

БАЛАНС $CD4^+IFN\gamma^+$ И $CD4^+CD25^{hi}T$ -КЛЕТОК КАК РАННИЙ ПРЕДИКТОР 3-МЕСЯЧНОГО ИСХОДА У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

Морозов С.А.¹, Тихонова М.А.¹, Пронкина Н.В.¹, Штоббе А.А.²,
Леплина О.Ю.¹, Шевела Е.Я.¹, Останин А.А.¹, Черных Е.Р.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² МБУЗ «Городская клиническая больница № 1», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Раннее прогнозирование исходов ишемического инсульта (ИИ) является важной задачей, поскольку может помочь в оптимизации лечебной программы и персонализации лечения. Учитывая, что при инсульте Т-лимфоциты с регуляторной активностью участвуют в различных патофизиологических процессах, включая воспаление, иммунодепрессию, поражение и репарацию мозговой ткани, исследование Т-клеток в качестве потенциальных биомаркеров представляет особое значение. Целью работы явилось исследование субпопуляций циркулирующих Т-клеток с фенотипом Т-хелперов 1 типа (Th1), регуляторных Т-клеток (Treg) и их соотношения у пациентов в остром периоде ИИ в зависимости от тяжести, выраженности воспалительного ответа и 3-месячного исхода (по модифицированной шкале Рэнкина, mRs). В исследование был включен 61 пациент с впервые выявленным ИИ (тяжесть по шкале NIHSS ≥ 5 баллов) в остром периоде (24–48 ч после инсульта) и 20 сопоставимых по полу и возрасту доноров. Лабораторное обследование включало оценку лейкоцитоза, нейтрофильно-лимфоцитарного индекса (НЛИ) и СРБ. Исследование Т-клеток проводили в популяции мононуклеарных клеток периферической крови. Th1 и Treg оценивали, соответственно, по содержанию $CD4^+IFN\gamma^+$ и $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток методом проточной цитофлуориметрии. В первые 24–48 ч с момента нарушения мозгового кровообращения пациенты характеризовались повышенными показателями лейкоцитоза, НЛИ и СРБ. Тяжесть инсульта ассоциировалась с большей выраженностью системной воспалительной реакции, что подтверждалось достоверно более высокими показателями лейкоцитоза, НЛИ и СРБ при тяжелом инсульте, чем при инсульте легкой степени тяжести, а также наличием прямой взаимосвязи NIHSS с уровнем НЛИ и СРБ. Также у пациентов отмечалось достоверное снижение $CD4^+IFN\gamma^+$ Th1-клеток, возрастание $CD4^+CD25^{hi}T$ и выраженное снижение индекса Th1/Treg. При этом в группе с NIHSS ≥ 8 (среднетяжелый и тяжелый инсульт) доля $CD4^+IFN\gamma^+$ Т-клеток находилась в прямой, а содержание $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток – в обратной корреляционной зависимости с уровнем СРБ и НЛИ. Изменения Т-клеточных субпопуляций были более выражены у пациентов с благоприятным 3-месячным исходом (mRs > 3). В результате пациенты с неблагоприятным исходом (mRs ≤ 3) отличались от оппозитной группы более высоким содержанием $CD4^+IFN\gamma^+$, меньшим уровнем $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток и более (4-кратно) высоким индексом соот-

Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Chernykh Elena R.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str. 14.
Phone: 7 (383) 236-03-29.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

С.А. Морозов, М.А. Тихонова, Н.В. Пронкина,
А.А. Штоббе, О.Ю. Леплина, Е.Я. Шевела,
А.А. Останин, Е.Р. Черных «Баланс $CD4^+IFN\gamma^+$
и $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток как ранний предиктор
3-месячного исхода у больных ишемическим инсультом»
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4.
С. 675–684.
doi: 10.15789/1563-0625-BOC-1993

© Морозов С.А. и соавт., 2020

For citation:

S.A. Morozov, M.A. Tikhonova, N.V. Pronkina, A.A. Shtobbe,
O.Yu. Leplina, E.Ya. Shevela, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh
“Balance of $CD4^+IFN\gamma^+$ and $CD4^+CD25^{hi}T$ cells as early
predictor of a 3-month outcome in ischemic stroke patients”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 4, pp. 675–684.
doi: 10.15789/1563-0625-BOC-1993

DOI: 10.15789/1563-0625-BOC-1993

ношения $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$. ROC-анализ выявил «хорошее» качество прогноза, основанного на оценке индекса $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ в качестве монопредиктора неблагоприятного исхода ($AUC = 0,75$) и «очень хорошее» качество прогноза при комбинации указанного индекса с баллом по шкале NIHSS ($AUC = 0,82$). Полученные данные позволяют предположить, что уменьшение Th1/Treg индекса за счет снижения $CD4^+IFN\gamma^+$ и повышения $CD4^+CD25^{hi}$ Т-клеток в остром периоде ИИ является компенсаторной реакцией, направленной на сдерживание воспалительного ответа, и характеризуется прогностической значимостью при использовании в качестве раннего предиктора 3-месячного исхода.

