/неклассические Мн	2,0 (1,0-3,3)	1,64 (0,75-3,4)	1,25 (0,73-4,2)	2,5 (1,8-3,8)

Примечание: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  – достоверность различий с донорами; U – критерий Манна-Уитни.

Корреляционный анализ не выявил каких-либо значимых взаимосвязей между баллом тяжести инсульта NIHSS и содержанием

моноцитов и их субпопуляций. Учитывая важную роль воспаления в патогенезе ИИ, представлялось также важным выяснить – насколько изменения в моноцитарном звене связаны с выраженностью воспалительной реакции. Как видно из данных таблицы 14, в общей группе пациентов концентрация СРБ достоверно коррелировала только с лимфоцитарно-моноцитарным индексом. Между этими показателями выявлялась обратная корреляционная зависимость. В то же время у пациентов со среднетяжелым и тяжелым ИИ уровень СРБ находился в прямой взаимосвязи с долей CD16 экспрессирующих моноцитов и обратной зависимости с лимфоцитарно-моноцитарным индексом, относительным количеством классических моноцитов и соотношением CD16 негативных и позитивных моноцитов.

Таблица 14 – Взаимосвязь субпопуляций моноцитов и их субпопуляций с уровнем СРБ у больных ИИ

Параметры	Общая группа (n=41)	ИИ средней и тяжелой степени тяжести (n=31)
Моноциты (Мн) $\times 10^6/\text{л}$	R= 0,18; p=0,25	R= 0,2; p= 0,27
Лимфоцитарно-моноцитарный индекс	<b>R= - 0,36; p=0,026</b>	<b>R= - 0,38; p= 0,036</b>
Классические Мн CD14++CD16- (%)	R= - 0,27; p=0,08	<b>R= -0,39; p= 0,03</b>
Промежуточные Мн CD14++CD16+ (%)	R= 0,09; p=0,5	R= 0,25; p=0,18
Неклассические Мн CD14+CD16++ %	R= 0,17; p=0,28	R= 0,21; p=0,25
Общее содержание CD16+ Мн (%)	R= 0,26; p=0,09	<b>R= 0,36; p=0,04</b>
Индекс CD16-Мн/ CD16+Мн	R= - 0,27; p=0,08	<b>R= - 0,38; p=0,035</b>
Индекс промежуточные Мн/ неклассические Мн	R= - 0,003; p=0,98	R= - 0,04; p=0,99

Примечание: Rs- коэффициент корреляции по Спирмену, p - достоверность корреляционной связи.

Таким образом, более выраженная системная воспалительная реакция ассоциировалась с возрастанием доли моноцитов (и, соответственно, меньшим лимфоцитарно-моноцитарным индексом), а также увеличением

промежуточных и неклассических моноцитов на фоне снижения классических моноцитов.

### 3.2.3. Субпопуляции миелоидных супрессорных клеток

Следующим этапом стала оценка в периферической крови различных субпопуляций МС. Относительное количество всех трех субпопуляций МС, включая ранние предшественники (Lin-DR-D33+), гранулоцитарные (Lin-DR-CD33+CD66+) и моноцитарные (CD14+DR-) МС было достоверно повышено, в частности, более чем 2-кратно превышало значения соответствующих показателей в периферической крови здоровых доноров (табл. 15).

Таблица 15 – Миелоидные супрессорные клетки в периферической крови больных ИИ

Субпопуляции МС (%); Me (LQ-UQ)	Доноры (n=20-23)	Больные ИИ (n=35-61)	Pu
Lin-	9,4 (6,6-11,7) n=23	13,0 (9,0-20,0) n=59	0,005
DR-CD33+ от Lin-	6,0 (3,0-7,0) n=23	12,0 (7,0-18,0) n=61	0,000001
Lin- DR-D33+ от МНК (P-MC)	0,5 (0,29-0,6) n=23	1,5 (1,04-2,16) n=23	0,000001
DR-D33+CD66+ от Lin-	0,57 (0,43-1,2) n=20	2,7 (1,12-4,65) n=40	0,01
Lin-DR-D33+CD66+ от МНК (Г-MC)	0,056 (0,034-0,075) n=20	0,33 (0,15-0,95) n=39	0,000001
CD14+DR- от МНК (M-MC)	2,0 (1,0-3,0) n=20	3,0 (2,0-5,0) n=47	0,0046

Примечание: Pu – достоверность различий с донорами; U –критерий Манна-Уитни; P-MC, Г-MC и M-MC представлены в виде процентного содержания от МНК.

Увеличение ранних МС было обусловлено как за счет возрастания относительного содержания Lin- клеток, так и повышения среди них субпопуляции CD33+HLA-DR-клеток. Аналогичным образом, увеличение Г-МС было связано как с возрастанием численности Lin- клеток, так и содержания среди них МС, экспрессирующих гранулоцитарный маркер CD66 (CD33+HLA-DR-CD66+клеток). Относительное содержание моноцитарных МС было повышено за счет увеличением доли HLA-DR-клеток в популяции CD14+ моноцитов.

Сравнение показателей МС у пациентов с различной тяжестью не выявило достоверных различий между анализируемыми группами (табл. 16).

Таблица 16 – Субпопуляции МС в периферической крови больных ИИ с различной тяжестью

Исследуемые параметры, Me (LQ-UQ)	Доноры n=20  (1)	ИИ легкой степени тяжести n=10-16 (2)	ИИ средней степени тяжести n=9-15 (3)	ИИ тяжелой степени тяжести n=20-28 (4)	Р
Р-МС Lin-DR-33+	0,5 (0,29-0,6) n=20	1,82 (1,11-2,31) n=16	1,89 (0,70-2,79) n=15	1,39 (1,06-1,71) n=28	P <sub>1-2</sub> =0,00003 P <sub>1-3</sub> =0,0017 P <sub>1-4</sub> =0,000002
М-МС CD14+DR-	2,0 (1,0-3,0) n=20	2,0 (2,0-3,0) n=13	3,0 (2,0-5,0) n=11	3,0 (2,0-5,0) n=23	P <sub>1-2</sub> =0,09 P <sub>1-3</sub> =0,027 P <sub>1-4</sub> =0,009
Г-МС Lin-HLA-DR- CD33+CD66+	0,058 (0,034-0,01) n=20	0,52 (0,27-1,06) n=10	0,32 (0,22-,070) n=9	0,27 (0,13-,053) n=20	P <sub>1-2</sub> =0,0013 P <sub>1-3</sub> =0,0013 P <sub>1-4</sub> =0,026

Примечание: р – достоверность различий с донорами; U- критерий Манна-Уитни.

Тем не менее, отмечалось несколько особенностей. Так, возрастание Р-МС в группах с ИИ легкой и средней степени тяжести было более выраженным, чем у пациентов с тяжелым ИИ. Возрастание Г-МС было также наибольшим у пациентов с ИИ легкой степени тяжести и наименьшим в

группе с тяжелым ИИ. В то же время достоверное увеличение М-МС выявлялось только у больных с ИИ средней и тяжелой степени тяжести, но не у пациентов с легкой степенью тяжести ИИ.

Обратная взаимосвязь тяжести ИИ с содержанием Р-МС и ГМ-МС подтверждалась также при анализе корреляционных зависимостей между относительным количеством указанных субпопуляций и баллом NIHSS (табл. 17). В общей группе больных эта взаимосвязь была слабой, однако при исключении пациентов с наиболее легкой степенью тяжести ИИ (NIHSS=5) – достигала умеренной степени выраженности и для Р-МС – статистической достоверности. В то же время корреляционной взаимосвязи М-МС с баллом NIHSS не отмечалось.

Таблица 17 – Корреляционная взаимосвязь между тяжестью ИИ и содержанием МС

Субпопуляции МС (%)	Общая группа	Пациенты с NIHSS>5
М-МС (CD14+DR-)	R= 0,01; p= 0,94 n=47	R= 0,006; p= 0,97 n=42
Р-МС (Lin-HLA-DR-33+)	R= -0,17; p= 0,19 n=59	<b>R= -0,36; p= 0,007</b> <b>n=54</b>
Г-МС (Lin-HLA-DR-CD33+CD66+)	R= -0,14; p= 0,39 n=39	R= -0,27; p= 0,12 n=35

Примечание: R- коэффициент корреляции по Спирмену; p - достоверность различий.

Учитывая, что тяжесть ИИ во многом обусловлена системным воспалительным ответом, а МС обладают противовоспалительной активностью, можно предположить, что более эффективная мобилизация из костного мозга субпопуляций Р-МС и ГМ-МС ограничивает воспалительную реакцию и, соответственно, тяжесть ИИ. Действительно, корреляционный анализ (табл. 18) выявил наличие достоверной обратной зависимости между

содержанием Lin-CD33+ клеток и концентрацией СРБ и тенденцию к обратной взаимосвязи этих клеток с НЛИ в группе пациентов со среднетяжелым/тяжелым инсультом (NIHSS $\geq$ 8). Кроме того, обратная корреляционная связь (в виде тенденции) выявлялась между НЛИ и долей CD33+HLA-DR-CD66+ клеток в популяции Lin- клеток.

Таблица 18 – Взаимосвязь между содержанием МС и воспалительным ответом

Субпопуляции МС (%)	СРБ мг/л		НЛИ	
	Общая группа	Пациенты с NIHSS $\geq$ 8	Общая группа	Пациенты NIHSS $\geq$ 8
CD14+HLA-DR- (М-МС)	R= 0,08; p= 0,61; n=46	R= 0,14; p= 0,43; n=33	R= -0,15; p= 0,32; n=47	R= -0,12; p= 0,49; n=34
Lin- CD33+	R= -0,23; p= 0,19; n=34	<b>R= -0,41;</b> p= 0,037; n=26	R= -0,05; p= 0,75; n=35	R= -0,26; p= 0,18; n=27
Lin-CD33+HLA-DR- (P-МС)	R= -0,13 p= 0,31; n=58	R= 0,18; p= 0,25; n=42	R= -0,11 p= 0,41; n=35	R= -0,13; p=0,43; n=43
CD33+HLA-DR-CD66+ (от Lin-)	R=-0,10; p= 0,37; n=45	R= -0,16 p= 0,39; n=29	R=-0,11; p= 0,48; n=40	R= -0,29 p= 0,12; n=29
Lin-D33+HLA-DR-CD66+ (Г-МС)	R= -0,05; p= 0,78; n=38	R= -0,09; p= 0,66; n=28	R= -0,07; p= 0,65; n=39	R= -0,23; p= 0,12; n=30

Примечание: R- коэффициент корреляции по Спирмену; p - достоверность различий.

Согласно данным литературы, противовоспалительный эффект МС может опосредоваться как через подавление клеток врожденного иммунитета, так и модуляцию функций Т-клеток. Выше было показано, что между концентрацией СРБ и НЛИ – с одной стороны, и балансом CD4+IFN $\gamma$ + /CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток – с другой, выявляется прямая

зависимость. В этой связи представлялось интересным выяснить, насколько изменения в содержании субпопуляций Т-клеток связаны с возрастанием в периферической крови МС. Проведенный корреляционный анализ выявил наличие прямой корреляционной связи между долей гранулоцитарных МС и абсолютным количеством  $CD4+CD25^{hi}$  Т-клеток. Эта зависимость в общей группе была достоверной для относительного содержания  $CD33+HLA-DR-CD66+$  (в гейте Lin- клеток) и проявлялась в виде выраженной тенденции ( $p=0,067$ ) в отношении доли  $Lin-CD33+HLA-DR-CD66+$  среди МНК. В группе пациентов с тяжестью  $NIHSS \geq 8$  данная связь была более сильной и достоверной как в отношении  $CD33+HLA-DR-CD66+$ , так и  $Lin-CD33+HLA-DR-CD66+$  клеток (табл. 19). Взаимосвязь  $CD33+HLA-DR-CD66+$  клеток с относительным содержанием  $CD4+CD25^{hi}$  Т-клеток у пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести была менее выраженной ( $R_s=0,27$ ) и не достигала статистической достоверности. Характерно, что корреляционной зависимости между долей МС и абсолютным количеством  $CD4+IFN\gamma+$  Т-клеток не выявлялось, что исключает обусловленность выявленной зависимости изменением общего количества лимфоцитов или Т-клеток. Кроме того, следует отметить наличие обратной корреляционной зависимости между относительным содержанием  $CD4+IFN\gamma+$  Т-клеток и долей  $Lin-CD33+$  МС. Эта связь, хотя была относительно слабой, прослеживалась лучше в общей группе ( $R_s=-0,27$ ) и проявлялась в виде тенденции.



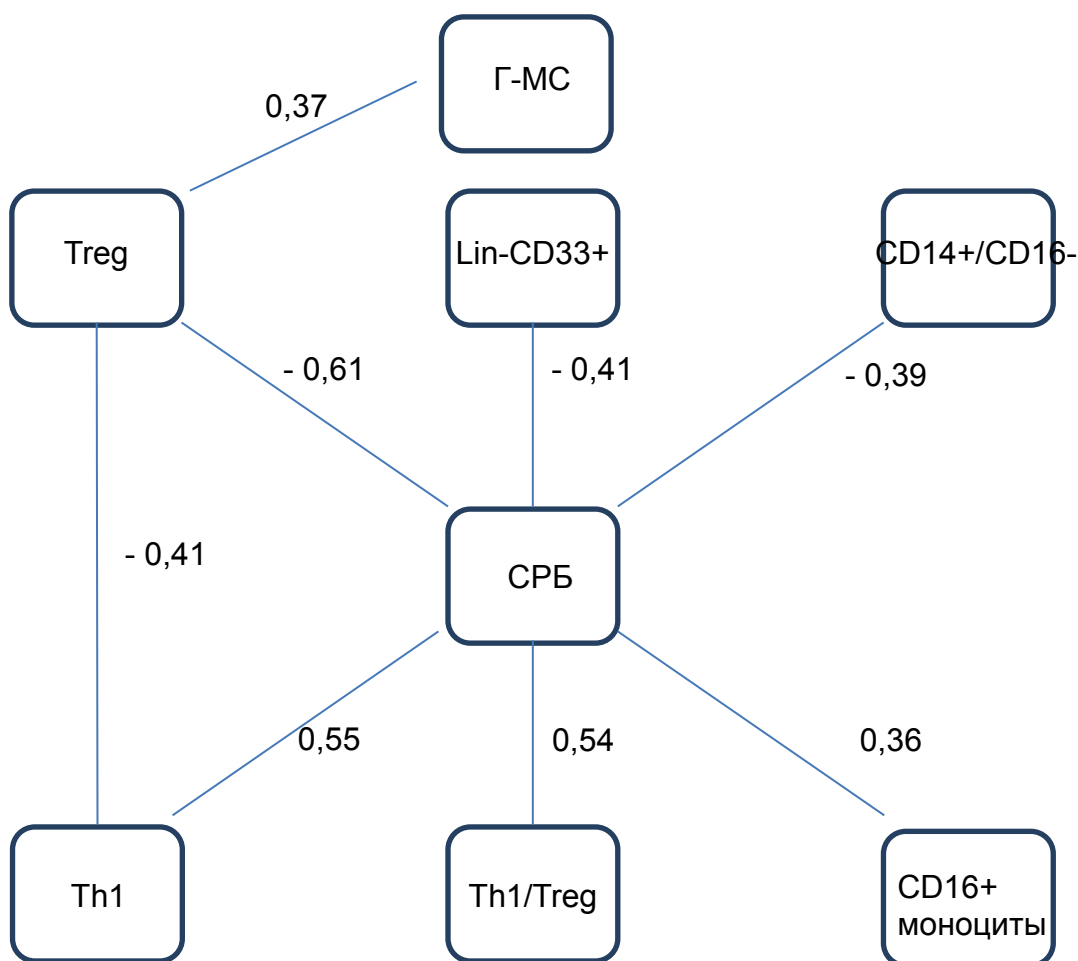
Таблица 19 – Взаимосвязь субпопуляций МС с содержанием CD4+IFN $\gamma$ + и CD4+CD25<sup>hi</sup>Т-клеток у больных ИИ

Параметры	Относительное содержание (%)		Абсолютное количество (x10 <sup>9</sup> /л)	
	CD4+IFN $\gamma$ + Т-клетки	CD4+CD25 <sup>hi</sup> Т-клетки	CD4+IFN $\gamma$ + Т-клетки	CD4+CD25 <sup>hi</sup> Т-клетки
Общая группа				
CD14+HLA-DR- (М-МС)	R= -0,11 ; p=0,54 ; n=34	R= 0,02 ; p=0,77 ; n=61	R= -0,04 ; p=0,81 ; n=34	R= 0,14 ; p=0,36 ; n=47
Lin-CD33+	R= -0,25; p=0,26; n=22	R= 0,13 ; p=0,45 ; n=35	R=-0,24 ; p=0,27 ; n=22	R= 0,12 ; p=0,48 ; n=35
Lin-HLA-DR-CD33+ (Р-МС)	R= -0,27; p=0,1; n=40	R= 0,014 ; p=0,91 ; n=59	R=-0,19 ; p=0,24 ; n=40	R= 0,11 ; p=0,42 ; n=59
HLA-DR-CD33+ CD66+ (от Lin-)	R= -0,22; p=0,66; n=26	R= 0,23 ; p=0,14 ; n=40	R=-0,09 ; p=0,64 ; n=27	<b>R= 0,34 ;</b> p=0,03 ; n=40
Lin-HLA-DR-CD33+CD66+ (Г-МС)	R=-0,15; p=0,46; n=26	R= 0,13 ; p=0,42 ; n=39	R= -0,03 ; p=0,85 ; n=26	R= 0,30 ; p=0,067 ; n=39
NIHSS $\geq$ 8				
CD14+HLA-DR- (М-МС)	R= -0,08; p=0,68; n=25	R= 0,21; p=0,24; n=34	R= -0,02; p=0,91; n=25	R= 0,23; p=0,18; n=34
Lin-CD33+	R=-0,20; p=0,27; n=30	R=0,11; p= 0,58; n=27	R=-0,20; p=0,43; n=18	R=0,14; p=0,48; n=27
Lin-HLA-DR-CD33+ (Р-МС)	R=-0,21; p=0,26; n=30	R= 0,03; p= 0,87; n=43	R= -0,13; p=0,50; n=30	R= 0,18; p=0,24; n=43
HLA-DR-CD33+ CD66+(от Lin-)	R=-0,20; p=0,38; n=21	R=0,27; p=0,14; n=30	R=0,01; p=0,96; n=21	<b>R=0,41;</b> p=0,023; n=30
Lin-HLA-DR-CD33+CD66+	R=-0,20; p=0,38; n=20	R=0,14; p=0,47; n=29	R=0,0001; p=0,98; n=20	<b>R=0,37;</b> p=0,04; n=29

Примечание: R- коэффициент корреляции по Спирмену; p- достоверность различий.

Таким образом, проведенные исследования выявили увеличение всех трех субпопуляций МС (Р-МС, М-МС, Г-МС) в остром периоде ИИ. Судя по наибольшему возрастанию Р-МС при легкой/средней степени тяжести и Г-МС – при легкой степени тяжести и обратной взаимосвязи указанных субпопуляций с баллом тяжести NIHSS, Р-МС и Г-МС играют, по-видимому,

позитивную роль, связанную с противовоспалительным эффектом. Действительно, относительное содержание Lin-CD33<sup>+</sup> (в группе пациенты с NIHSS $\geq$ 8) обратно коррелировало с уровнем СРБ. Кроме того, доля Г-МС с фенотипом HLA-DR-CD33<sup>+</sup>CD66<sup>+</sup> и Lin-HLA-DR-CD33<sup>+</sup>CD66<sup>+</sup> клеток находилась в прямой корреляционной зависимости с абсолютным содержанием CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, а между относительным содержанием Р-МС (Lin-HLA-DR-CD33<sup>+</sup>) и CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток прослеживалась тенденция к обратной зависимости. М-МС в отличие от Р-МС и Г-МС значительно возрастали только при средне-тяжелом и тяжелом ИИ, и количество этих клеток не коррелировало с тяжестью заболевания и показателями воспаления (рис.2)



**Рисунок 2** – Корреляционные связи показателей воспаления (СРБ) и субпопуляций лимфоидных и миелоидных клеток с регуляторной активностью в периферической крови больных ИИ

### 3.3 Характеристика иммунных клеток с регуляторной активностью у пациентов ИИ, оппозитных по развитию инфекционных осложнений

#### 3.3.1 Субпопуляции Т-клеток с регуляторной активностью

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 с лимфопенией (как наиболее ярким проявлением постинсультной иммуносупрессии) и инфекционными осложнениями. Абсолютное количество лимфоцитов в остром периоде ИИ было достоверно снижено (табл. 20). Лимфопения ( $<1,34 \times 10^9/\text{Л}$ ; нижний порог нормативного диапазона) 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.

Таблица 20 – Содержание лимфоцитов у больных ИИ

Параметры	Доноры	ИИ (общая группа), n=61	ИИ NIHSS $\geq$ 8 n=45	NIHSS $\geq$ 8 Инф (+) n=19	NIHSS $\geq$ 8 Инф (-) n=26	P
Лимфоциты ( $\times 10^9/\text{Л}$ )	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	$P_U$ =0,07
Частота лимфопении; % (n)	—	45,9% 28/61	49% 22/45	68,4% 13/19	34,6% 9/26	$P_{\text{ТМФ}}$ =0,067

Примечание: \* - достоверность различий с донорами;  $P_U$  – достоверность различий между оппозитными группами больных; U-критерий Манна-Уитни;  $P_{\text{ТМФ}}$  – критерий точный метод Фишера.

Следует отметить (табл. 21), что больные с лимфопенией не отличались от оппозитной группы по относительному содержанию CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, Р-МС, М-МС и Г-МС, тогда как доля CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток у таких больных была 4-кратно выше, чем в группе без лимфопении.

Таблица 21 – Содержание клеток с иммунорегуляторной активностью в группах пациентов с наличием и отсутствием лимфопении

Параметр	Лимфопения (+) n=11-22	Лимфопения (-) n=18-23	P <sub>U</sub>
CD4+CD25 <sup>hi</sup> (%)	2,0 (1,0-3,0) n=22	2,0 (1,3-3,0) n=23	0,42
CD4+IFN $\gamma$ + (%)	5,8 (3,4-16,4) n=13	1,35 (0,5-3,2) n=18	0,0044
Классические Мн CD14++CD16- (%)	82 (73-87) n=11	84 (77-88) n=20	0,46
Промежуточные Мн CD14++CD16+ (%)	8 (5-13) n=11	8 (5-10) n=20	0,78
Неклассические Мн CD14+CD16++ %	5 (1-10) n=11	3,5 (2-5) n=20	0,36
Lin- DR-D33+ (P-MC)	1,47 (1,0-1,75) n=20	1,40 (1,19-2,47) n=23	0,36
CD14+DR- (M-MC)	3 (2,0-4,0) n=13	3,0 (2,0-5,0) n=21	0,77
Lin-DR-D33+CD66+ (Г-MC)	0,27 (0,096-0,36) n=11	0,31 (0,2-1,01) n=19	0,29

P<sub>U</sub> – достоверность различий между оппозиционными группами больных.

При этом между абсолютным количеством лимфоцитов и содержанием CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток выявлялась обратная корреляционная связь (R= - 0,41; p=0,02).

Чтобы проанализировать возможную взаимосвязь между уровнем исследуемых субпопуляций клеток и развитием инфекционных осложнений, было проведено сравнительное исследование содержания клеток с регуляторной активностью в группах, оппозиционных по развитию инфекции. Развитие инфекционных осложнений в сроки до 28 суток у пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести было зарегистрировано у 19 из 45 (42,2%) пациентов. В 8 случаях диагностировалась пневмония, в 11 – мочевиная инфекция (n=11), причем в половине случаев (11 из 19) инфекция явилась причиной 28 суточной летальности.

При анализе субпопуляций CD4+ Т-клеток обе группы пациентов (с наличием и отсутствием инфекционных осложнений) характеризовались однонаправленными изменениями (табл. 22), в частности, возрастанием доли клеток с фенотипом Treg и снижением относительного содержания Т-клеток с фенотипом Th1. В группе с инфекционными осложнениями эти

Таблица 22 – Т-клетки с регуляторной активностью в группах пациентов ИИ, оппозирующих по развитию инфекционных осложнений

Исследуемые параметры Me (LQ-UQ)	Доноры (n=20)	Пациенты с ИИ с развитием инфекционных осложнений (n= 19)	Пациенты с ИИ с отсутствием инфекционных осложнений (n= 24)
CD4+CD25+ (%)	3,0 (3,0-4,0)	4,0 (2,0-8,0)	6,5 (3,0-8,0) *
CD4+CD25+ x10 <sup>9</sup> /л	0,07 (0,04-0,09)	0,037 (0,024-0,084)	0,08 (0,05-0,12) #
CD4+CD25 <sup>hi</sup> (%)	1,0 (1,0-1,2)	2,0 (1,0-2,0) *	2,0 (1,6-3,0) *
CD4+CD25 <sup>hi</sup> x10 <sup>9</sup> /л	0,018 (0,01-0,03)	0,016 (0,009-0,033)	0,04 (0,02-0,05) #
CD4+IFN $\gamma$ + (%)	15,1 (4,3-29,0)	4,6 (2,3-16,4)	1,6 (0,5-3,4) *#
CD4+IFN $\gamma$ + x10 <sup>9</sup> /л	0,22 (0,06-0,48)	0,068 (0,025-0,13) *	0,034 (0,012-0,05) *
CD4+IFN $\gamma$ / CD4+CD25 <sup>hi</sup>	11,8 (4,3-24,2)	3,0 (1,2-11,0) *	0,7 (0,23-1,6) *#

Примечание: \* достоверность различий с донорами; p<0,05; # достоверность различий в группах с наличием и отсутствием инфекций, p<0,05.

изменения были менее выраженными и в отношении CD4+CD25+ и CD4+IFN $\gamma$ + клеток проявлялись в виде тренда. В то же время у пациентов с

отсутствием инфекции возрастание субпопуляций CD4+CD25<sup>+</sup> и снижение CD4+IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток было более выраженным и статистически значимым.

В результате содержание CD4+IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток у пациентов с инфекционными осложнениями было достоверно выше, чем в группе без инфекции, а индекс соотношения CD4+IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/CD4+CD25<sup>hi</sup> 4-кратно превышал таковой в группе без инфекций.

Различия в содержании клеток с фенотипом Treg проявлялись не только на уровне относительных значений, но и абсолютного количества этих клеток. Так, абсолютное содержание CD4+CD25<sup>hi</sup> клеток у пациентов с неосложненным течением постинсультного периода было в 2,5 раза выше, чем в группе с инфекционными осложнениями.

Более выраженное изменение баланса Т-клеток с фенотипом Th1 и Treg в первые 24—48 часов постинсультного периода в сторону снижения Th1 и возрастания Treg при отсутствии инфекционных осложнений в сравнении с оппозитной группой свидетельствует, что указанные изменения в компартменте CD4<sup>+</sup> Т-клеток не причастны к развитию инфекционных осложнений и играют, по-видимому, защитную роль, ограничивая выраженность системного воспалительного ответа.

### ***3.3.2 Субпопуляции моноцитов***

Сравнение параметров, характеризующих популяцию моноцитов у пациентов с наличием и отсутствием инфекционных осложнений, показало (табл.23), что снижение доли классических моноцитов, возрастание относительного содержания промежуточных и неклассических моноцитов, а также снижение индекса соотношения CD16 негативных и позитивных моноцитов, регистрировалось в обеих группах. Тем не менее, у пациентов с развившейся инфекцией в остром периоде отмечалось достоверное снижение лимфоцитарно-моноцитарного индекса, тогда как в группе без инфекции уменьшение лимфоцитарно-моноцитарного индекса было менее выраженным и проявлялось в виде тенденции ( $p=0,066$ ).

Таблица 23 – Субпопуляции моноцитов в группах пациентов с наличием и отсутствием инфекционных осложнений

Исследуемые параметры, Me (LQ-UQ)	Доноры (n=22)	Пациенты с наличием инфекции n=10 (1)	Пациенты с отсутствием инфекции n=21 (2)	$P_{u(1-2)}$
Моноциты $\times 10^6/\text{Л}$	0,475 (0,408-0,590)	0,589 (0,515-0,836)	0,507 (0,419-0,779)	0,33
Лимфоцитарно-моноцитарный индекс	4,6 (2,87-5,73)	2,38 (1,33-3,68)*	3,2 (2,36-5,0)	0,25
CD14++CD16- (классические)	89,5 (86,0-92,0)	83,5 (77,0-88,0)*	83,0 (77,0-87,0)**	0,86
CD14++CD16+ (промежуточные)	3,0 (2,0-5,0)	8,5 (5,0-12,0)**	8,0 (4,0-9,0)**	0,37
CD14+CD16++ (неклассические)	2,0 (1,0-3,0)	2,5 (1,0-4,0)**	4,0 (2,0-7,0)**	0,17
Общее содержание CD16+ моноцитов (%)	5,3 (4,0-7,0)	12,5 (9,0-16,0)**	12,0 (9,0-16,0)**	0,98
Отношение CD16-/CD16+ моноцитов	15,8 (12,4-23,5)	7,0 (4,8-8,6)**	7,1 (4,6-9,8)**	0,92
Отношение промежуточных и неклассических моноцитов	2,0 (1,0-3,3)	3,4 (2,5-5,0) $p=0,066$	1,78 (0,8-3,5)	<b>0,044</b>

Примечание: \*  $p_u < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  – достоверность различий с донорами;  $p_{u(1-2)}$  – достоверность различий между оппозиционными группами пациентов, U- критерий Манна-Уитни.

Другой особенностью было различие в соотношении между промежуточными и неклассическими моноцитами. Возрастание неклассических моноцитов в группе с инфекцией было менее выраженным, чем у пациентов без инфекционных осложнений. В результате пациенты с инфекцией отличались от оппозиционной группы более высоким индексом соотношения промежуточных и альтернативных моноцитов. Таким образом, более выраженное возрастание моноцитов в первые 24-48 часов, приводящее к значимому снижению лимфоцитарно-моноцитарного индекса, и

достоверное увеличение индекса соотношения промежуточных и неклассических моноцитов (за счет меньшего содержания последних) ассоциировалось с развитием инфекционных осложнений.

### 3.3.3 Субпопуляции миелоидных супрессорных клеток

Сравнение содержания МС в остром периоде ИИ у больных с развившейся и неразвившейся впоследствии инфекцией продемонстрировало возрастание всех субпопуляций МС и снижение индекса соотношения моноцитарных и гранулоцитарных МС в обеих группах. При этом значимых различий в относительном содержании анализируемых показателей у пациентов с наличием и отсутствием инфекционных осложнений, не наблюдалось (табл. 24).

Таблица 24 – Субпопуляции МС в группах пациентов с наличием и отсутствием инфекционных осложнений

Исследуемые параметры, Me (LQ-UQ)	Доноры n=11-20 (1)	Инфекция(+) n=10-19 (2)	Инфекция (-) n=17-26 (3)	P <sub>U</sub>
HLA-DR-CD33+ (в Lin-)	6,0 (3,0-7,0)	11,0 (7,0-17,0)	13,5 (7,0-18,0)*	P <sub>1-2</sub> =0,00011 P <sub>1-3</sub> =0,000023 P <sub>2-3</sub> =0,57
Lin-HLA-DR-CD33+ (P-MC)	0,5 (0,29-0,6)	1,54 (1,24-2,70)	1,4 (0,96-1,82)	P <sub>1-2</sub> =0,000028 P <sub>1-3</sub> =0,000039 P <sub>2-3</sub> =0,98
CD14+HLA-DR-	2,0 (1,0-3,0)	2,8 (2,0-4,0)	3,0 (2,0-5,0)*	P <sub>1-2</sub> =0,015 P <sub>1-3</sub> =0,0017 P <sub>2-3</sub> =0,98
Lin-HLA-DR-CD33+CD66+ (Г-MC)	0,058 (0,034-3,0075)	0,33 (0,24-0,38)	0,23 (0,13-0,84)*	P <sub>1-2</sub> =0,00015 P <sub>1-3</sub> =0,000015 P <sub>2-3</sub> =0,81
HLA-DR-CD33+CD66+ (в Lin-)	0,57 (0,43-1,2)	1,76 (1,0-3,2)	2,25 (1,2-4,2)	P <sub>1-2</sub> =0,01 P <sub>1-3</sub> =0,05 P <sub>2-3</sub> =0,32
M-MC/Г-MC	34,3 (17,4-49,7)	5,7 (3,2-45,0)	9,2 (0,8-60,0)	P <sub>1-2</sub> =0,014 P <sub>1-3</sub> =0,019 P <sub>2-3</sub> =0,57

Примечание: P<sub>U</sub> – достоверность различий, U – критерий Манна-Уитни.