Ключевые слова: $CD4^+IFN\gamma^+$, $CD4^+CD25^{hi}$, ишемический инсульт, исходы

BALANCE OF $CD4^+IFN\gamma^+$ AND $CD4^+CD25^{hi}$ T CELLS AS EARLY PREDICTOR OF A 3-MONTH OUTCOME IN ISCHEMIC STROKE PATIENTS

Morozov S.A.^a, Tikhonova M.A.^a, Pronkina N.V.^a, Shtobbe A.A.^b,
Leplina O.Yu.^a, Shevela E.Ya.^a, Ostanin A.A.^a, Chernykh E.R.^a

^a Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Early prediction for ischemic stroke (IS) outcome is a major challenge since it may help to optimize treatment program and to make it more personalized. Since T cells with regulatory activity are involved in different pathophysiological processes in brain stroke, including inflammation, immune suppression, brain damage and repair, the study of T cells as potential biomarkers has essential importance. The present work aimed to study the circulating T cell subsets with phenotype of type 1 T helper cells (Th1) and regulatory T cells (Treg), and their ratio during the acute phase of IS, depending on stroke severity, inflammatory response and 3-month outcome (according to modified Rankin scale, mRs). Patients and methods. The study included 61 patients with a newly diagnosed IS (severity according to NIHSS ≥ 5), in the first 24–48 h after stroke onset, and 20 age/sex-related healthy donors. Laboratory examination included assessment of leukocytosis, neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and CRP concentration. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood to study T cell subsets. Th1 and Tregs were measured by FACS analysis as $CD4^+IFN\gamma^+$ and $CD4^+CD25^{hi}$ T cells, respectively. During the first 24–48 h after stroke, the patients had elevated values of leukocyte counts, NLR and CRP. Higher levels of these parameters in severe stroke compared with mild stroke, as well as direct correlation of NIHSS with NLR and CRP evidenced that the stroke severity was associated with more pronounced inflammatory response. Patients were also characterized by a significant decrease in $CD4^+IFN\gamma^+$ Th1 cells, an increase in $CD4^+CD25^{hi}$ Treg, and a marked decrease in Th1/Treg ratio. Furthermore, in patients with NIHSS ≥ 8 (moderate and severe stroke), the percentage of $CD4^+IFN\gamma^+$ T cells was in direct correlation, and the number of $CD4^+CD25^{hi}$ T cells was inversely related to CRP and NLR values. The changes of T cell subsets were more pronounced in patients with a favorable 3-month outcome (mRs > 3). As a result, the patients with poor outcome (mRs ≤ 3) had higher $CD4^+IFN\gamma^+$ T cell proportion, lower $CD4^+CD25^{hi}$ T cell percentage and 4-fold higher $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ ratio compared with opposing group. ROC analysis revealed a “good” quality of prognosis based on evaluation of the $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ ratio as a monopredictor of adverse outcome ($AUC = 0.75$) and “very good” quality of prognosis when the indicated ratio was combined with NIHSS scale ($AUC = 0.82$). The data obtained suggest that a decrease of Th1/Treg ratio, due to a decrease in $CD4^+IFN\gamma^+$ and increased $CD4^+CD25^{hi}$ T cell counts during the acute phase of ischemic stroke is a compensatory reaction directed at inhibition of inflammatory response, and has a prognostic significance as early predictor of the outcome at 3 months.

Keywords: $CD4^+IFN\gamma^+$, $CD4^+CD25^{hi}$, ischemic stroke, outcomes

Введение

Ишемический инсульт (ИИ) остается одной из приоритетных медико-социальных проблем в силу высоких показателей распространенности, летальности, инвалидизации и трудовых потерь среди работоспособного населения [3]. Оценка риска неблагоприятного исхода в раннем периоде инсульта необходима для оптимизации программы лечения и разработки персонализированных методов терапии. Однако прогнозирование исхода инсульта остается сложной задачей. Традиционно к клинически значимым предикторам относят тяжесть инсульта, возраст пациентов и развитие ранних инфекционных осложнений в постинсультном периоде. Недавними исследованиями показано также, что биомаркерами исходов могут являться параметры крови, отражающие системное воспаление (СРБ, лейкоцитоз) и иммунный ответ (IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MCP-1, TNF α) [8].

Патогенез ИИ связан с иммунным ответом на ишемическое поражение мозговой ткани, лежащим в основе локальной и системной воспалительной реакции [12]. Соответственно, иммунные параметры, и в частности Т-клетки, участвующие в регуляции иммунного ответа и воспаления, могут иметь патогенетическую и прогностическую значимость [2]. Среди различных субпопуляций CD4⁺Т-клеток Т-хелперы 1 типа (Th1) активируют провоспалительный фенотип макрофагов и микроглии [5, 11], тогда как регуляторные Т-клетки (Treg) подавляют провоспалительную активность клеток врожденного иммунитета [10]. Поэтому баланс этих Т-клеточных субпопуляций может во многом определять характер течения и исход церебрального инсульта.