Таким образом, несмотря на возрастание доли МС в остром периоде ИИ, изменения в содержании этих клеток не было ассоциировано с развитием инфекционных осложнений.

### **3.3.4. Оценка влияния различных субпопуляций клеток с регуляторной активностью на риск развития инфекционных осложнений**

Суммируя полученные данные, можно заключить, что из всех исследуемых параметров, ассоциированные с инфекцией различия были выявлены для CD4CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, CD4+IFN- $\gamma$  и индекса CD4+IFN- $\gamma$ /CD4CD25<sup>hi</sup>. Чтобы выяснить, насколько изменения этих показателей влияли на риск развития инфекционных осложнений, был проведен анализ относительных рисков (RR) для факторов повышения CD4CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, снижения CD4+IFN- $\gamma$  и уменьшения индекса CD4+IFN- $\gamma$ /CD4CD25<sup>hi</sup>. Как видно (табл.25), повышенное содержание абсолютного количества CD4CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, снижение относительного содержания CD4+IFN- $\gamma$  Т-клеток и индекса CD4+IFN- $\gamma$ /CD4CD25<sup>hi</sup> более чем двукратно уменьшало риск развития инфекционных осложнений.

Таблица 25 – Взаимосвязь CD4+Т-клеток с регуляторной активностью с риском развития инфекционных осложнений

Фактор	Частота 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 (> 90% перцентили у доноров)	17,6% (3/17)	57,1% (16/28)	0,013	0,309	0,105-0,906	0,691
CD4+IFN- $\gamma$ ≥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- $\gamma$ /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

Таким образом, 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, повышенное количество CD4CD25<sup>hi</sup> T-клеток и сниженное содержание CD4+IFN- $\gamma$  достоверно уменьшало вероятность возникновения инфекции.

### **3.4. Характеристика иммунных клеток с регуляторной активностью у пациентов с различной эффективностью восстановления через 3 месяца после ИИ**

#### ***3.4.1. Субпопуляции T-клеток с регуляторной активностью***

В завершении был проведен ретроспективный анализ содержания T-клеток с регуляторной активностью, а также субпопуляций моноцитов и МС у пациентов со среднетяжелым/тяжелым ИИ (NIHSS $\geq$ 8) с благоприятным и неблагоприятным 3-месячным исходом. Оценка функционального восстановления выявила наличие благоприятных исходов (mRs  $\leq$ 3) у половины (n=22) пациентов, тогда как у другой половины (n=22) регистрировался неблагоприятный исход (mRs >3), включая 11 пациентов с летальным исходом (28-сут летальность) и 11 пациентов – с грубой инвалидизацией. Сравнение групп пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом (табл. 26) показало, что по большинству клинико-лабораторных показателей больные оппозитных групп были сходны. Группы пациентов не различались по соотношению мужчин и женщин, наличию сопутствующих заболеваний (сахарный диабет, артериальная гипертензия, мерцательная аритмия) и факторам риска, а также патогенетическому субтипу и латерализации инсульта. Единственным достоверным различием являлся более старший возраст в группе с неблагоприятным исходом.

Таблица 26 – Характеристика больных средней и тяжелой степеней тяжести с благоприятным и неблагоприятным исходом

Показатель	Пациенты	Благоприятный исход	Неблагопри- ятный исход	p
N (%)	45	24	21	
Возраст (годы); Me (min-max)	68 (64-75)	67(60,0-75,0)	74(66,0-77,0)	0,029
Пол (мужчины); n (%)	22 (48,9)	13 (54,2)	10 (47,6)	0,625
Артериальная гипертензия; n (%)	44 (100)	22 (100)	22(100)	1,000
Мерцательная аритмия; n (%)	22 (48,9)	11 (45,8)	11(45,8)	0,625
Курение; n (%)	14 (31,1)	8 (33,3)	6 (28,6)	0,727
Употребление алкоголя; n (%)	3 (6,7)	1 (4,1)	2 (9,5)	0,780
Сахарный диабет; n (%)	10 (22,2)	6 (25)	4 (19)	0,692
Гиперхолестеринемия; n (%)	22 (48,9)	15 (62,5)	9 (37,5)	0,095
Общий холестерин; Me (LQ-UQ),(ммоль/л)	5,4(4,36-6,04)	5,56 (5,2-6,3)	4,7 (3,98-5,8)	0,088
Триглицериды; Me (LQ-UQ),(ммоль/л)	18(0,97-1,87)	1,36(1,04-1,87)	1,13(0,96-1,44)	0,335
ЛПВП; Me (LQ-UQ), (ммоль/л)	1,28(0,78-2,02)	1,32(0,95-2,2)	1,26(0,74-1,97)	0,790
ЛПНП; Me (LQ-UQ),(ммоль/л)	2,78(2,41-3,5)	2,83(2,64-3,53)	2,66(2,02-3,39)	0,258
Индекс атерогенности; (усл.ед.)	2,1(1,5-3,7)	2,3(1,6-4,0)	1,93(1,3-3,7)	0,446
ПТИ; Me (LQ-UQ), (%)	93,2(86,8-100)	93,0(86,4-101,3)	93,3(86,8-96,6)	0,657
АПТВ; Me (LQ-UQ), (сек)	30,5(28,2-33)	30,5 (28,7-33,1)	30,4(27,1-31,9)	0,732
МНО; Me (LQ-UQ), (усл.ед.)	1,07(1,0-1,16)	1,04 (0,96-1,16)	1,07(1,04-1,2)	0,343
Локализация инсульта:				
Левополушарный	23 (51)	13 (56,5)	9 (42,9)	
Правополушарный	22 (48,9)	12 (43,5)	10 (57,1)	
Атеротромботический	22 (48,9)	12 (50)	10 (47,6)	
Кардиоэмболический	16 (35,6)	11(45,8)	5 (23,8)	

Примечание: ЛПВП, липопротеиды высокой плотности; ЛПНП, липопротеиды низкой плотности; ПТИ, протромбиновый индекс; АПТВ, активированное парциальное тромбопластиновое время; МНО, международное нормализованное отношение.

Данные представлены в виде медианы (Me), интерквартильного диапазона, (LQ-UQ) или минимума-максимума (min-max) и частоты встречаемости (%).

Различия частот оценивали с использованием точного метода Фишера

В сравнении с донорами пациенты обеих групп характеризовались возрастанием доли  $CD4^+CD25^+$  и  $CD4^+CD25^{hi}$  Т-клеток и снижением относительного содержания  $CD4^+IFN\gamma^+$  Т-клеток (табл. 27). Тем не менее, больные с благоприятными исходами характеризовались большей выраженностью указанных изменений. В результате относительное содержание  $CD4^+CD25^{hi}$  Т-клеток в группе с благоприятным исходом было выше (на уровне тенденции ( $pU=0,064$ )), а содержание  $CD4^+IFN\gamma^+$  Т-клеток – достоверно ниже ( $pU=0,045$ ), чем в группе с неблагоприятным исходом. При этом индекс  $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$  в группе с неблагоприятным исходом 4-кратно превышал аналогичный показатель в группе с хорошим неврологическим восстановлением ( $pU=0,023$ ).

Таблица 27 - Т-клетки с регуляторной активностью у пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом ИИ

Параметр, Me (LQ-UQ)	Доноры	Благоприятный исход	Неблагоприятный исход
$CD4^+CD25^+$ (%)	3,0 (3,0-4,0)	7,0 (3,0-8,0) *	4,0 (3,0-7,0)
$CD4^+CD25^{hi+}$ (%)	1,0 (1,0-1,2)	2,0 (1,6-3,0) *	2,0 (1,0-2,0) *
$CD4^+IFN\gamma$ (%)	15,1 (4,3-29,0)	1,85 (0,7-3,25) *	4,6 (1,1-16,4) * #
$CD4^+IFN\gamma/CD4^+CD25^{hi}$	11,8 (4,3-24,2)	0,91 (0,3-1,6) *	3,5 (1,1=10,9) *#
$CD4^+CD25^+ \times 10^9/L$	0,07 (0,04-0,09)	0,1 (0,03-0,13)	0,05 (0,03-0,07)
$CD4^+CD25^{hi+} \times 10^9/L$	0,02(0,014-0,03)	0,04 (0,015-0,05)*	0,02 (0,01-0,03) #
$CD4^+IFN\gamma \times 10^9/L$	0,22 (0,06-0,48)	0,03 (0,01-0,05)*	0,07 (0,03-0,15)

Примечание: \* достоверность различий с донорами;  $p<0,05$ , # достоверность различий между группами больных,  $p<0,05$ .

Кроме того, оппозитные группы пациентов достоверно различались по абсолютному количеству  $CD4^+CD25^{hi}$ , которое было выше у пациентов с благоприятным исходом. Различия в абсолютном количестве  $CD4^+IFN\gamma^+$  Т-

клеток проявлялись в виде тренда. Количество этих клеток у пациентов с хорошим функциональным восстановлением было ниже ( $p=0,09$ ).

### 3.4.2. Субпопуляции моноцитов

Оценка субпопуляций моноцитов и их соотношения в зависимости от исхода (табл. 28) показала, что пациенты обеих групп характеризовались

Таблица 28 – Субпопуляции моноцитов и их соотношение в группах пациентов с благоприятным и неблагоприятным 3-месячным исходом

Исследуемые параметры, Me (LQ-UQ)	Доноры	Благоприятный исход n=12	Неблагоприятный исход n=18	Pu
Моноциты $\times 10^9/\text{л}$	0,475 (0,408-0,590)	0,589 (0,447-0,811)	0,509 (0,419-0,779)	0,51
Лимфоцитарно-моноцитарный индекс	4,6 (2,87-5,73)	2,6 (1,52-3,98)*	2,9 (1,78-5,28) $p=0,07$	0,58
CD14++CD16- (классические)	89,5 (86,0-92,0)	81,0 (75,0-84,5)**	84,0 (77,0-88,0)**	0,45
CD14++CD16+ (промежуточные)	3,0 (2,0-5,0)	9,0 (5,0-13,5)**	7,5 (4,0-9,0)**	0,16
CD14+CD16++ (неклассические)	2,0 (1,0-3,0)	4,0 (1,0-8,0) $p=0,08$	4,0 (2,0-6,0)**	0,78
Общее содержание CD16+ моноцитов (%)	5,3 (4,0-7,0)	14,0 (10,5-21,0)**	10,5 (8,0-16,0)**	0,32
Отношение CD16-/CD16+ моноцитов	15,8 (12,4-23,5)	5,9 (3,8-7,8)**	8,2 (4,7-10,3)**	0,32
Отношение промежуточных и неклассических моноцитов	2,0 (1,0-3,3)	2,8 (1,5-4,8) $p=0,066$	2,0 (0,8-3,5)	0,28

Примечание: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$  – достоверность различий с донорами; U-критерий Манна-Уитни.

достоверным снижением классических моноцитов, возрастанием промежуточных моноцитов и уменьшением индекса соотношения CD16-негативных и CD16-позитивных моноцитов. Достоверных различий между

группами пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом не выявлялось.

Тем не менее, отмечался ряд особенностей. Больные с неблагоприятным исходом отличались от оппозитной группы достоверным снижением лимфоцитарно-моноцитарного индекса и тенденцией к повышению индекса соотношения промежуточных и неклассических моноцитов. Таким образом, более выраженное возрастание промежуточных моноцитов с точки зрения исхода являлось неблагоприятным признаком.

### **3.4.3. Субпопуляции миелоидных супрессорных клеток**

Оценка количественного содержания МС с учетом эффективности 3-месячного восстановления также выявила ряд закономерностей (табл. 29). Так, корреляционный анализ в группе с ИИ средней и тяжелой степени тяжести выявил достоверную обратную зависимость между 3-месячным баллом mRs и относительным содержанием CD14+HLA-DR клеток ( $R=-0,4$ ), а также долей CD33+HLA-DR-CD66+ клеток в субпопуляции Lin- клеток ( $R=-0,39$ ).

Таблица 29 – Взаимосвязь между содержанием МС и 3-месячным исходом (баллом mRs)

Субпопуляции МС (%)	Пациенты с NIHSS $\geq$ 8
CD14+HLA-DR- (M-MC)	<b>R= - 0,4</b> ; p = 0,022 n = 33
Lin-CD33+HLA-DR- (P-MC)	R= 0,18; p = 0,25 n = 42
CD33+HLA-DR-CD66+ (от Lin-)	<b>R= - 0,39</b> ; p = 0,03 n = 29

Примечание: R- коэффициент корреляции по Спирмену; p - достоверность различий.

Учитывая, что более низкий балл mRs соответствует более эффективному восстановлению, выявленная взаимосвязь свидетельствовала о позитивной роли М-МС и Г-МС в исходе ИИ.

Действительно, сравнительный анализ субпопуляций МС в группах с благоприятным и неблагоприятным 3-месячным исходом показал значимое возрастание М-МС у больных с благоприятным исходом, при отсутствии такового в оппозитной группе (табл. 30).

Таблица 30 – Субпопуляции МС и моноцитов в группах с благоприятным и неблагоприятным 3-месячным исходом

Исследуемые параметры Me (LQ-UQ)	Доноры (n=11-20)  (1)	Пациенты с благоприятным исходом (n=18-23)  (2)	Пациенты с неблагоприятным исходом (n=11-21)  (3)	P <sub>U</sub>
CD14+HLA-DR- (M-MC)	2,0 (1,0-3,0)	4,0 (2,0-6,5)	2,0 (1,0-3,0)	P <sub>1-2</sub> =0,00068 P <sub>1-3</sub> =0,32 P <sub>2-3</sub> =0,03
HLA-DR-D33+ (в Lin-)	6,0 (3,0-7,0)	13,0 (7,0-18,0)	11,4 (7,5-15,0)	P <sub>1-2</sub> =0,0001 P <sub>1-3</sub> =0,000027 P <sub>2-3</sub> =0,54
Lin-DR-D33+ (P-MC)	0,5 (0,29-0,6)	1,2 (0,90-1,92)	1,54 (1,24-2,4)	P <sub>1-2</sub> =0,000088 P <sub>1-3</sub> =0,000015 P <sub>2-3</sub> =0,25
HLA-DR-CD33+CD66+ (в Lin-)	0,57 (0,43 -1,2)	2,25 (1,2-4,2)	1,7 (1,0-3,0)	P <sub>1-2</sub> =0,01 P <sub>1-3</sub> =0,05 P <sub>2-3</sub> =0,32
Lin-HLA-DR-CD33+CD66+ (Г-MC)	0,058 (0,034-3,0075)	0,23 (0,12-1,0)	0,32 (0,2-0,38)	P <sub>1-2</sub> =0,00039 P <sub>1-3</sub> =0,000084 P <sub>2-3</sub> =0,77
M-MC/Г-MC	34,3 (17,4-49,7)	13,6 (5,68-32,46)	5,31 (3,23-7,96)	P <sub>1-2</sub> =0,055 P <sub>1-3</sub> =0,004 <b>P<sub>2-3</sub>=0,035</b>

Примечание: P<sub>U</sub> – достоверность различий, U – критерий Манна-Уитни.

Соответственно, доля этих клеток в группе с благоприятным исходом была достоверно выше, чем в оппозитной группе, а снижение соотношения М-МС/Г-MC - менее выраженным, чем в группе с неблагоприятным исходом. Относительное содержание CD33+HLA-DR-CD66+клеток в популяции Lin-клеток у пациентов с благоприятным исходом было также выше, чем в

оппозитной группе, однако в этом случае различия в оппозитных группах не достигали статистической достоверности.

#### **3.4.4. Оценка влияния различных субпопуляций клеток с регуляторной активностью на риск развития неблагоприятного исхода**

Оценка относительного риска для параметров, значимо различающихся в группах с благоприятным и неблагоприятным исходом, показала, что повышенное абсолютное содержание CD4CD25<sup>hi</sup> Т-клеток, сниженное относительное содержание CD4+IFN- $\gamma$  Т-клеток и индекса CD4+IFN- $\gamma$ /CD4CD25<sup>hi</sup>, а также возрастание CD14+HLA-DR-клеток более чем двукратно снижало риск развития неблагоприятного исхода (табл. 28).

Таблица 31 – 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				
CD4CD25 <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- $\gamma$ /CD4CD25 <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

#### **3.5. Прогностическая значимость субпопуляций иммунных клеток в качестве потенциальных биомаркеров при ИИ**

Проведенные исследования продемонстрировали, что пациенты с ИИ в группах с наличием и отсутствием инфекционных осложнений значимо различаются в первые 24-48 час по соотношению Т-клеток с фенотипом Th1 (CD4+IFN $\gamma$ + Т-клеток) и Treg (CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток). Выраженные различия в остром периоде ИИ в группах пациентов с благоприятными и



неблагоприятными 3-х месячными исходами также выявлены для соотношения CD4+IFN $\gamma$ + и CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток и дополнительно – для относительного содержания клеток с фенотипом М-МС (CD14+HLA-DR-). Это позволило предположить, что субпопуляции клеток с иммунорегуляторной активностью могут являться биомаркерами и, в частности, предикторами инфекционных осложнений и исходов ИИ.

Для проверки данного предположения был проведен ROC-анализ. Как известно, качество прогностической модели при проведении ROC-анализа определяется площадью под кривой (AUC), соответствуя хорошему при значениях интервала AUC 0,7-0,8; очень хорошему при интервале AUC 0,8-0,9 и отличному - при значениях AUC 0,9 -1,0.

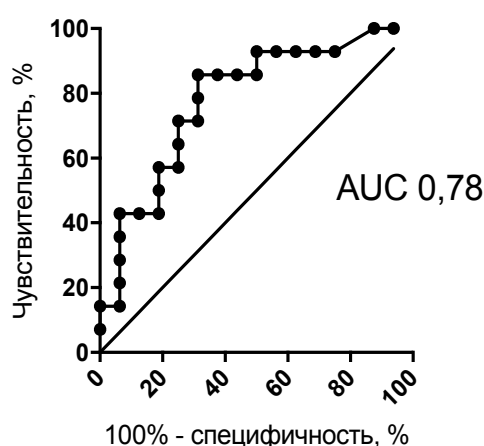
Поскольку в клинической практике для прогнозирования течения и исхода широко применяется шкала NIHSS, а в качестве дополнительных биомаркеров обсуждаются показатели воспаления, было проведено сравнительное исследование прогностической значимости этих параметров и иммунных биомаркеров.

При анализе исследуемых параметров в качестве возможных биомаркеров инфекционных осложнений модель, основанная на оценке NIHSS, не достигала хорошего качества прогноза - площадь под кривой (0,64) соответствовала удовлетворительному качеству модели. При этом балл NIHSS в качестве монопредиктора характеризовался низкой чувствительностью и специфичностью (табл. 32).

Таблица 32 – Значимость отдельных параметров в качестве монопредикторов инфекционных осложнений (ROC- анализ)

Параметр	AUC	р - достоверность	Чувстви- тельность (%)	Специ- фичность (%)
NIHSS	0,64	0,1	68	58
СРБ	0,76	0,003	84	57
НЛИ	0,73	0,008	74	58
CD4+IFN $\gamma$ + / CD4+CD25 <sup>hi</sup>	0,78	0,009	86	69

Прогностическая значимость маркеров воспаления (СРБ и НЛИ) была несколько выше, достигая уровня хорошего качества прогноза. При этом индекс соотношения  $CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$  (в качестве предиктора 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. 3).



**Рисунок 3** – Прогностическая значимость индекса  $CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$  в развитии инфекционных осложнений (ROC- анализ)

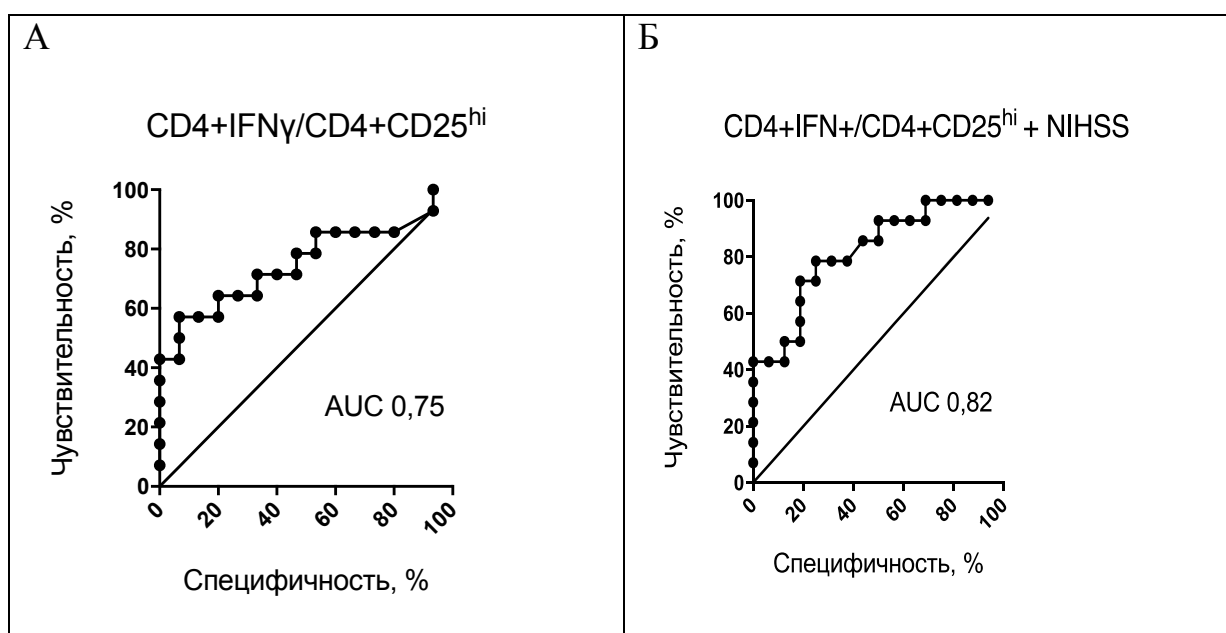
При анализе отдельных показателей в качестве монопредикторов исхода (табл. 33), модели, основанные на оценке балла NIHSS, уровня СРБ и НЛИ, достигали хорошего качеством прогноза - площадь под ROC-кривой варьировала от 0,7 до 0,72.

**Таблица 33** - Значимость исследуемых параметров в прогнозе неблагоприятных 3-мес исходов (ROC- анализ)

Параметр	AUC	Р - достоверность	Чувствитель- ность (%)	Специфичность (%)
NIHSS	0,72	0,01	62	57
СРБ	0,72	0,08	67	74
НЛИ	0,70	0,025	71	65
$CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$	0,75	0,02	71	67
$CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$ + NIHSS	0,82	0,03	79	75

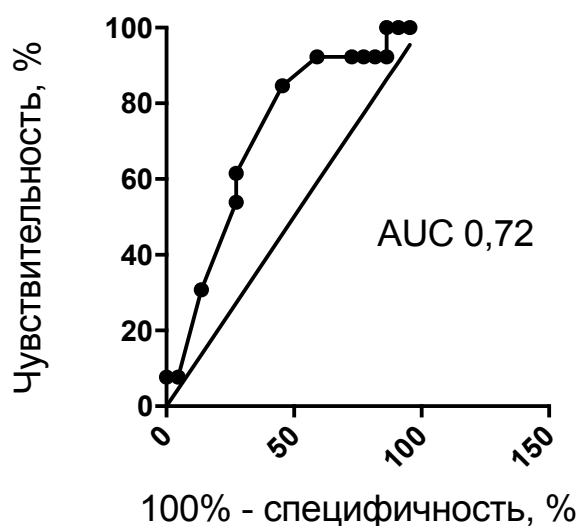
Площадь под ROC-кривой для индекса соотношения  $CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$  была выше, составляя 0,75, и при значении индекса  $>1,19$  позволяла прогнозировать неблагоприятный исход с чувствительностью 71% и специфичностью 67% (Рис. 4А).

Характерно, что комбинация двух показателей (индекса  $CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$  и балла NIHSS) улучшала качество модели до уровня «очень хорошего» (Рис. 4Б). В этом случае неблагоприятный исход прогнозировался с чувствительностью 79% и специфичностью 75%.



**Рисунок 4** – Прогностическая значимость индекса  $CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$  в качестве предиктора (А) и в комбинации с NIHSS (Б) в качестве предиктора неблагоприятного 3-месячного исхода

Помимо Т-клеток с регуляторной активностью прогностическая значимость в качестве биомаркера исхода была также выявлена для М-МС (CD14+HLA-DR-). Площадь под кривой в данной модели составляла 0,72, соответствуя хорошему качеству прогноза (Рис. 5, таблица 34).

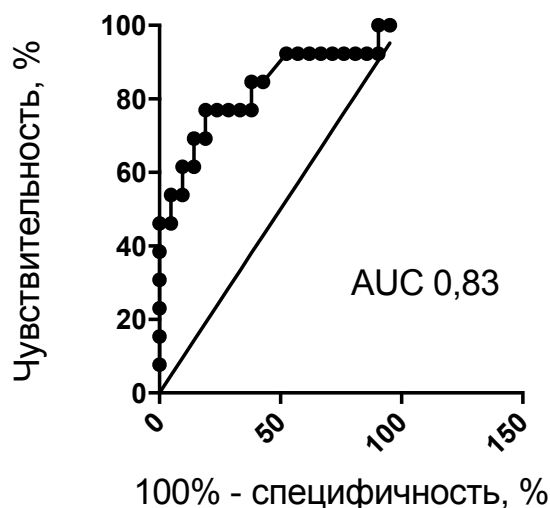


**Рисунок 5** – Прогностическая значимость CD14+HLA-DR- клеток в качестве предиктора 3-месячных исходов у больных ишемическим инсультом (ROC-анализ)

При значении относительного содержания М-МС  $< 3,5\%$  неблагоприятный исход прогнозировался с чувствительностью 85% и специфичностью 55%. Комбинация двух показателей - CD14+HLA-DR- клеток и балла NIHSS позволяла улучшить качество модели до уровня «очень хорошего» (табл. 31). В этом случае площадь под кривой достигала 0,83, а специфичность увеличивалась до 62% (рис. 6).

Таблица 34 - Прогностическая значимость CD14+HLA-DR- МС в оценке 3-месячных исходов у больных ишемическим инсультом (ROC-анализ)

Параметр	AUC	P- достоверность	Чувствитель- ность (%)	Специфич- ность (%)
CD14+HLA-DR-	0,72	0,03	85%	55%
CD14+ HLA-DR- + NIHSS	0,83	0,002	85%	62%



**Рисунок 6** – Прогностическая значимость М-МС + NIHSS в оценке 3-х месячных исходов у больных ИИ (ROC-анализ)

Полученные данные позволили заключить, что индекс соотношения  $CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$  клеток в остром периоде ИИ, а также относительное содержание М-МС характеризуются прогностической значимостью в отношении развития инфекционных осложнений и 3-месячных исходов. При этом комбинация указанных маркеров с баллом NIHSS повышает качество прогностической модели.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный на начальном этапе анализ значимости воспалительной реакции показал, что выраженность системного воспаления прямо ассоциирована с тяжестью ИИ. На это указывают более высокие показатели лейкоцитоза, НЛИ и уровня СРБ у пациентов с тяжелым ИИ (по сравнению с легким ИИ), а также наличие прямой корреляционной взаимосвязи параметров системного воспаления с баллом NIHSS, что согласуется с данными литературы [162]. Иммунный ответ, индуцированный ишемическим повреждением головного мозга, является основой воспалительного ответа и важнейшим патогенетическим звеном ИИ [6]. Умеренная воспалительная реакция необходима для ограничения очага

повреждения, защиты от патогенов и активации репаративных процессов. В то же время избыточное воспаление приводит к дополнительному повреждению нервной ткани и является причиной постинсультной иммуносупрессии, обуславливающей инфекционные осложнения и ассоциированную с ними летальность [9,10]. Учитывая этот факт, баланс клеток, усиливающих и подавляющих воспалительный ответ, может быть биомаркером тяжести инсульта, выраженности воспалительного ответа и развития иммунодепрессии, а также эффективности неврологического восстановления.

Роль Т-клеток в модуляции воспалительного ответа и патогенезе инсульта исследована в основном на экспериментальных моделях у животных [20, 163]. Полученные в настоящей работе результаты показали, что развитие системной воспалительной реакции у больных ИИ в первые 24-48 ч после инсульта сопровождается изменениями в содержании и балансе Т-клеток с регуляторной активностью. Это проявляется снижением клеток с фенотипом Th1 ( $CD4^+IFN\gamma^+$ ) и возрастанием Т-клеток с фенотипом Treg ( $CD4^+CD25^{hi}$ ). Повышенное содержание в кровотоке Treg в остром периоде инсульта согласуется с данными литературы и позиционируется в качестве протективного механизма [18, 19]. Продемонстрированная в настоящей работе прямая взаимосвязь  $CD4^+IFN\gamma^+$  Т-клеток с уровнем СРБ и обратная зависимость  $CD4^+CD25^{hi}$  Т-клеток с концентрацией СРБ и НЛИ свидетельствует о возможном участии этих субпопуляций, соответственно, в позитивной и негативной регуляции системного воспалительного ответа. Кроме того, выявленная обратная взаимосвязь между относительным количеством  $CD4^+IFN\gamma^+$  и  $CD4^+CD25^{hi}$  Т-клеток позволяет предположить, что Treg в остром периоде инсульта могут ингибировать Th1 ответ.

Важно отметить, что системный воспалительный ответ, индуцированный ишемическим поражением мозговой ткани, у больных ИИ быстро сменяется системной иммуносупрессией, являющейся ведущей причиной инфекционных осложнений и летальности при ИИ [25]. Ведущая

роль в развитии иммуносупрессии отводится активации симпатoadреналовой системы [10]. Тем не менее, поскольку Treg могут подавлять функции клеток врожденного иммунитета [17] и ингибировать Th1 ответ [164], вопрос об их причастности к развитию инфекционных осложнений в раннем постинсультном периоде остается открытым. Проведенные исследования показали, что у пациентов с отсутствием инфекции регистрировалось более выраженное возрастание  $CD4^+CD25^{hi}$  Т-клеток и снижение  $CD4^+IFN\gamma^+$  Т-клеток и уменьшение индекса соотношения этих клеток. Таким образом, изменение баланса в сторону снижения Th1 и увеличения Treg оказывало протективный эффект. Более того, учитывая 4-кратные различия в индексе  $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$  у пациентов с наличием и отсутствием инфекции, данный показатель при проведении ROC-анализа продемонстрировал прогностическую значимость, позволяя оценивать риск развития ранних (в течение 28 суток) инфекционных осложнений с чувствительностью 86% и специфичностью 69%, что соответствует хорошему качеству прогноза ( $AUC=0,78$ ).