Согласно данным литературы, возрастание Treg в мозговой ткани и периферической крови наблюдается уже с первых дней после ишемического поражения мозговой ткани [9, 18]. Однако роль Treg остается неоднозначной. Обладая способностью ингибировать воспалительную реакцию, выработку металлопротеиназ, активность эффекторных Т-клеток и активацию микроглии, Treg могут оказывать нейропротективный эффект [9]. Позитивный эффект Treg может быть также обусловлен стимулирующим влиянием на нейрогенез [13] и постишемическую неоваскуляризацию [19]. С другой стороны, Treg могут вызывать повреждение микрососудов и потенцировать ишемическое поражение головного мозга [7], а также участвовать в индукции иммуносупрессии, являющейся ведущей причиной инфекционных осложнений и летальности при ИИ [15].

Данные об изменении содержания циркулирующих Th1 в остром периоде ИИ у человека отсутствуют. Тем не менее в модели инсульта на

животных показано, что снижение уровня IFN γ , продуцируемого Th1, с помощью системного введения IFN γ -нейтрализующих антител уменьшает размеры зоны инфаркта и выраженность неврологического дефицита [14].

Целью настоящей работы явилось исследование субпопуляций циркулирующих Т-клеток с фенотипом Th1, Treg и их баланса в остром периоде ИИ в зависимости от тяжести инсульта, выраженности воспалительного ответа и 3-месячного исхода заболевания.

Материалы и методы

Рекрутирование пациентов (мужчины и женщины ≥ 18 лет) проводили из числа больных, находившихся на лечении в неврологическом отделении ГБУЗ НСО «ГКБ № 1» (г. Новосибирск) с диагнозом «острое нарушение мозгового кровообращения». Критериями включения являлись: наличие впервые возникшего ИИ в бассейне средней мозговой артерии, верифицированного в соответствии с критериями МКБ-10 методами нейровизуализации (КТ/МРТ); острый период (первые 24-48 ч после инсульта); атеротромботический или кардиоэмболический подтип ИИ, определенный на основании критериев TOAST; тяжесть неврологического дефицита ≥ 5 баллов по шкале NIHSS; наличие полной функциональной независимости до развития инсульта (0-1 балл по шкале Рэнкина); подписанное пациентом (или его представителем) добровольное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения являлись: отказ пациента (или его представителя) от участия в исследовании; наличие острого воспалительного, инфекционного, нейродегенеративного, аутоиммунного заболевания; наличие выраженной почечной или печеночной недостаточности, сахарного диабета в тяжелой форме; наличие повторного ОНМК; наличие в анамнезе острого инфаркта миокарда, опухолевого процесса, черепно-мозговой травмы, операции на сердце и сосудах шеи; прием иммуносупрессорных препаратов в течение 12 мес. до забора крови. Контрольную группу составили 20 сопоставимых по полу и возрасту здоровых доноров.

Тяжесть инсульта определяли в баллах по шкале инсульта национального института здоровья США (NIHSS). Функциональный исход оценивали через 3 мес. по модифицированной 6-балльной шкале степени инвалидизации Рэнкина (mRs). Пациенты с уровнем mRs ≤ 3 (что соответствует умеренной инвалидизации) были отнесены в группу с благоприятным исходом, а с уровнем mRs > 3 (включающих грубую инвалидизацию, вегетативный статус или летальный исход) — в группу с неблагоприятным исходом.

Лабораторное обследование пациентов проводили в первые 24–48 ч. Выраженность системной воспалительной реакции оценивали по концентрации С-реактивного белка (СРБ) и показателям крови (лейкоцитоз, нейтрофильно-лимфоцитарный индекс (НЛИ)). Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли стандартно центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколаверографина. Т-клетки с фенотипом Th1 и Treg оценивали, соответственно, по числу CD4⁺IFN γ ⁺ и CD4⁺CD25^{hi}T-лимфоцитов методом проточной цитофлюориметрии с использованием FITC-меченных анти-CD25, PerCP-меченных анти-CD4 и PE-меченных анти-IFN γ моноклональных антител (BD PharMingen, США). Фиксацию и пермеабиллизацию клеток для оценки внутриклеточной экспрессии IFN γ проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов (CD4), используя коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабиллизации “Transcription Factor Buffer Set” в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences). Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP), (BD FACSCalibur, CellQuest Software, США). Относительное содержание CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺IFN γ ⁺T-клеток представлено в виде процента от количества лимфоцитов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica 6.0 и Graph Pad Prism 5.0. Для выявления значимых разли-

чий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Корреляционную связь оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (r_s). Прогностическую значимость оценивали с использованием ROC-анализа.

Результаты

В исследуемую группу ($n = 61$) были включены 32 мужчины и 29 женщин в возрасте от 40 до 80 лет с тяжестью инсульта ≥ 5 баллов по шкале NIHSS (табл. 1). Доля пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести среди них составила более 70%. Пациенты в группах с различной степенью тяжести не различались по полу и возрасту. Неблагоприятный 3-месячный исход был отмечен у 22 (36,1%) пациентов, причем в подавляющем большинстве случаев (21/22; 95%) регистрировался в группах больных со средней и тяжелой степенью тяжести ИИ (NIHSS ≥ 8).