Важным результатом работы является также выявление различий в содержании и соотношении  $CD4^+IFN\gamma^+$  и  $CD4^+CD25^{hi}$  Т-клеток у пациентов с противоположными исходами, в частности, более высокий уровень  $CD4^+IFN\gamma^+$  Т-клеток и индекс соотношения Th1/Treg при неблагоприятном 3-х месячном исходе. Эти данные являются еще одним подтверждением негативной роли  $CD4^+IFN\gamma^+$  Т-клеток и позитивной роли  $CD4^+CD25^{hi}$  Т-клеток в остром периоде инсульта. Важно подчеркнуть, что сведения об изменениях  $IFN-\gamma$  продуцирующих  $CD4^+$  Т-клеток в первые дни после ИИ у человека отсутствуют. Поэтому полученные результаты об изменении содержании  $CD4^+IFN\gamma^+$  Т-клеток, а также их взаимосвязи с воспалительным ответом, развитием инфекционных осложнений и исходами являются новыми фактами. В модели окклюзии среднемозговой артерии у мышей установлено, что  $IFN-\gamma$  усиливает экспрессию в головном мозге провоспалительного белка

IP-10, что обуславливает нейродеструктивный эффект. В то же время уменьшение уровня IFN- $\gamma$  при введении IFN- $\gamma$ -нейтрализующих антител уменьшает объем ишемического поражения мозга и улучшает неврологическое восстановление [27]. Результаты настоящей работы показывают, что у человека IFN- $\gamma$ , по-видимому, также играет негативную роль в первые 24-48 час после ИИ. Кроме того, значительные различия, выявленные нами в индексе соотношения CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> Т-клеток у пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом, указывают на возможность использования данного показателя в качестве прогностического критерия для оценки риска неблагоприятного исхода уже в остром периоде. Действительно, прогностическая модель, основанная на оценке индекса CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> в качестве монопредиктора характеризовалась «хорошим» качеством прогноза, а комбинация данного показателя с баллом NIHSS - «очень хорошим» качеством прогноза. Предсказание исхода инсульта имеет важное значение для оптимизации лечения и обоснования персонализированной терапии [165]. Полученные нами данными позволяют предположить, что перспективным биомаркером в этом плане может быть соотношение клеток с фенотипом Th1 и Treg и комбинация этого индекса с NIHSS. Тем не менее, для валидации этой прогностической модели требуются дальнейшие исследования на большей выборке.

При анализе миелоидных клеток с регуляторной активностью основное внимание было сосредоточено на субпопуляциях моноцитов и миелоидных супрессоров. Роль моноцитов в иммунном ответе связывают как с их непосредственным участием в индукции и регуляции иммунного ответа, процессах репарации и ангиогенеза, так и способностью пополнять пул макрофагов и дендритных клеток [136, 138]. Острофазовый ответ при ИИ сопровождается активацией моноцитов и их рекрутированием в зону ишемического поражения мозга. В экспериментальных моделях инсульта показано, что моноциты могут обладать как деструктивной, так и



протективной функцией, что может быть обусловлено гетерогенностью этих клеток, а также тяжестью поражения и временным окном [59, 60]. Клинические исследования демонстрируют возрастание циркулирующих моноцитов в остром периоде ИИ [29, 148], что обуславливает снижение лимфоцитарно-моноцитарного индекса. При этом более выраженное повышение моноцитов и снижение лимфоцитарно-моноцитарного индекса ассоциировано с неблагоприятным исходом [148, 149, 103].

Проведенные нами исследования также выявили увеличение моноцитов (в виде тенденции) и достоверное снижение лимфоцитарно-моноцитарного индекса в остром периоде ИИ, что согласуется с данными литературы. Помимо этого, у больных наблюдались достоверные изменения в субпопуляционном составе моноцитов – уменьшение доли классических и возрастание промежуточных и альтернативных моноцитов, приводящее к существенному снижению соотношения CD16<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup> моноцитов. Эти изменения выявлялись независимо от степени тяжести инсульта и в целом по группе не коррелировали с баллом NIHSS. В то же время в группе пациентов со средней и тяжелой степенью тяжести ИИ концентрация СРБ (как высокочувствительного маркера системного воспалительного ответа) обратно коррелировала с относительным содержанием классических моноцитов и прямо с долей CD16-позитивных моноцитов (промежуточные + неклассические моноциты). Эти данные свидетельствуют о противовоспалительной активности классических моноцитов и провоспалительной активности промежуточных/альтернативных моноцитов. Схожие результаты о нейропротективной активности классических моноцитов при ИИ получены в модели экспериментального инсульта и объясняются тем, что Ly6C<sup>hi</sup> моноциты (аналог классических моноцитов человека) в силу высокой экспрессии CCR2 [147] мигрируют в ткани мозга и поляризуются в M2 макрофаги, обладающие противовоспалительной и нейрорегенеративной активностью [139, 140]. В качестве другого механизма нейропротекции обсуждается способность классических моноцитов под

воздействием низких доз LPS приобретать толерогенный фенотип и оказывать локальный противовоспалительный эффект после миграции в ткани мозга [143].

Еще одной обнаруженной нами особенностью стало выявление различий в индексе соотношения промежуточных и альтернативных моноцитов. Данный индекс в группе с инфекционными осложнениями был достоверно выше, чем в оппозитной группе, в силу более выраженного возрастания промежуточных моноцитов и меньшим увеличением неклассических моноцитов. Более высокий индекс соотношения промежуточных и неклассических моноцитов отмечался также в группе с неблагоприятным 3-месячным исходом (в сравнении с оппозитной группой), однако в этом случае проявлялся в виде выраженной тенденции ( $p=0,066$ ) и был обусловлен более выраженным возрастанием промежуточных моноцитов.

Данные литературы о субпопуляциях моноцитов в остром периоде ИИ у человека немногочисленны и противоречивы. Urra X et al. выявили возрастание промежуточных и снижение неклассических моноцитов. При этом содержание CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> клеток находилось в обратной взаимосвязи с летальностью, а количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> клеток – в обратной зависимости с неблагоприятным исходом и размером зоны инфаркта, что позволило сделать заключение о протективном эффекте промежуточных и неклассических моноцитов в первые сутки ИИ [28, 13]. Позже Kaito M. et al., также продемонстрировали возрастание доли промежуточных- и снижение доли неклассических моноцитов. Однако более высокий уровень CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> клеток ассоциировался с прогрессированием зоны инфаркта, а уменьшение неклассических моноцитов (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) – с развитием инфекции [29]. Эти результаты позволили сделать предположение о тканедеструктивном действии промежуточных моноцитов и протективном эффекте неклассических моноцитов в острой фазе инсульта.

Полученные нами результаты о повышенном содержании промежуточных моноцитов согласуются с данными Urra X et al. и Kaito M. et al. [28, 13, 29]. Однако в отличие от этих авторов мы также выявили увеличение неклассических моноцитов. Имеющиеся расхождения могут быть связаны с особенностями контрольной группы, которая в работе Kaito M. et al. была представлена не донорами, а пациентами с нейродегенеративными заболеваниями; а также различиями в контингенте больных, типе используемых антител и особенностях гейтирования. Тем не менее, данные о более низком содержании неклассических моноцитов в группе с инфекцией (по сравнению с оппозитной группой) согласуются с результатами Kaito M. et al. [29].

Учитывая, что активация моноцитов сопровождается усилением экспрессии CD16 [13, 150], меньшее содержание неклассических моноцитов в группе с инфекционными осложнениями может отражать деактивацию моноцитов. Другой причиной может быть диапедез и экстравазация этих клеток [13]. Наконец, меньшее количество неклассических моноцитов может быть результатом более высокого уровня кортизола, поскольку глюкокортикоиды избирательно индуцируют апоптоз CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> клеток [151]. Поскольку функция этих неклассических моноцитов связана с патрулированием сосудистого русла [139, 147], уменьшение их содержания может повышать предрасположенность к развитию инфекционных осложнений.

Данные об изменениях МС при ИИ и их значении в патогенезе инсульта практически отсутствуют. В единственном исследовании у мышей Kawano T. et al. продемонстрировали возрастание Г-МС (CD11b<sup>+</sup>Ly6ClowLy6G<sup>+</sup> клеток) через 24 часа после временной окклюзии среднемозговой артерии в селезенке и через 72 часа - в ишемизированном полушарии (как в ядерной, так и пограничной зонах инфаркта). По сравнению с нейтрофилами, эти клетки характеризовались более высокой экспрессией мРНК Nox2 и CHOP, что подтверждало их принадлежность к

МС [32]. Учитывая эти факты, часть нейтрофилов, которая при гистологических исследованиях инфильтрирует ишемизированные ткани мозга уже через 48-72 часа, может быть представлена Г-МС.

Подобно другим типам клеток с иммунорегуляторной активностью, МС могут играть двойственную роль в системном воспалительном ответе. Так, исследования при инфекции и сепсисе показывают, что экспансия МС в результате «усиленного» миелопоэза обеспечивает первую линию защиты от микробной инвазии (за счет продукции этими клетками реактивных метаболитов кислорода и активных форм азота) и противодействует развитию чрезмерной воспалительной реакции, приводящей к полиорганной недостаточности. С другой стороны, МС могут оказывать негативное действие, участвуя в развитии и поддержании иммуносупрессии, что может приводить к постинсультной лимфопении и инфекционным осложнениям. Иммуносупрессивная активность МС наиболее хорошо исследована при опухолевом росте. МС способны поддерживать опухолевый рост за счет подавления активации и пролиферации Т-клеток [166]. Поэтому подавление МС–индуцированной иммуносупрессии рассматривается в качестве новой мишени в терапии больных раком [167]. Кроме того, показано, что МС могут ингибировать иммунный ответ при хронических инфекциях, травме, сепсисе и других патологических состояниях [167]. Например, повышенное количество МС при сепсисе ассоциируется с утяжелением состояния, развитием нозокомиальной инфекции и летальными исходами [168], в связи с чем улучшение исходов связывают с ослаблением МС-индуцированной иммуносупрессии путем подавления миграции МС или стимуляции их дифференцировки в зрелые миелоидные клетки.

Проведенные нами исследования показали, что возрастание численности МС в остром периоде ИИ не связано с развитием инфекционных осложнений. Напротив, более выраженное возрастание МС с фенотипом ранних и гранулоцитарных МС ассоциировано с меньшей тяжестью и выраженностью системного воспалительного ответа. Учитывая

нейротоксический эффект избыточного воспалительного ответа, выявление обратной взаимосвязи между содержанием Р-МС и Г-МС и меньшей тяжестью/воспалительным ответом свидетельствует о позитивной роли этих субпопуляций МС. Другим аргументом в пользу позитивной роли МС в остром периоде ИИ являются данные о корреляции М-МС с эффективностью функционального восстановления и более высоком содержании этих клеток у пациентов с благоприятным исходом. Так, МС могут ослаблять нейровоспаление посредством подавления иммунного ответа  $\gamma\delta$  Т-клеток, CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (индуцированного ишемическим повреждением мозговой ткани) [168, 105, 87], индукции Treg [169], а также ограничения процессов активации микроглии [170]. Действительно, HMGB1-R сигналинг способствует экспансии CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>+</sup>MHC-II<sup>low</sup> клеток, участвующих в разрешении воспаления в модели ИИ у мышей [171]. Аналогичным образом, в модели спинно-мозговой травмы у мышей показана способность М-МС ингибировать острое воспаление и оказывать в последующем репаративный эффект [172]. Стимулирующее действие М-МС на процессы репарации может быть связано со способностью этих клеток дифференцироваться в М2-подобные макрофаги [173] и индуцировать М2 поляризацию макрофагов [174], характеризующихся прорегенеративным потенциалом [175], а также прямым усиливающим действием на рост нейронов [161].

В целом, полученные данные свидетельствуют о протективной роли клеток с иммуносупрессорной активностью в остром периоде ИИ, а возрастание их количества не связано с развитием инфекционных осложнений.

## 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 ( $\text{NIHSS} \geq 8$ ) 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 ( $\text{CD4}+\text{CD25}^{\text{hi}}$ ) и снижением Т-клеток с фенотипом Th1 ( $\text{CD4}+\text{IFN}\gamma^+$ ); повышением доли промежуточных и неклассических моноцитов и снижением классических моноцитов, а также увеличение трех субпопуляций миелоидных супрессоров (Р-МС, М-МС и Г-МС). При этом выявление достоверных прямых- (для  $\text{CD4}+\text{IFN}\gamma^+$  Т-клеток и  $\text{CD16}^+$  моноцитов) и обратных (для  $\text{CD4}+\text{CD25}^{\text{hi}}$ ,  $\text{CD14}+\text{CD16}^-$  и  $\text{Lin-CD33}^+$  клеток) корреляционные 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  $\text{CD4}+\text{CD25}^{\text{hi}}$  Т-клеток с содержанием  $\text{HLA-DR-CD33}^+\text{CD66}^+$  клеток и обратной – с уровнем  $\text{CD4}+\text{IFN}\gamma^+$  клеток позволяет предполагать, что увеличение МС способствует экспансии Treg, а Treg подавляют генерацию Th1.

Сравнение исследуемых субпопуляций в группах, оппозирующих 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 $\gamma$ + Т-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 $\gamma$ + Т-лимфоцитов в остром периоде являются факторами, снижающими риск развития инфекционных осложнений и неблагоприятного исхода, что свидетельствует о позитивной роли CD4+CD25<sup>hi</sup> Т-клеток и негативной роли CD4+IFN $\gamma$ + Т-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> Т-клеток с параметрами воспаления и долей CD4+IFN $\gamma$ + Т-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  $CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$  является информативным маркером для прогнозирования риска возникновения ранних (в течение первых 28 суток) инфекционных осложнений. Кроме того, оценка индекса  $CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$  и относительного содержания моноцитарных МС ( $CD14+HLA-DR-$ ) позволяет прогнозировать неблагоприятный 3-месячный исход. Причем комбинация индекса  $CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$  с баллом по NIHSS улучшает качество прогноза. Таким образом, индекс Th1/Treg ( $CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$ ) 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 ( $CD4+CD25^{hi}$ ) и снижением Т-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++CD16- и Lin-CD33+ 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 с более чем двукратным уменьшением относительного риска развития инфекции.

5.Содержание CD4+CD25<sup>hi</sup> Treg и МС (CD14+HLA-DR- и HLA-DR-CD33+CD66+) 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-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 содержанием CD14+HLA-DR- клеток в остром периоде инсульта характеризуются прогностической значимостью при использовании в качестве предикторов инфекционных осложнений и неблагоприятного 3-

месячного исхода. При этом комбинация индекса  $CD4+IFN\gamma+/CD4+CD25^{hi}$  или относительного количества  $CD14+HLA-DR$ - клеток с баллом NIHSS улучшает качество прогноза.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.**

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ рекомендованных ВАК, включая 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ.

1. 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
2. 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
3. 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.
4. 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 (abstract #0143), DOI:10.1080/02699052.2017.1312145
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  $CD4+CD25^{hi}$  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
P-MC	Ранние миелоидные супрессоры
M-MC	Моноцитарные миелоидные супрессоры
G-MC	Гранулоцитарные миелоидные супрессоры
WSO	World Stroke Organization
DAMPs	Молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждением
PAMPs	Патоген-ассоциированный молекулярный фрагмент
CD	Кластер дифференцировки
HLA-DR	Фактор МНС II класса
Th1	Субпопуляция Т-хелперных клеток 1 типа
Treg	Т-регуляторные клетки
IFN- $\gamma$	Интерферон-гамма
IL	Интерлекин
СРБ	С-реактивный белок
NIHSS	Шкала инсульта национального института здоровья
mRS	Модифицированная 6-бальная шкала Рэнкина
мо-МФ	Макрофаги моноцитарного происхождения
HMGB1	белок из группы ядерных негистоновых белков HMG

### Список литературы.

1. WSO, Annual Report, 2015 г.
2. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга // М., 2001. 327 с.
3. Черных В.А., Пронкина Н.В., Шевела Е.Я., Ступак В.В., Рабинович С.С.1, Черных Е.Р., Останин А.А. Иммуномодулирующий эффект циркулирующих костномозговых предшественников как возможный механизм нейропротекции при черепно-мозговой травме // медицинская иммунология. – 2014, – Т. 16. – № 6. – С. 577-586.
4. Ekker M.S., Verhoeven J.I., Vaartjes I., van Nieuwenhuizen K.M., Klijn C.J.M., de Leeuw F.E. Stroke incidence in young adults according to age, subtype, sex, and time trends // Neurology. – 2019. – V. 92. – № 21. – P.2444-2454.