В первые 24–48 ч после ИИ больные характеризовались достоверным возрастанием абсолютно-го количества лейкоцитов, НЛИ и СРБ, отражающих системное воспаление (табл. 2). Значимое увеличение этих показателей регистрировалось у больных с легкой степенью тяжести и нарастало по мере утяжеления ИИ. Так, показатели лейкоцитоза, НЛИ и СРБ при тяжелом инсульте были достоверно выше, чем при инсульте легкой степени тяжести. Более того, балл по шкале NIHSS находился в умеренной, но достоверной прямой корреляционной связи с уровнем лейкоцитоза ($r_s = 0,36$; $p = 0,005$), СРБ ($r_s = 0,36$; $p = 0,005$)

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ

TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS OF PATIENTS

Параметры Parameters	Общая группа Total group	Степень тяжести инсульта Stroke severity		
		Легкая Mild (NIHSS ≤ 7)	Средняя Moderate (NIHSS 8-12)	Тяжелая Severe (NIHSS > 12)
Количество (n) Number (n)	61	16 (26,2%)	15 (24,6%)	30 (49,2%)
Возраст, лет Age, years Me (min-max)	68 (40-80)	66 (40-80)	65 (54-77)	70 (53-80)
Пол (муж/жен) Sex (male/female)	32/29	10/6	5/10	17/13
NIHSS Me (min-max)	12 (5-26)	6 (5-7)	11 (8-12)	17 (13-26)
Неблагоприятный 3-мес. исход (n) Adverse 3-month outcome (n)	22 (36,1%)	1 (6,3%)	5 (33,3%)	16 (53,3%)

и НЛИ ($r_s = 0,37$; $p = 0,003$). Таким образом, тяжесть ИИ была сопряжена с выраженностью воспалительной реакции.

Оценка в периферической крови субпопуляций Т-клеток выявила достоверное 2-кратное возрастание у больных относительного содержания CD4⁺Т-клеток с высокой экспрессией CD25 и выраженное снижение CD4⁺Т-клеток с внутриклеточным содержанием IFN γ . Соответственно, индекс соотношения CD4⁺IFN γ ⁺/CD4⁺CD25^{hi} у пациентов был практически в 8 раз ниже, чем у здоровых доноров. Анализ взаимосвязи между CD4⁺IFN γ ⁺ и CD4⁺CD25^{hi}Т-клетками, а также этих субпопуляций с выраженностью воспалительной реакции в целом по группе не выявил

значимых корреляционных зависимостей. В то же время у пациентов со среднетяжелым и тяжелым инсультом (NIHSS ≥ 8) относительное количество CD4⁺IFN γ ⁺Т-клеток находилось в обратной взаимосвязи с долей CD4⁺CD25^{hi}Т-клеток ($r_s = -0,47$; $p = 0,007$; $n = 31$). Кроме того, в этой подгруппе больных обнаруживались значимые корреляционные взаимосвязи между уровнем и соотношением CD4⁺IFN γ ⁺ и CD4⁺CD25^{hi}Т-клеток с маркерами системной воспалительной реакции (табл. 3). Так, между количеством CD4⁺CD25^{hi}Treg и показателями воспаления (СРБ и НЛИ) выявлялась обратная зависимость, тогда как доля CD4⁺IFN γ ⁺Th1 и CD4⁺IFN γ ⁺/CD4⁺CD25^{hi} индекс прямо коррелировали с кон-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ И УРОВЕНЬ CD4⁺IFN γ ⁺ И CD4⁺CD25^{hi}Т-КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНОЙ ТЯЖЕСТЬЮ ИНСУЛЬТА

TABLE 2. INFLAMMATORY INDICATORS AND LEVEL OF CD4⁺IFN γ ⁺ AND CD4⁺CD25^{hi}Т CELLS IN PATIENTS WITH VARIOUS STROKE SEVERITY

Параметры Parameters	Доноры Donors (n = 20)	Пациенты Patients (n = 61)	Степень тяжести инсульта Stroke severity		
			Легкая Mild (NIHSS ≤ 7)	Средняя Moderate (NIHSS 8-12)	Тяжелая Severe (NIHSS > 12)
Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$) Leukocytes ($\times 10^9/\text{л}$)	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 NLR	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) CRP (mg/l)	2,1 (1,7-4,7)	30,3* (16,7-69,0)	17,6* (11,0-30,9)	20,4* (11,1-59,1)	41,7*# (21,1-103,8)
CD4⁺IFNγ⁺ (%)	15,1 (4,3-29,0)	3,1* (1,0-5,8)	2,9* (1,5-5,4)	3,1* (0,9-6,8)	3,1* (0,9-5,8)
CD4⁺CD25^{hi} (%)	1,0 (1,0-1,2)	2,0* (1,1-3,0)	1,8* (1,6-3,0)	2,0* (1,3-3,0)	2,0* (1,0-3,0)
Индекс CD4⁺IFNγ⁺/CD4⁺CD25^{hi} CD4 ⁺ IFN γ ⁺ /CD4 ⁺ CD25 ^{hi} ratio	11,8 (4,3-24,2)	1,5* (0,57-3,70)	1,4* (0,85-3,20)	1,2* (0,7-2,3)	1,6* (0,5-6,5)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); * $p_U < 0,05$ – достоверность различий с донорами; # $p_U < 0,05$ – достоверность различий с больными легкой степени тяжести (U-критерий Манна-Уитни); НЛИ – нейтрофильно-лимфоцитарный индекс.