5. Kuzma E., Lourida I., Moore S.F., Levine D.A., Ukoumunne O.C., Llewellyn D.J. Stroke and dementia risk: a systematic review and meta-analysis // *Alzheimers Dement.* – 2018. – V. 14. – № 11. – P.1416-1426.
6. Rayasam A., Hsu M., Kijak J.A., Kissel L., Hernandez G., Sandor M., Fabry Z. Immune responses in stroke: how the immune system contributes to damage and healing after stroke and how this knowledge could be translated to better cures? // *Immunology.* – 2018. – V. 154. – № 3. – P.363-376.
7. Jin R., Yang G., Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells // *J. Leukoc Biol.* – 2010. – V. 87. – № 5. – P. 779-89.
8. Moskowitz M.A., Lo E.H., Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments // *Neuron.* – 2010. – V. 67. – № 2. – P.181-98.
9. Jayaraj R.L., Azimullah S., Beiram R., Jalal F.Y., Rosenberg G.A. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke // *J Neuroinflammation.* – 2019. – V. 16. – №1. – P.142.
10. Vogelgesang A. Catecholamines, steroids and immune alterations in ischemic stroke and other acute diseases // *Aging Dis.* – 2014. – V.5. – № 5. – P.327-39
11. Cieslak M., Wojtczak A., Cieslak M. Relationship between the induction of inflammatory processes and infectious diseases in patients with ischemic stroke // *Acta Biochim Pol.* – 2013. – V 60. - № 3. - P. 345-9.
12. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. // *Blood.* – 2010. – V. 116. – № 16. – P. 74-80.
13. Urra X., Cervera A., Obach V., Climent N., Planas A.M et al. Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke // *Stroke.* – 2009. – V. 40. – №4. – P. 1262-1268.
14. Leys D., Henon H., Mackowiak-Cordoliani M.A., Pasquier F. Poststroke dementia // *Lancet Neurol.* – 2005. – V.4. – № 11. – P. 752–759.
15. Liesz A., Zhou W., Na S.Y., Himmerling G.J., Garbi N., Karcher S., Mracsko E., Backs J., Rivest S., Veltkamp R. Boosting regulatory T cells limits

- neuroinflammation in permanent cortical stroke. // J Neurosci. – 2013. – V. 33. – № 44. – P.17350-62
- 16.Heusinkveld M., de Vos van Steenwijk P.J., Goedemans R., Ramwadhoebe T.H., Corter A., Welters M.J., van Hall T., van der Burg S.H. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells // J Immunol. – 2011. – V. 187. – № 3. – P. 1157-1165.
- 17.Okeke E.B., Uzonna J.E. The pivotal role of regulatory T cells in the regulation of innate immune cells // Front Immunol. – 2019. –№10. – P. 680.
- 18.Liesz A., Kleinschnitz C. Regulatory T cells in post-stroke immune homeostasis // Transl Stroke Res. – 2016. – V.7. – № 4. – P.313-321.
- 19.Yan J., Read S.J., Henderson R.D., Hull R., O'Sullivan J.D., McCombe P.A., Greer J.M. Frequency and function of regulatory T cells after ischaemic stroke in humans // J. Neuroimmunol. – 2012. – V. 243. – №.1-2. – P.89-94.
- 20.Brait V. H., Arumugam T. V., Drummond G. R., Sobey C. G. Importance of T lymphocytes in brain injury, immunodeficiency and recovery after cerebral ischemia // J. Cereb. Blood. – 2012. – № 32. – P.598-611.
- 21.Li P.Y., Mao L.L., Liu X.R., Gan Y., Zheng J., Thomson A.W. et al. Essential role of program death 1-ligand 1 in regulatory T-Cell-afforded protection against blood-brain barrier damage after stroke // Stroke. – 2012. – № 45. – P. 857-864.
- 22.Saino O., Taguchi A., Nakagomi T., Nakano-Doi A., Kashiwamura S., Doe N. et al. Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke // J Neurosci Res. – 2010. – V.88. – P.2385-2389.
- 23.Zouggari Y., Ait-Oufella H., Waeckel L., Vilar J., Loinard C., Cochain C., Recalde A., Duriez M., Levy B.I., Lutgens E., Mallat Z., Silvestre J.S. Regulatory T cells modulate postischemic neovascularization // Circulation. – 2009. – №120. – P.1415-25.

24. Kleinschnitz C., Kraft P., Dreykluft A., Hagedorn I., Gobel K., Schuhmann M.K. Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature // *Blood*. – 2013. – V.121. – №4. – P.679-691.
25. Shi K., Wood K., Shi F.-D., Wang X., Liu Q. Stroke-induced immunosuppression and poststroke infection // *Stroke Vasc Neurol*. – 2018. – V 3. – № 1. – P.34-41.
26. Yilmaz A., Fuchs T., Dietel B., Altendorf R., Cicha I., Stumpf C., Schellinger P.D., Blumcke I., Schwab S., Daniel W.G., Garlischs C.D., Kollmar R. Transient decrease in circulating dendritic cell precursors after acute stroke: potential recruitment into the brain // *Clin Sci (Lond)*. – 2009. – V118. – №2. – P.147-57.
27. Seifert H.A., Collier L.A., Chapman C.B., Benkovic S.A., Willing A.E., Pennypacker K.R. Pro-inflammatory interferon gamma signaling is directly associated with stroke induced neurodegeneration // *J. Neuroimmune Pharmacol*. – 2014. – V 9. – № 5. – P.679-689.
28. Urra X., Villamor N., Amaro S., Gymez-Choco M., Obach V. et al. Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2009. – V.29. – №5. – P.994-1002.
29. Kaito M., Araya S., Gondo Y., Fujita M., Minato N., Nakanishi M., et al. Relevance of distinct monocyte subsets to clinical course of ischemic stroke patients // *PLoS One*. – 2013. – V.8. – P.69409.
30. Veglia F., Perego M., Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age // *Nat Immunol*. – 2018. – V.19. – №2. – P.108–19.
31. Uhel F., Azzaoui I., Grégoire M., Pangault C., Dulong J., Tadié J.M., Gacouin A., Camus C., Cynober L., Fest T., Le Tulzo Y., Roussel M., Tarte K. Early expansion of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor cells predicts development of nosocomial infections in septic patients // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 2017. – V. 196. – № 3. – P.315–327.

32. Kawano T., Shimamura M., Nakagami H., Kanki H., Sasaki T., Mochizuki H. Temporal and spatial profile of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs) in ischemic stroke in mice // *PLoS One*. – 2019. – V. 14. – №5. – P. 0215482.
33. Hongtao Zhang. Progress in Research on the Mechanism and Treatment of Poststroke Infection // *Infection International*. – 2016. – V. 5. - № 3.
34. Esmaili A., Dadkhahfar S., Fadakar K., Rezaei N. Post-stroke immunodeficiency: effects of sensitization and tolerization to brain antigens // *Int Rev Immunol*. – 2012. – V.31. – №5. – P. 396-409.
35. Ajmo C.T. Jr., Vernon D.O., Collier L., Hall A.A., Garbuzova-Davis S., Willing A., Pennypacker K. R. The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration // *J Neurosci Res*. – 2008. – V. 86. – № 10. – P. 2227-2234.
36. Al'Qteishat A., Gaffney J., Krupinski J., Rubio F., West D., Kumar S., Kumar P., Mitsios N., Slevin M. Changes in hyaluronan production and metabolism following ischaemic stroke in man // *Brain*. – 2006. – V. 129. – № 8. – P. 2158-2176.
37. Anne M., Juha K., Timo M., Mikko T., Olli V., Kyosti S., Heikki H., Vilho M. Neurohormonal activation in ischemic stroke: effects of acute phase disturbances on long-term mortality // *Curr Neurovasc Res*. – 2007. – V. 4. – № 3. – P. 170-175.
38. Becker K., Kindrick D., McCarron R., Hallenbeck J., Winn R. Adoptive transfer of myelin basic protein-tolerized splenocytes to naive animals reduces infarct size: a role for lymphocytes in ischemic brain injury? // *Stroke*. – 2003. – V. 34. – №. 7. – P. 1809-1815.
39. Becker K.J., Kalil A.J., Tanzi P., Zierath D.K., Savos A.V., Gee J.M., Hadwin J., Carter K.T., Shibata D., Cain K.C. Autoimmune responses to the brain after stroke are associated with worse outcome // *Stroke*. – 2011. – V. 42. – № 10. – P. 2763-2769.

40. Becker K.J., Kindrick D.L., Lester M.P., Shea C., Ye Z.C. Sensitization to brain antigens after stroke is augmented by lipopolysaccharide // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2005. – V. 25. – № 12. – P. 1634-1644.
41. GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators, et al. Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016 // *N Engl J Med.* – 2018. – V. 379. – № 25. – P. 2429-2437.
42. Bhatt N., Malik A.M., Chaturvedi S. Ovbiagele B. et al. Stroke in young adults: five new things // *Neurol Clin Pract.* – 2018. – V. 8. – № 6. – P. 501–506.
43. Toledo J.B. et al. Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre // *Brain.* – 2013. – № 136 (pt 9). – P. 2697-2706.
44. Neumann S., Shields N.J., Balle T., Chebib M., Clarkson A.N. Innate immunity and inflammation post-stroke: an  $\alpha 7$ -nicotinic agonist perspective // *Int J Mol Sci.* – 2015. – V. 16. – № 12. – P. 29029-29046.
45. Denes A., McColl B.W., Leow-Dyke S.F., Chapman K.Z., Humphreys N.E., Grencis R.K., Allan S.M., Rothwell N.J. Experimental stroke-induced changes in the bone marrow reveal complex regulation of leukocyte responses // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2011. – V. 31. – № 4. – P. 1036-1050.
46. Offner H., Subramanian S., Parker S.M., Afentoulis M.E., Vandenbark A.A., Hurn P.D. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2006. – V. 26. – № 5. – P. 654-665.
47. Offner H., Subramanian S., Parker S.M., Wang C., Afentoulis M.E., Lewis A., Vandenbark A.A., Hurn P.D. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages // *J Immunol.* – 2006. – V. 176. – № 11. – P. 6523-6531.
48. Offner H., Vandenbark A.A., Hurn P.D. Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression // *Neuroscience.* – 2009. – V. 158. – № 3. – P. 1098-1111.



49. Oppenheim J.J., Tewary P., de la Rosa G., Yang D. Alarmins initiate host defense // *Adv Exp Med Biol.* – 2007. – V. 601. – P. 185-194.
50. Ostrowski R.P., Schulte R.W., Nie Y., Ling T., Lee T., Manaenko A., Gridley D.S., Zhang J.H. Acute splenic irradiation reduces brain injury in the rat focal ischemic stroke model // *Transl Stroke Res* – 2012. – V. 3. – № 4. – P. 473-481.
51. London A., Cohen M., Schwartz M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair // *Frontiers in Cellular Neuroscience* April. – 2013. – V. 7. – № 34
52. Xu X., Jiang Y. The Yin and Yang of innate immunity in stroke // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – V. 2014. – P. 8.
53. Chamorro A., Meisel A., Planas A.M., Urra X., vandeBeek D., Veltkamp R. “The immunology of acute stroke,” // *Nature Reviews. Neurology.* – 2012. – V. 8. – № 7. – P. 401-410.
54. Hu X., Leak R.K., Shi J., Suenaga J., Gao Y., Zheng P., Chen J. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair // *Nat Rev Neurol.* – 2015. – V. 11. – № 1. – P. 56–64.
55. Iadecola C., Buckwalter M.S., Anrather J. Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential // *J Clin Invest.* – 2020. – V. 130. – № 6. – P. 2777-2788.
56. Schwartz M., London A., Shechter R. Boosting T-cell immunity as a therapeutic approach for neurodegenerative conditions: the role of innate immunity // *Neuroscience.* – 2009. – V. 158. – № 3. – P. 1133-42.
57. Balch M.H.H., Nimjee S.M., Rink C., Hannawi Y. Beyond the Brain: The Systemic Pathophysiological Response to Acute Ischemic Stroke // *J Stroke.* – 2020. – V. 22. – № 2. – P. 159-172.
58. Qin X., Akter F., Qin L., Cheng J., Guo M., Yao S., Jian Z., Liu R., Wu S. Adaptive Immunity Regulation and Cerebral Ischemia // *Front Immunol.* – 2020. – № 11. – P. 689.

- 59.ElAli A., Jean Le Blanc N. The Role of Monocytes in Ischemic Stroke Pathobiology: New Avenues to Explore // *Front Aging Neurosci.* – 2016. - №8 – P. 29.
- 60.Gliem M., Schwaninger M., Jander S. Protective features of peripheral monocytes/macrophages in stroke // *Biochim Biophys Acta.* - 2016. - V. 1862. - № 3. – P.329-38.
- 61.Tsai A.S., Berry K., Beneyto M.M. et al. A year-long immune profile of the systemic response in acute stroke survivors // *Brain.* – 2019. – V. 142. – №4. – P. 978–991.
- 62.Iadecola C., Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation // *Nat Med.* – 2011. – № 17. – P.796–808.
- 63.Jin W.N., Shi S.X., Li Z., Li M., Wood K., Gonzales R.J., Liu Q. Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2017. – V. 37. – № 6. – P.2224-2236.
- 64.Taylor R.A., and Sansing L.H. Microglial responses after ischemic stroke andintracerebral hemorrhage // *Clin. Dev.Immunol.* – 2013. P.746068.
- 65.Lopes Pinheiro M.A., Kooij G., Mizze M.R., Kamermans A., Enzmann G., Lyck R., Schwaninger M., Engelhardt B., de Vries H.E. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2016. – V. 1862. – № 3. – P. 461-71.
- 66.Easton A.S. Neutrophils and stroke - can neutrophils mitigate disease in the central nervous system? // *Int Immunopharmacol.* – 2013. – V.17. – № 4. – P. 1218-25.
- 67.Cuartero M.I., Ballesteros I., Moraga A., Nombela F., Vivancos J., Hamilton J.A., Corbi A.L., Lizasoain I., Moro M.A. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone // *Stroke.* – 2013. – V. 44. – № 12. – P. 3498-508.
- 68.Garcia-Culebras A., Duran-Laforet V., Pena-Martinez C., Moraga A., Ballesteros I., Cuartero M.I., de la Parra J., Palma-Tortosa S., Hidalgo A.,

- Corbi A.L., Moro M.A., Lizasoain I. Role of TLR4 (Toll-Like Receptor 4) in N1/N2 Neutrophil Programming After Stroke // *Stroke*. – 2019. – V. 50. – № 10. – P. 2922-2932.
69. Breckwoldt M.O., Chen J.W., Stangenberg L., Aikawa E., Rodriguez E., Qiu S., Moskowitz M.A., Weissleder R. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2008. – V. 105. – № 47. – P. 18584-18589.
70. Dimitrijevic O. B., Stamatovic S. M., Keep R. F., and Andjelkovic A. V., “Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice // *Stroke*. – 2007. – V. 38. – № 4. – P. 1345-1353.
71. Hu X., Leak R.K., Shi J., Suenaga J., Gao Y., Zheng P., Chen J. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair // *Nat Rev Neurol*. – 2015. – V.11. – №1. – P. 56-64.
72. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K., Donnelly D.J., Popovich P.G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord // *J Neurosci*. – 2009. – V. 29. – № 43. – P. 13435-13444.
73. ElAli A. and Rivest S. Microglia in Alzheimer's disease: a multifaceted relationship // *Brain Behav. Immun*. – 2016. – № 55. – P. 138-150.
74. Hu X., Li P., Guo Y., Wang H., Leak R.K., Chen S., Gao Y., Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia // *Stroke*. – 2012. – V. 43. – № 11. – P.3063-3070.
75. Pedragosa J. et al. CCR2 deficiency in monocytes impairs angiogenesis and functional recovery after ischemic stroke in mice // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2020. – V.40. – P.98-116.
76. Kim E., Yang J., Beltran C.D., Cho S. Role of spleen-derived monocytes/macrophages in acute ischemic brain injury // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2014. – V.34. – № 8. – P.1411-1419.