Note. Data are presented as median and interquartile range (in brackets); * $p_U < 0.05$, the significance of differences compared with donors; # $p_U < 0.05$, the significance of differences compared with mild stroke severity patients (Mann-Whitney U test); NLR – neutrophil-lymphocytes ratio.

центрацией СРБ и уровнем НЛИ. При этом тяжесть инсульта по шкале NIHSS не коррелировала ни с содержанием $CD4^+IFN\gamma^+$ Т-клеток ($r = 0,13$; $p = 0,5$; $n = 31$), ни с соотношением $CD4^+IFN\gamma^+$ и $CD4^+CD25^{hi}$ Т-клеток ($r = 0,13$; $p = 0,49$; $n = 31$). Таким образом, содержание $CD4^+IFN\gamma^+$ Т-клеток и их соотношение с $CD4^+CD25^{hi}$ Тreg было ассо-

циировано именно с выраженностью воспалительного ответа.

Чтобы проанализировать возможную взаимосвязь циркулирующих $CD4^+IFN\gamma^+$ и $CD4^+CD25^{hi}$ Т-клеток и их соотношения с исходом инсульта, было проведено сравнительное исследование этих показателей в подгруппах больных с благоприятным ($mRs \leq 3$) и неблаго-

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ УРОВНЕМ И СООТНОШЕНИЕМ $CD4^+IFN\gamma^+$ И $CD4^+CD25^{hi}$ Т-КЛЕТОК С МАРКЕРАМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ СО СРЕДНЕТЯЖЕЛЫМ И ТЯЖЕЛЫМ ИНСУЛЬТОМ (n = 31)

TABLE 3. CORRELATION BETWEEN THE LEVEL AND RATIO OF $CD4^+IFN\gamma^+$ AND $CD4^+CD25^{hi}$ Т CELLS WITH INFLAMMATORY RESPONSE MARKERS IN PATIENTS WITH MODERATE AND SEVERE STROKE (n = 31)

Параметры Parameters	НЛИ NLR	СРБ (мг/л) CRP (mg/l)
$CD4^+CD25^{hi}$Тreg ($\times 10^6$/л) $CD4^+CD25^{hi}$ Тreg ($\times 10^6$ /l)	$r = -0,44$; $p = 0,0008$	$r = -0,36$; $p = 0,02$
$CD4^+IFN\gamma^+$Th1 (%)	$r = 0,36$; $p = 0,047$	$r = 0,55$; $p = 0,0014$
Индекс $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ ratio	$r = 0,33$; $p = 0,07$	$r = 0,53$; $p = 0,002$

Примечание. r – коэффициент корреляции Спирмена.

Note. r, Spearman rank order correlations.

ТАБЛИЦА 4. ЗНАЧИМОСТЬ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ПАРАМЕТРОВ В РАННЕМ ПРОГНОЗЕ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО 3-МЕСЯЧНОГО ИСХОДА ИНСУЛЬТА (ROC-АНАЛИЗ)

TABLE 4. SIGNIFICANCE OF THE ANALYZED PARAMETERS IN THE EARLY PROGNOSIS OF ADVERSE 3-MONTH STROKE OUTCOME (ROC-ANALYSIS)

Параметр Parameter	AUC	p	SN (%)	SP (%)
NIHSS > 14,5	0,72	0,01	62	57
СРБ > 41,7 мг/л CRP > 41.7 mg/l	0,72	0,08	67	74
НЛИ > 5,3 NLR > 5.3	0,70	0,025	71	65
Индекс $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ > 1,19 $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ ratio > 1.19	0,75	0,02	73	67
Индекс $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ + NIHSS $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ ratio + NIHSS	0,82	0,03	79	75

Примечание. AUC – площадь под кривой; p – значимость теста; SN – чувствительность; SP – специфичность.

Note. AUC, area under the curve; p, significance of the test; SN, sensitivity; SP, specificity.

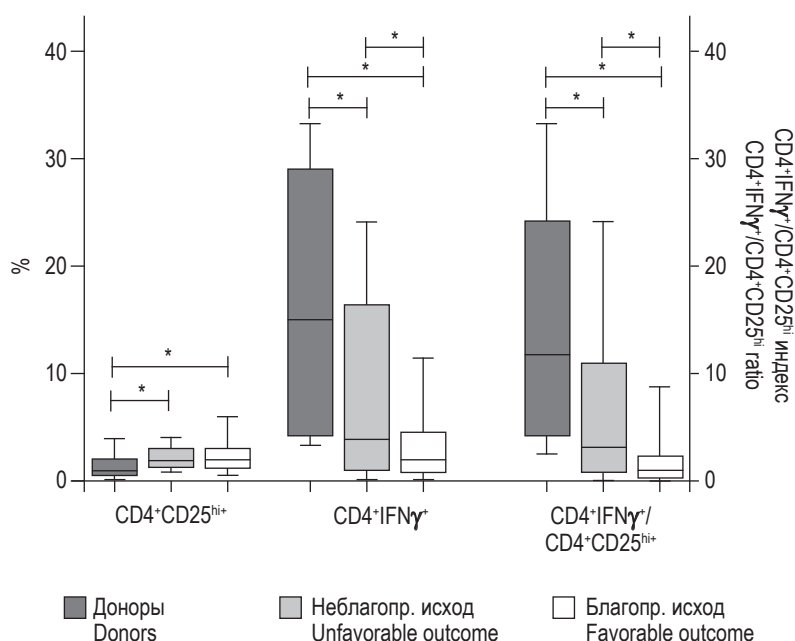


Рисунок 1. Относительное содержание и соотношение $CD4^+IFN\gamma^+$ и $CD4^+CD25^{hi}$ T-клеток в группах пациентов, оппозирующих по 3-месячному исходу инсульта

Примечание. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона и диапазона минимальных-максимальных значений. * – $p_U < 0,05$ (U-критерий Манна–Уитни).

Figure 1. Percentage and ratio of $CD4^+IFN\gamma^+$ and $CD4^+CD25^{hi}$ T cells in patients opposed to a 3-month stroke outcome

Note. The data are presented as the median, interquartile range, and the range of minimum-maximum values. *, $p_U < 0.05$ (Mann–Whitney U test).

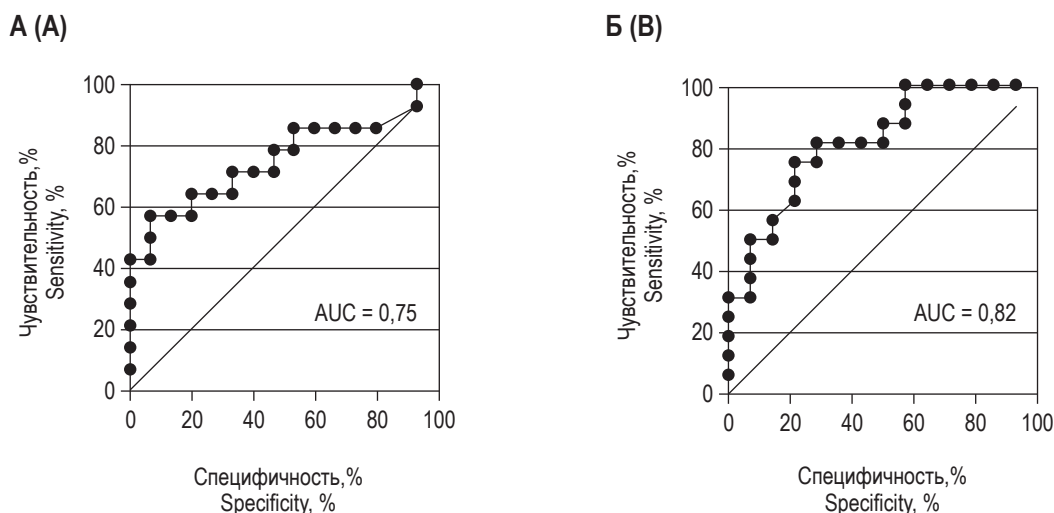


Рисунок 2. Значимость индекса $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ в качестве монопредиктора (А) и в комбинации с NIHSS (Б) в раннем прогнозе 3-месячного неблагоприятного исхода инсульта (ROC-анализ)

Figure 2. Significance of $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ ratio as monopredictor (A) and in combination with NIHSS (B) in the early prognosis of adverse 3-month stroke outcome (ROC-analysis)

приятным ($mRs > 3$) 3-месячным исходом. Поскольку неблагоприятные исходы развивались преимущественно у пациентов с ИИ средней и тяжелой степени тяжести, анализ проводился в группе пациентов с $NIHSS \geq 8$. Неблагоприятные

исходы в этой группе регистрировались практически у половины пациентов ($n = 21/45$), включая 10 случаев летального исхода (28-сут. летальность) и 11 – грубой инвалидизации. По сравнению с донорами обе группы характеризовались однона-

правленными изменениями (рис. 1), в частности возрастанием доли $CD4^+CD25^{hi}$ и снижением относительного содержания $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток. Тем не менее пациенты с благоприятными исходами характеризовались большей выраженностью указанных изменений. В результате относительное содержание $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток в группе с благоприятным исходом было выше (на уровне тенденции), а содержание $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток — достоверно ниже, чем в группе с неблагоприятным исходом. Соответственно, индекс $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ в группе с неблагоприятным исходом 4-кратно превышал аналогичный показатель в группе с хорошим неврологическим восстановлением ($p_U < 0,05$).