77. Felger J.C., Abe T., Kaunzner U.W., Gottfried-Blackmore A., Gal-Toth J., McEwen B.S., Iadecola C., Bulloch K. Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin // *Brain Behav Immun.* – 2010. – V.24. – №5. – P.724-737.
78. Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C. et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny // *Nat Rev Immunol.* – 2014. – V.14. – P.571-578.
79. Gelderblom M., Gallizioli M., Ludewig P., Thom V., Arunachalam P., Rissiek B., Bernreuther C., Glatzel M., Korn T., Arumugam T.V., Sedlacik J., Gerloff C., Tolosa E., Planas A.M., Magnus T. IL-23 (Interleukin-23)-Producing Conventional Dendritic Cells Control the Detrimental IL-17 (Interleukin-17) Response in Stroke // *Stroke.* – 2018. – V. 49. – №1. – P.155-164.
80. Gan Y, Liu Q, Wu W, et al. Ischemic neurons recruit natural killer cells that accelerate brain infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2704–2709. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24550298>
81. Chen C., Ai Q.D., Chu S.F., Zhang Z., Chen N.H. NK cells in cerebral ischemia // *Biomed Pharmacother.* – 2019. – V109. – P.547-554.
82. Hurn P.D., Subramanian S., Parker S.M., Afentoulis M.E., Kaler L.J., Vandenbark A.A., Offner H.T. and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation // *J Cereb Blood Flow* – 2007. – V.27. – №11. – №1798-1805.
83. Kleinschnitz C., Schwab N., Kraft P., Hagedorn I., Dreykluft A., Schwarz T., Austinat M., Nieswandt B., Wiendl H., Stoll G. Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation // *Blood.* – 2010. – V.115. – №18. – P.3835-3842.
84. Brait V.H., Jackman K.A., Walduck A.K. et al. Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: gender, reperfusion, T lymphocytes, and

- Nox2-derived superoxide // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2010. – V.30. – №7. – P.1306-1317.
- 85.Liesz A., Zhou W., Mracsko E, Karcher S., Bauer H., Schwarting S., Sun L., Bruder D., Stegemann S., Cerwenka A., Sommer C., Dalpke A.H., Veltkamp R. Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke // *Brain.* – 2011. -V.134(Pt 3). - P.704-720.
- 86.Yilmaz G., Granger D.N. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury // *Neuromolecular Med.* – 2010. – V.12. - №2. – P.193-204.
- 87.Shichita T., Sugiyama Y., Ooboshi H., Sugimori H., Nakagawa R., Takada I. et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury // *Nat Med.* – 2009. – V.15. – №8. – P.946-950.
- 88.Ritzel R.M., Patel A.R., Grenier J.M. et al. Functional differences between microglia and monocytes after ischemic stroke // *J Neuroinflammation.* – 2015. – V.12. – №1. – P.106.
- 89.Gee J.M., Kalil A., Thullbery M., Becker K.J. Induction of immunologic tolerance to myelin basic protein prevents central nervous system autoimmunity and improves outcome after stroke // *Stroke.* – 2008. – V.39. - №5. – P.1575-1582.
- 90.Liesz A., Suri-Payer E., Veltkamp C. et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke // *Nat Med.* – 2009. - V.15. - №2. – P.192-199.
- 91.Ren X., Akiyoshi K., Vandenbark A.A., Hurn P.D., Offner H. CD4+FoxP3+ regulatory T-cells in cerebral ischemic stroke // *Metab Brain Dis.* – 2011. – V.26. – №1. – P.87-90.
- 92.Ren X., Akiyoshi K., Dziennis S., Vandenbark A.A., Herson P.S., Hurn P.D., et al. Regulatory B cells limit CNS inflammation and neurologic deficits in murine experimental stroke // *J Neurosci.* – 2011. – V31. – №23. – P.8556-8563

93. Caligiuri G., Nicoletti A., Poirier B. and Hansson G.K. Protective immunity again statherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice // J. Clin. Invest. – 2002. – V109. – № 6. – P.745-753.
94. Urra X., Cervera A., Obach V., Climent N., Planas A.M. and Chamorro A. Monocyte sare major player sin the prognosis and risk of infection after acute stroke // Stroke. – 2009. – V.40. – P.1262-1268.
95. Chen Y., Bodhankar S., Murphy S.J., Vandembark A.A., Alkayed N.J., and Offner H. Intrastriatal B-cell administration limits infarct size afterstrokeinB-celldeficientmice // Metab.BrainDis. – 2012. – V.27. – № 4. – P. 487-493.
96. Jin R., Zhu X., Liu L., Nanda A., Granger D.N., Li G. Simvastatin Attenuates Stroke-induced Splenic Atrophy and Lung Susceptibility to Spontaneous Bacterial Infection in Mice // Stroke. – 2013. – V.44. - №4. – P. 1135-1143.
97. Kallies A., Good-Jacobson K. L. Transcription Factor T-bet Orchestrates Lineage Development and Function in the Immune System // Trends in Immunology. – 2017. – V.38. – V. 4. – P. 287-297.
98. Wang Y., Zhang J.H., Sheng J., Shao A. Immunoreactive Cells After Cerebral Ischemia // Front Immunol. – 2019. – №10. – P.2781.
99. Seifert H.A., Offner H. The splenic response to stroke: from rodents to stroke subjects // J Neuroinflammation. – 2018. – V.15. – № 195.
100. Seifert H.A., Leonardo C.C., Hall A.A., Rowe D.D. Collier L.A. Benkovic S.A., Willing A.E., Pennypacker K.R. The spleen contributes to stroke induced neurodegeneration through interferon gamma signaling // Metab Brain Dis. – 2012. – V. 27. – № 2. – P. 131-141.
101. Malm T., Koistinaho, M., Muona, A., Magga, J., and Koistinaho J. The role andtherapeutic potential of monocytic cells in Alzheimer'sdisease // Glia. – 2010. –V.58. – №8. – P.889–900.
102. Emsley H., Hopkins S.J. Post-stroke immunodepression and infection: an emerging concept // Infect Disord Drug Targets. – 2010. – V.10. – №2. – P. 91-97.

103. Ren H., Liu X., Wang L., Gao Y. Lymphocyte-to-Monocyte Ratio: A Novel Predictor of the Prognosis of Acute Ischemic Stroke // *J Stroke Cerebrovasc Dis.* – 2017. – V. 26. – № 11. – P.2595–2602.
104. Xiao W., Guo S., Chen L., Luo Y. The role of Interleukin-33 in the modulation of splenic T-cell immune responses after experimental ischemic stroke // *J Neuroimmunol.* – 2019. – V.333. article ID 576970.
105. Yilmaz G., Arumugam T.V., Stokes K.Y., Granger D.N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke // *Circulation.* – 2006. – V.113. – № 17. – P.2105–2112.
106. Liu W., Putnum A.L., Xu-Yu Z. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> Treg cells. *J Exp Med.* – 2006. – V.203. – № 7. – P.1701-1711.
107. Masatha Thongpan, Chagriya Kitiyakara, Yada Louischaroen, Prasit Keesukphan and Sansanee C. Chaiyaroj Analysis of Foxp3, CD25, and CD127 Expressed on Regulatory T Cells in Thai Subjects // *Asian Pac J Allergy Immunol.* – 2009. – V.27. – № 2-3. – P.137-45.
108. Boyce C., Hingorani R., Vidal J., Li L. Preliminary Analytical Performance of Natural T Regulatory Cell Assays using CD127 and hFoxP3. *FOCIS Scientific Program // Clin Immunol.* – 2008. – V.127. – P.152.
109. Xiaohong Lin, Maogen Chen, Ya Liu, Zhiyong Guo, Xiaoshun He, David Brand, Song Guo Zheng Advances in distinguishing natural from induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2013. – V. 6. – № 2. – P.116-123.
110. Audrey Mohr, Rajneesh Malhotra, Gaell Mayer, Guy Gorochov and Makoto Miyara. Human FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cell heterogeneity *Clin Transl Immunology.* – 2018. – V.7. – №1. – P.1005.
111. Steven Z. Josefowicz, Li-Fan Lu and Alexander Y. Rudensky // *Annual Review of Immunology.* – 2012. – V.30., – P.531-564.
112. Vendrame M., Gemma C., Pennypacker K.R., Bickford P.C., Davis Sanberg C., Sanberg P.R., Willing A.E. Cord blood rescues stroke-induced

- changes in splenocyte phenotype and function // *Exp Neurol.* – 2006, – V. 199, – № 1. – P.191-200.
113. Ito M., Komai K., Mise-Omata S., Iizuka-Koga M., Noguchi Y., Kondo T., Sakai R., Matsuo K., Nakayama T., Yoshie O., Nakatsukasa H., Chikuma S., Shichita T., Yoshimura A. Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery // *Nature.* – 2019. – V.565 – №7738. – P.246-250.
  114. Zarriello S., Neal E.G., Kaneko Y., Borlongan C.V. T-Regulatory Cells Confer Increased Myelination and Stem Cell Activity after Stroke-Induced White Matter Injury. *J Clin Med.* – 2019. – V.8. – №4. – P.537.
  115. Ruhnau J., Schulze J., von Sarnowski B., Heinrich M., Langner S., Potschke C., Wilden A., Kessler C., Broker B.M., Vogelgesang A., Dressel A. Reduced Numbers and Impaired Function of Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Ischemic Stroke Patients. *Mediators Inflamm.* – 2016. article ID 2974605.
  116. Santamaria-Cadavid M., Rodriguez-Castro E., Rodriguez-Yanez M., Arias-Rivas S., Lopez-Dequidt I., Perez-Mato M., Rodriguez-Perez M., Lopez-Loureiro I., Hervella P., Campos F., Castillo J., Iglesias-Rey R. and Sobrino T. Regulatory T cells participate in the recovery of ischemic stroke patients // *BMC neurology.* – 2020. – V.20. – № 68.
  117. Chamorro A., Urra X., Planas A.M. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression // *Stroke.* – 2007. – V. 38. – № 3. – P.1097–1103.
  118. Wong K.L., Tai J.J., Wong W.C., Han H., Sem X., Yeap W.H. et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets // *Blood.* – 2011. – V.118. – № 5. – P.16-31.
  119. Skrzeczynska-Moncznik J., Bzowska M., Loseke S., Grage-Griebenow E., Zembala M. et al. Peripheral blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are



- main producers of IL-10 // *Scand J Immunol.* – 2008. – V.67. – №2. – P.152-159.
120. Gabrilovich D. I. Myeloid-derived suppressor cells // *Cancer Immunol Res.* – 2017. – V.5. – №1. – P.3-8.
  121. Zierath. D., Thullberg M., Hadwin J., Gee J.M., Savos A., Kalil A. et al. CNS immune responses following experimental stroke // *Neurocrit.Care.* – 2010. – V.12. - № 2., – P.274-284.
  122. Jauch E.C., Lindsell C., Broderick J., Fagan S.C., Tilley B.C., Levine S.R. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study // *Stroke.* – 2006. – V.37. – № 10. – P.2508-2513
  123. Iadecola C., Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation // *Nat Med.* – 2012. – V.17. – №7. – P.796-808.
  124. Planas A.M., Gomez-Choco M., Urra X., Gorina R., Caballero M. and Chamorro A. Brain-derived antigens in lymphoid tissue of patients with acute stroke // *J. Immunol.* – 2012. – V.188. – №5. – P.2156-2163.
  125. Nave K.A. Myelination and support of axonal integrity by glia // *Nature.* – 2010. –V.468. – №7321. – P.244-252.
  126. Lawrence A.J., Patel B., Morris R.G., MacKinnon, A.D., Rich P.M., Barrick T.R. et al. Mechanisms of cognitive impairment in cerebral small vessel disease: multimodal MRI results from the St George's cognition and neuroimaging in stroke (SCANS) study // *PLoSOne.* – 2013. – V.8. – №4. e61014.
  127. Ren X., Akiyoshi K., Grafe M.R., Vandenbark A.A., Hurn P.D., Herson P.S., Offner H. Myelin specific cells infiltrate MCAO lesions and exacerbate stroke severity // *Metab Brain Dis.* – 2012. – V.27. – №1. – P.7-15.
  128. Barouch.R. and Schwartz M. Autoreactive T cells induce neurotrophin roduction by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications

- for protective autoimmunity // FASEBJ. – 2002. – V.16. – №10. – P.1304-1306.
129. Wolf S.A., Steiner B., Akpinarli A., Kammertoens T., Nassenstein C., Braun A., Blankenstein T., Kempermann G. CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis // J Immunol. - 2009. – V.182. – №7. – P.3979-3984.
  130. Ziv Y., Ron N., Butovsky O., Landa G., Sudai E., Greenberg N., Cohen H., Kipnis J., Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood // Nat Neurosci. – 2006. – V.9. – №2. – P.268-275.
  131. Moalem G., Gdalyahu A., Shani Y., Otten U., Lazarovici P., Cohen I.R., Schwartz M. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity // J Autoimmun. – 2000. – V.15. – №3. – P.331-345.
  132. Stubbe T., Ebner F., Richter D., Engel, O., Klehmet J., Roysl G., et al. Regulatory Tcells accumulate and proliferate in the ischemic hemisphere for up to 30 days after MCAO // J. Cereb.BloodFlowMetab. – 2013. – V.33. – № 1. – P. 37-47.
  133. Chen S., Wu H., Klebe D., Hong Y., Zhang J. , TangJ. Regulatory T cell in Stroke: A New Paradigm for Immune Regulation // Clinical and Developmental Immunology. – 2013. article ID 689827.
  134. Bornstein N.M., Aronovich B., Korczyn A.D., Shavit S., Michaelson D.M., Chapman J. Antibodies to brain antigens following stroke // Neurology. – 2001. – V.56. – №4. – P.529-530.
  135. Li P., Mao L., Zhou G., Leak R.K., Sun B., Chen J. et al. Adoptive regulatory T cell therapy preserves systemic immune homeostasis after cerebral ischemia // Stroke. - 2013. – V.44. – №12. – P.3509-3515.
  136. Murray P.J. Immune regulation by monocytes // Semin Immunol. – 2018. – V.35. – P.12-18.

137. Chimen M., Yates C.M., McGettrick H.M., Ward L.S., Harrison M.J., Apta B. et al. Monocyte subsets coregulate inflammatory responses by integrated signaling through TNF and IL-6 at the endothelial cell interface // *J Immunol.* – 2017. – V. 198. – №7. – P. 2834-2843.
138. Sampath P., Moideen K., Ranganathan U.D., Bethunaickan R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection // *Front Immunol.* – 2018. – № 9. – P.1726.
139. Franca C.N. Izar M.C.O., Hortkncio M.N.S. et al. Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease // *Clin Sci (Lond).* – 2017. – V. 131. – № 12. – P.1215-1224.
140. Zhang J.H., Badaut J., Tang J. et al. The vascular neural network - a new paradigm in stroke pathophysiology // *Nat. Rev. Neurol.* – 2012. – V.8. – № 12. – P.711-716.
141. Hofer T.P., van de Loosdrecht A.A., Stahl-Hennig C., Cassatella M.A., Ziegler-Heitbrock L. 6-Sulfo LacNAc (SlaN) as a Marker for Non-classical Monocytes // *Front Immunol.* – 2019. – №10. – P.2052.
142. Xiong X.Y., Liu L., Yang Q.W. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke // *Prog Neurobiol.* – 2016. – №142 – P.23-44.
143. Garcia-Bonilla L., Brea D., Benakis C., et al. Endogenous Protection from Ischemic Brain Injury by Preconditioned Monocytes. // *J Neurosci.* - 2018. – V. 38. – № 30. – P.6722-6736.
144. Garcia-Bonilla L., Faraco G., Moore J. et al. Spatio-temporal profile, phenotypic diversity, and fate of recruited monocytes into the post-ischemic brain // *J Neuroinflammation.* – 2006. – V. 13. – № 1. – № 285.
145. Wattananit S., Tornero D., Graubardt N., Memanishvili T., Monni E., Tatarishvili J., Miskinyte G., Ge R., Ahlenius H., Lindvall O., Schwartz M., Kokaia Z. Monocyte-Derived Macrophages Contribute to Spontaneous Long-Term Functional Recovery after Stroke in Mice // *J Neurosci.* – 2016. – V. 36. – № 15. – P.4182-4195.

146. Murdoch C., Tazzyman S., Webster S., Lewis C.E. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol.* – 2007. – V. 178. – № 11. – P.7405-7411.
147. Weber C., Belge K.U., von Hundelshausen P., et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations // *J Leukoc Biol.* – 2000. – V.67. – № 5. – P. 699-704.
148. Fang Y.N., Tong M.S., Sung P.H., Chen Y.L., Chen C.H., Tsai N.W., Huang C.J., Chang Y.T., Chen S.F., Chang W.N. Monocyte count at onset predicts poststroke outcomes during a 90-day follow-up // *Eur J Clin Investig.* - 2017. – V. 47. – №10. – P. 702-710.
149. Dong X., Nao J., Gao Y. Peripheral Monocyte Count Predicts Outcomes in Patients with Acute Ischemic Stroke Treated with rtPA Thrombolysis // *Neurotox Res.* – 2020. – V. 37. – № 2. – P. 469-477.
150. Haeusler K.G., Schmidt W.U., Fühling F., Meisel C., Helms T. et al. Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans // *Cerebrovasc Dis.* – 2008. – V. 25 - № 1-2. - P. 50-58.
151. Dayyani F., Belge K.U., Frankenberger M., Mack M., Berki T., Ziegler-Heitbrock L. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes // *J Leukoc Biol.* - 2003. – №74. -P.33-39.
152. Mandruzzato S., Brandau S., Britten C.M. et al. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study // *Cancer Immunology, Immunotherapy.* – 2016. – V. 65. – № 2. – P. 161-169.
153. Bronte V., Brandau S., Chen S.-H., Colombo M.P., Frey A.B., Greten T.F., Mandruzzato S., Murray P.J., Ochoa A., Ostrand-Rosenberg S., Rodriguez P.C., Sica A., Umansky V., Vonderheide R.H., Gabrilovich D.I. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards // *Nature communications.* – 2016. – № 7. – P. 12150.

154. Cubillos-Ruiz J.R., Mohamed E., Rodriguez P.C. Unfolding anti-tumor immunity: ER stress responses sculpt tolerogenic myeloid cells in cancer // *J Immunother Cancer*. – 2017. – V. 5. – № 5.
155. Tsiganov E.N., Verbina E.M., Radaeva T.V. et al. Gr-1dim CD11b+ immature myeloid-derived suppressor cells but not neutrophils are markers of lethal tuberculosis infection in mice // *J Immunol*. – 2014. – V. 192. – № 10. – P.4718-1427.
156. Delano M.J., Scumpia P.O., Weinstein J.S. et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis // *J Exp Med*. – 2007. – V. 204. – №6. – P.1463-1474.
157. Makarenkova V.P., Bansal V., Matta B.M., Perez L.A., Ochoa J.B. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress // *J Immunol*. – 2006. – V.176. – № 4. – P. 2085-2094.
158. Bergenfelz C., Larsson A.M., von Stedingk K., Gruvberger- Saal S., Aaltonen K., Jansson S., Jernstrom H., Janols H., Wullt M., Bredberg A., Ryden L., Leandersson K. Systemic Monocytic-MDSCs Are Generated from Monocytes and Correlate with Disease Progression in Breast Cancer Patients // *PLoS One*. – 2015. –V.10. – №5. – P. 0127028.
159. Pawelec G., Verschoor C.P., Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Not Only in Tumor Immunity // *Front Immunol*. – 2019. №10. – P.1099.
160. Huang T., Huang W., Zhang Z., Yu L., Xie C., Zhu D. et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  upregulation in microglia following hypoxia protects against ischemia-induced cerebral infarction // *Neuroreport*. –2014. – V.25. – № 14. – P. 1122-1128.
161. J. Sarkar, S. Chaudhary, S.H. Jassim, O. Ozturk, W. Chamon, B. Ganesh, S. Tibrewal, S. Gandhi, Y.S. Byun, J. Hallak, D.L. Mahmud, N. Mahmud, D. Rondelli, S. Jain. CD11b+GR1+ myeloid cells secrete NGF and promote trigeminal ganglion neurite growth: implications for corneal

- nerve regeneration // Invest Ophthalmol. Vis. Sci. – 2013. – № 54. – P. 5920-5936.
162. Bonaventura A., Liberale L., Vecchi A., Casula M, Carbone F., Dallegri F., Montecucco F. Update on inflammatory biomarkers and treatments in ischemic stroke // Int J Mol Sci. – 2016. – V. 17. – № 12. – P. 1967.
  163. Gu L., Jian Z., Stary C., Xiong X. T cells and cerebral ischemic stroke // Neurochem Res. – 2015. – V. 40. – № 9. – P. 1786-1791.
  164. Shen E., Zhao K., Wu C., Yang B. The suppressive effect of CD25<sup>+</sup>Treg cells on Th1 differentiation requires cell-cell contact partially via TGF- $\beta$  production // Cell Biol Int. – 2011. – V. 35. – № 7. – P.705-712.
  165. Lai Y.J., Hanneman S.K., Casarez R.L., Wang J., McCullough L.D. Blood biomarkers for physical recovery in ischemic stroke: a systematic review // Am J Transl Res. – 2019. – V. 11. – №. 8. – P. 4603-4613.
  166. Kumar V., Patel S., Tcyganov E., Gabrilovich D.I. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment // Trends Immunol. – 2016. – V. 37. – №3. – P.208-220.
  167. Fleming V., Hu X., Weber R., Nagibin V., Groth C., Altevogt P. et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells to bypass tumor-induced immunosuppression // Front Immunol. – 2018. – № 9. - P. 398.
  168. Schrijver I.T., Theroude C., Roger T. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis // Front Immunol. – 2019. – №. 10. – P. 327.
  169. Pan P.Y., Ma G., Weber K.J., Ozao-Choy J., Wang G., Yin B. et al. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer // Cancer Res. – 2010. – V. 70. – № 1. – P. 99-108.
  170. Hosomi S., Koyama Y., Watabe T., et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrate the Brain and Suppress Neuroinflammation in a Mouse Model of Focal Traumatic Brain Injury // Neuroscience. – 2019. – № 406. – P. 457-466.

171. Liesz A., A.Dalpke, E.Mracsko, D.J.Antoine, S.Roth, W.Zhou, H.Yang, S.Y.Na, M.Akhisaroglu, T.Fleming, T.Eigenbrod, P.P.Nawroth, K.J.Tracey, R.Veltkamp. DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury // J. Neurosci. – 2015. – V. 35. – №2. – P. 583-598.
172. Saiwai H., Kumamaru H., Ohkawa Y., Kubota K., Kobayakawa K., Yamada H. et al. Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Myeloid-derived suppressor cells play a critical role in the resolution of acute inflammation and the subsequent tissue repair process after spinal cord injury // J Neurochem. – 2013. – V. 125. – № 1. – P. 74-88.
173. Bayik D., Tross D., Klinman D.M. Factors influencing the differentiation of human monocytic myeloid-derived suppressor cells into inflammatory macrophages. Front Immunol.– 2018. – V. 26. – №9. –P. 608.
174. Sinha P., Clements V. K., Bunt S. K., Albelda S. M., Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response // J. Immunol. – 2007. – V. 179. – № 2. – P. 977-983.
175. Yin J., Valin K.L., Dixon M.L., Leavenworth J.W. The Role of Microglia and Macrophages in CNS Homeostasis, Autoimmunity, and Cancer // J Immunol Res. – 2017. – №5150678.
176. Kristy A. Zera, Marion S. Buckwalter. The Local and Peripheral Immune Responses to Stroke: Implications for Therapeutic Development. // Neurotherapeutics. – 2020. – V. 17. – P. 414-435.
177. Elga Esposito, Bum Ju Ahn , Jingfei Shi, Yoshihiko Nakamura, Ji Hyun Park, Emiri T Mandeville, Zhanyang Yu, Su Jing Chan, Rakhi Desai, Ayumi Hayakawa, Xunming Ji, Eng H Lo, Kazuhide Hayakawa. Brain-to-cervical lymph node signaling after stroke // Nat.Comm. – 2019. – V.10. № 1. – P.5306.

178. Wu P, Zhou Ym, Zeng F, Li Zj et al. Regional brain structural abnormality in ischemic stroke patients: a voxel-based morphometry study // *Neural Regen Res.* – 2016. – V.11. – №9. – P.1424-1430
179. Malone K., Amu S., Moore A.C., Waeber C. The immune system and stroke: from current targets to future therapy // *Immunol. Cell Biol.* – 2018. – V. 97. – № 1. – P. 5–16.
180. Chapman. K.Z., Dale V.Q., Denes A., Bennett G., Rothwell N.J., Allan S.M., McColl B.W. A rapid and transient peripheral inflammatory response precedes brain inflammation after experimental stroke // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2009. – № 29. – P.1764-1768.
181. Hedley C.A. Emsley , Craig J. Smith, Carole M. Gavin, Rachel F. Georgiou, Andy Vail, Elisa M. Barberan, John M. Hallenbeck, Gregory J. del Zoppo, Nancy J. Rothwell, Pippa J. Tyrrell, Stephen J. Hopkins An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis // *J Neuroimmunol.* – 2003. – V. 139. – № 1-2. – P. 93-101.
182. Intiso D., Zarrelli M.M., Lagioia G. et al. Tumor necrosis factor alpha serum levels and inflammatory response in acute ischemic stroke patients // *Neurol Sci.* – 2004. – № 24. – P.390–396.
183. Basic Kes V., Simundic A.M., Nikolac N., Topic E., Demarin V. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute ischemic stroke and their relation to early neurological deficit and stroke outcome // *Clin Biochem.* – 2008. – V.41. – № 16-17. – P. 1330-1334.
184. Tokgoz S., Kayrak M., Akpınar Z., Seyithanoglu A., Guney F. Yuruten Neutrophil lymphocyte ratio as a predictor of stroke // *B.J Stroke Cerebrovasc Dis.* – 2013. – V.22. – № 7. – P. 1169-1174.
185. Brooks D.C., Schindler J.L. Curr Perioperative stroke: risk assessment, prevention and treatment // *Treat Options Cardiovasc Med.* – 2014. – V. 16 – №2, – P.282.



186. Vahidy F.S., Parsha K.N., Rahbar M.H., Lee M., Bui T.T., Nguyen C., Barreto A.D., Bambhroliya A.B., Sahota P., Yang B., Aronowski J., Savitz S.I.J Acute splenic responses in patients with ischemic stroke and intracerebral hemorrhage // *Cereb Blood Flow Metab.* – 2016. – V. 36. - №. 6. – P.1012-1021.
187. Rasouli J., Lekhraj R., Ozbalik M., Lalezari P., Casper D., Einstein J. Brain-Spleen Inflammatory Coupling: A Literature Review // *Biol Med.* - 2011. – V. 27. – № 2. – № 74-77.
188. Yuanyuan Ran, Zongjian Liu, Shuo Huang, Jiamei Shen, Fengwu Li, Wenxiu Zhang, Chen Chen, Xiaokun Geng, Zhili Ji, Huishan Du, Xiaoming H Splenectomy Fails to Provide Long-Term Protection Against Ischemic Stroke Aging Dis. – 2018. – V. 9. – № 3. – P. 467-479.
189. Schwarting S., Litwak S., Hao W., Bahr M., Weise J., Neumann H. Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury // *Stroke.* – 2008. – V. 39. – № 10. 2867-2875.
190. Westendorp W.F., Nederkoorn P.J., Vermeij J.D., Dijkgraaf M.G., van de Beek D. Post-stroke infection: a systematic review and meta-analysis // *BMC Neurol.* – 2011. –V.11. – № 110.
191. Prass K., Meisel C., Hoflich C., Braun J., Halle E., Wolf T., Ruscher K., Victorov I.V., Priller J., Dirnagl U., Volk H.D., Meisel A. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation // *J Exp Med.* – 2003. – V. 198. № 5. – P.725-736.
192. Tang Y., Xu H., Du X., Lit L., Walker W., Lu A., Ran R. et al. Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2006. – V. 26. – № 8. – P.1089-1102.

193. Meisel C., Schwab J., Prass K. et al. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome // *Nat Rev Neurosci.* – 2005. – №6. – P. 775–786.
194. Schulte-Herbrüggen O., Quarcoo D., Meisel A., Meisel C. Differential affection of intestinal immune cell populations after cerebral ischemia in mice // *Neuroimmunomodulation.* – 2009. – V.16. – №3. – P 213-218.
195. Yiwang Guo, Pengyue Li, Qingli Guo, Kexin Shang, Dan Yan, Shouying Du and Yang Lu. Pathophysiology and Biomarkers in Acute Ischemic Stroke // *A Review Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* – 2013. – V. 12. – № 6. – P. 1097-1105
196. Dziedzic T., Slowik A., Pera J., Szczudlik A. Beta-blockers reduce the risk of early death in ischemic stroke // *J Neurol Sci.* 2007. – V 252. – № 1. – P. 53-56.
197. Folyovich A., Biro E., Orban C. et al. Relevance of novel inflammatory markers in stroke-induced immunosuppression. // *BMC Neurol.* – 2014. – V. 14. – №41.
198. Romer C., Engel O., Winek K., Hochmeister S., Zhang T., Roysl G., Klehmet J., Dirnagl U., Meisel C., Meisel A. Blocking stroke-induced immunodeficiency increases CNS antigen-specific autoreactivity but does not worsen functional outcome after experimental stroke // *J Neurosci.* – 2015. – V. 35. – №20. – P. 7777-7794.
199. Steinbrink K., Graulich E., Kubsch S., Knop J. and Enk A. H. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity // *Blood* – 2002. – V. 99. – № 7. 2468–2476
200. Herve, J., Dubreil, L., Tardif, V., Terme, M., Pogu, S., Anegon, I., et al.  $\beta$ 2- Adrenoreceptor agonist inhibits antigen cross-presentation by dendritic cells // *J. Immunol.* – 2013. – V. 190. – № 7. – P. 3163-3171.
201. Gendron A., Teitelbaum J., Cossette C., Nuara S., Dumont M., Geadah D., du Souich P., Kouassi E. Temporal effects of left versus right middle

- cerebral artery occlusion on spleen lymphocyte subsets and mitogenic response in Wistar rats // *Brain Res.* – 2002. – V. 955. №1-2. – P. 85-97.
202. Learoyd A.E., Woodhouse L., Shaw L., Sprigg N. et al. Infections Up to 76 Days After Stroke Increase Disability and Death. ENOS Trial investigators // *Transl Stroke Res.* – 2017. V. 8. – P. 6. – P. 541-548.
203. Kumar S., Selim M.H., Caplan L.R. Medical complications after stroke // *Lancet Neurol.* – 2010. – V. 9. – № 1. – P. 105-118.
204. Ormstad H., Aass H.C.D., Amthor K.F. et al. Erratum to: Serum cytokine and glucose levels as predictors of poststroke fatigue in acute ischemic stroke patients // *J Neurol* – 2011. – V.258. – № 4. – P. 670-676.
205. Haddad J.J. Redox regulation of pro-inflammatory cytokines and IkappaB-alpha/NF-kappaB nuclear translocation and activation // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2002. – V. 296. – № 4. – P. 847–856.
206. Graber J.J., Dhib-Jalbut S. Protective autoimmunity in the nervous system // *Pharmacol Ther.* – 2009. – V.121. – №2. – P.147-159.
207. Talmadge J.E., Gabrilovich D.I. History of myeloid-derived suppressor cells // *Nat Rev Cancer.* – 2013. – V. – 13. – №10. – P. 739-752.
208. Johanna Ruhnau, Karsten Schulze, Bernadette Gaida, Sonke Langner, Christof Kessler, Barbara Broker, Alexander Dressel, Antje Vogelgesang. Stroke alters respiratory burst in neutrophils and monocytes // *Stroke.* – 2014. – V. 45. – № 3. №794-800.
209. Harms H., Prass K., Meisel C., Klehmet J., Rogge W., Drenckhahn C., Gohler J., Bereswill S., Göbel U., Wernecke K.D., Wolf T., Arnold G., Halle E, Volk H.D., Dirnagl U., Meisel A. Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial // *PLoS One.* – 2008. – V.3. - № 5. - e2158.