Полученные данные позволили предположить, что соотношение $CD4^+IFN\gamma^+$ и $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток может являться прогностическим биомаркером и использоваться для ранней оценки риска неблагоприятного исхода. Чтобы проверить это предположение, был проведен ROC-анализ. Параллельно с индексом соотношения $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ мы также оценили прогностическую значимость ряда других клинико-лабораторных показателей — NIHSS, СРБ и НЛИ (табл. 4). Площадь под ROC-кривой (AUC) для индекса $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ составила 0,75, соответствуя хорошему качеству прогноза, и при значении индекса $> 1,19$ неблагоприятный исход прогнозировался с чувствительностью 73% и специфичностью 67% (табл. 4, рис. 2А).

Характерно, что оценка NIHSS, СРБ и НЛИ в качестве монопредикторов исхода (табл. 4) характеризовалась меньшей прогностической значимостью — площадь под ROC-кривой варьировала от 0,7 до 0,72. В то же время комбинация индекса $CD4^+IFN\gamma^+/CD4^+CD25^{hi}$ с NIHSS улучшала качество прогноза до уровня «очень хорошего». В этом случае площадь под кривой была 0,82, и неблагоприятный исход прогнозировался с чувствительностью 79% и специфичностью 75% (рис. 2Б).

Обсуждение

Проведенные в настоящей работе исследования показывают, что тяжесть ИИ ассоциирована с более выраженной воспалительной реакцией. Это подтверждается возрастанием показателей системного воспалительного ответа (лейкоцитоза, НЛИ и уровня СРБ) и частоты неблагоприятных исходов по мере утяжеления инсульта и хорошо согласуется с данными литературы [1]. Индуцированный ишемическим повреждением иммунный ответ лежит в основе локального и системного воспаления и является важнейшим патогенетическим звеном церебрального инсульта [12]. 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 [6, 16]. Поскольку различные субпопуляции Т-клеток вовлечены в модуляцию воспалительной реакции [2, 4], баланс Т-клеток, усиливающих и подавляющих воспалительную реакцию, может быть биомаркером тяжести инсульта, выраженности воспалительного ответа и эффективности неврологического восстановления.

Действительно, полученные результаты показали, что развитие системной воспалительной реакции в первые 24–48 ч после ИИ сопровождается выраженными изменениями в содержании и балансе Т-клеток с регуляторной активностью, в частности снижением клеток с фенотипом Th1 ($CD4^+IFN\gamma^+$) и возрастанием Т-клеток с фенотипом Treg ($CD4^+CD25^{hi}$). Увеличение в циркуляции Treg в остром периоде ИИ согласуется с данными других авторов, интерпретирующих указанные изменения в качестве протективного механизма [9, 18]. Выявленная нами прямая взаимосвязь $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток с уровнем СРБ и НЛИ и обратная зависимость с количеством $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток свидетельствуют о возможном участии этих субпопуляций, соответственно, в позитивной и негативной регуляции системного воспалительного ответа. Кроме того, обнаруженная обратная взаимосвязь между содержанием $CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток позволяет полагать, что $CD4^+CD25^{hi}Treg$ в остром периоде ИИ способны подавлять Th1 ответ.

Важным результатом настоящего исследования является также выявление различий в содержании $CD4^+IFN\gamma^+$ и $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток, у пациентов, оппозитных по 3-месячному исходу. Так, пациенты с неблагоприятным исходом отличаются от оппозитной группы более высоким содержанием $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток, меньшим количеством $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток и 4-кратно более высоким индексом соотношения этих клеток. Полученные данные являются еще одним аргументом в пользу негативной роли $CD4^+IFN\gamma^+T$ -клеток и позитивной роли $CD4^+CD25^{hi}T$ -клеток в остром периоде ИИ. Следует отметить, что данные об изменениях $IFN\gamma$ продуцирующих $CD4^+T$ -клеток в первые дни после ИИ у человека отсутствуют. Поэтому обнаруженные нами изменения в содержании этих клеток, а также их взаимосвязь с системным воспалением и исходами являются новыми фактами. В экспериментальной модели окклюзии среднемозговой арте-

рии показано, что продуцируемый в селезенке IFN γ усиливает вторичное повреждение нервной ткани за счет повышения экспрессии в головном мозге провоспалительного белка IP-10. При этом снижение концентрации IFN γ с помощью IFN γ -нейтрализующих антител уменьшает объем ишемического поражения мозга и улучшает неврологическое восстановление [14]. Результаты настоящего исследования у человека также свидетельствуют о возможной негативной роли IFN γ в остром периоде ИИ. Кроме того, выраженные различия в индексе соотношения CD4⁺IFN γ ⁺ и CD4⁺CD25^{hi}T-клеток в группах с противоположными исходами свидетельствуют о значении данного показателя в качестве потенциального предиктора при оценке риска неблагоприятного исхода. Действительно, проведенный ROC-анализ показал «хорошее» качество прогноза неблагоприятного 3-месячного исхода, основанного на оценке соотношения CD4⁺IFN γ ⁺ и CD4⁺CD25^{hi}T-клеток в качестве монопредиктора, и «очень хорошее»

качество прогноза при комбинации данного показателя с баллом NIHSS.

Прогнозирование исходов инсульта имеет большое значение для оптимизации программ лечения и развития персонализированных подходов к терапии [8]. Наиболее часто для оценки прогноза в мировой практике используется шкала NIHSS. Тем не менее данная шкала не позволяет с высокой долей вероятности оценивать риски неблагоприятного исхода у отдельных больных. Поэтому поиск новых биомаркеров в качестве монопредикторов или в дополнении к шкале NIHSS представляется перспективным направлением исследований [17]. Согласно полученным нами данным, таким биомаркером может быть соотношение клеток с фенотипом Th1 и Treg и комбинация этого индекса с NIHSS. Однако корректная валидация предложенной прогностической модели требует дальнейших исследований на большей выборке.

Список литературы / References

1. Bonaventura A., Libérale L., Vecchié A., Casula M., Carbone F., Dallegri F., Montecucco F. Update on inflammatory biomarkers and treatments in ischemic stroke. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 12, E1967. doi:10.3390/ijms17121967.
2. 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 Flow Metab.*, 2012, Vol. 32, no. 4, pp. 598-611.
3. Gorelick P.B. The global burden of stroke: persistent and disabling. *Lancet Neurol.*, 2019, Vol. 18, no. 5, pp. 417-418.
4. Gu L., Jian Z., Sary C., Xiong X. T cells and cerebral ischemic stroke. *Neurochem. Res.*, 2015, Vol. 40, no. 9, pp. 1786-1791.
5. 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, Vol. 187, no. 3, pp. 1157-1165.
6. Jayaraj R.L., Azimullah S., Beiram R., Jalal F.Y., Rosenberg G.A. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *J. Neuroinflammation*, 2019, Vol. 16, no. 1, 142. doi: 10.1186/s12974-019-1516-2.
7. 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, Vol. 121, no. 4, pp. 679-691.
8. 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, Vol. 11, no. 8, pp. 4603-4613.
9. Liesz A., Kleinschnitz C. Regulatory T cells in post-stroke immune homeostasis. *Transl. Stroke Res.*, 2016, Vol. 7, no. 4, pp. 313-321.
10. Okeke E.B., Uzonna J.E. The pivotal role of regulatory T cells in the regulation of innate immune cells. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 680. doi:10.3389/fimmu.2019.00680.
11. Prajeeth C.K., Lohr K., Floess S., Zimmermann J., Ulrich R., Gudi V., Beineke A., Baumgartner W., Muller M., Huehn J., Stangel M. Effector molecules released by Th1 but not Th17 cells drive an M1 response in microglia. *Brain Behav. Immun.*, 2014, Vol. 37, pp. 248-259.
12. 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, Vol. 154, no. 3, pp. 363-376.
13. Saino O., Taguchi A., Nakagomi T., Nakano-Doi A., Kashiwamura S., Doe N., Nakagomi N., Soma T., Yoshikawa H., Stern D.M., Okamura H., Matsuyama T. Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke. *J. Neurosci. Res.*, 2010, Vol. 88, pp. 2385-2389.
14. 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, Vol. 9, no. 5, pp. 679-689.

15. Shi K., Wood K., Shi F.-D., Wang X., Liu Q. Stroke-induced immunosuppression and poststroke infection. *Stroke Vasc. Neurol.*, 2018, Vol. 3, no. 1, pp. 34-41.
16. Vogelgesang A. Catecholamines, steroids and immune alterations in ischemic stroke and other acute diseases. *Aging Dis.*, 2014, Vol. 5, no. 5, pp. 327-339.
17. Wouters A., Nysten C., Thijs V., Lemmens R. Prediction of outcome in patients with acute ischemic stroke based on initial severity and improvement in the first 24 h. *Front. Neurol.*, 2018, Vol. 9, 308. doi: 10.3389/fneur.2018.00308.
18. 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, Vol. 243, no. 1-2, pp. 89-94.
19. Zouggar 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, Vol. 120, no. 14, pp. 1415-1425.

Авторы:

Морозов С.А. — врач-иммунолог научно-консультативного отдела Клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Тихонова М.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Пронкина Н.В. — к.б.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии Клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Штоббе А.А. — к.м.н., заведующая отделением неврологии МБУЗ «Городская клиническая больница № 1», г. Новосибирск, Россия

Леплина О.Ю. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Шевела Е.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Morozov S.A., Clinical Immunologist, Scientific Advisory Department, Clinic for Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Pronkina N.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Clinical Immunology, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shtobbe A.A., PhD (Medicine), Head, Department of Neurology, City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

Leplina O.Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shevela E.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 03.04.2020
Принята к печати 23.04.2020

Received 03.04.2020
Accepted 23.04.2020