

УДК 616-092

## Нарушение функциональной активности естественных киллеров при экспериментальном инсульте различной степени тяжести

Кульчиков А.Е.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».  
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

**Актуальность.** Изучение факторов риска развития инфекционно-воспалительных осложнений и путей их снижения при инсульте является актуальной неврологической проблемой. **Цель:** оценка функциональной активности клеток естественных киллеров в остром периоде экспериментального инсульта различной степени тяжести. **Методы.** В проведенном экспериментальном исследовании на животных (крысы линии Вистар, массой 200–220 г, n = 50) изучали функциональную активность естественных киллеров селезенки, при моделировании монополюшарного левостороннего экспериментального инсульта (ЭИ) различной степени тяжести. **Результаты.** Показано, что у животных на 7-й день инсульта отмечается статистически значимое снижение функциональной активности естественных киллеров селезенки: ЭИ легкой степени – 20 (19; 23)%, p = 0,001, ЭИ средней степени – 19 (17; 21)%, p < 0,001, ЭИ тяжелой степени – 18 (16; 22)%, p < 0,001. Нарушения функциональной активности естественных киллеров более выражены на модели ЭИ средней и тяжелой степени тяжести. **Заключение.** Показано, что при ЭИ наблюдается снижение функциональной активности естественных киллеров селезенки, которое нарастает при увеличении степени тяжести инсульта.

**Ключевые слова:** экспериментальный инсульт; естественные киллеры; функциональная активность НК-клеток; различная степень тяжести инсульта.

**Для цитирования:** Кульчиков А.Е. Нарушение функциональной активности естественных киллеров при экспериментальном инсульте различной степени тяжести. Патогенез. 2018; 16(4): 124–127

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2018.04.124-127

**Для корреспонденции:** Кульчиков Андрей Евгеньевич, e-mail: andrey.kulchikov@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарности.** Выражаю слова благодарности моим учителям: д.м.н., профессору Макаренко А.Н., д.б.н., профессору Косицыну Н.С., д.м.н., профессору, член-корреспонденту РАН Морозову С.Г.

**Поступила:** 30.09.2018

## Disorder of natural killer cell functional activity in experimental stroke of different severity

Kulchikov A.E.

Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

**Background.** Studying risk factors for development of infectious and inflammatory complications and ways to reduce them in stroke is a modern challenge to neurology. **Aim:** Evaluating the functional activity of natural killer (NK) cells in the acute period of experimental stroke (ES) of different severity. **Methods.** In this experimental study, the functional activity of spleen NK cells was studied in Wistar rats weighing 200–220 g (n = 50) with ES of different severity. **Results.** On the 7th day of stroke, the functional activity of spleen NK was significantly decreased: in mild ES, 20 (19; 23)%, p = 0.001, in moderate ES, 19 (17; 21)%, p < 0.001, and in severe ES, (16; 22)%, p < 0.001. Disorders of the NK functional activity were more pronounced in moderate and severe ES. **Conclusion.** ES was associated with impaired functional activity of NK cells, which progressed with increasing grade of ES severity.

**Key words:** experimental stroke; natural killer cells; functional activity of NK-cells; stroke of varying severity grades.

**For citation:** Kulchikov A.E. [Disorder of natural killer cells functional activity in experimental stroke of different severity]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(4): 124–127 (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2018.04.124-127

**For correspondence:** Kulchikov Andrey Evgenievich, e-mail: andrey.kulchikov@gmail.com

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments.** I express my gratitude to my tutors: MD, PhD, Professor A.N. Makarenko, PhD, Dr.Sc., Professor N.S. Kositsyn, MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences Morozov S.G.

**Received:** 30.09.2018

## Введение

В настоящее время активно изучается проблема развития инфекционно-воспалительных осложнений (ИВО), таких как пневмония, гнойные поражения конъюнктивы и роговицы, инфекции мочевыделительной системы, нейроинфекции и т.д. при остром нарушении мозгового кровообращения [1, 2]. По данным эпидемиологических исследований, отмечено, что ИВО часто становятся причиной смерти при инсульте [3]. По мнению ряда авторов, ИВО возникают вследствие сочетанного действия ряда неблагоприятных факторов приводящих к развитию нарушения иммунного статуса и формированию вторичного иммунодефицита [3]. Нарушения иммунного статуса складывается из образования аутоантител к нервным клеткам, дисбаланса цитокинов и подавлением клеточного иммунитета [4]. При этом в условиях вторичного инсульт-индуцированного иммунодефицита наблюдается присоединения условно патогенной и патогенной микрофлоры и развитие различных ИВО [4]. Вместе с тем, остается неизученным вопрос о характере функциональных нарушений иммунокомпетентных клеток при инсульте различной степени тяжести. В качестве модели данного состояния представляется интересным оценить активность естественных киллеров, главная роль которых складывается в выявлении и уничтожении собственных клеток организма, в которых что-то нарушилось (заражение вирусом, опухолевые клетки и т.д.) [5, 6]. Ответ на данный вопрос позволит спрогнозировать риск развитие ИВО при инсульте. **Целью** данного экспериментального исследования было изучение функциональной активности иммунокомпетентных клеток в зависимости от степени тяжести инсульта.

## Материалы и методы исследования

Исследование было проведено на 50 крысах линии Вистар (самки, возраст 4 месяца, масса тела 200-220 г). В течение эксперимента животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с существующими правилами и международными стандартами [7].

*Моделирование экспериментального инсульта.* У животных под наркозом (диэтиловый эфир, стадия III<sub>3-4</sub>) была воспроизведена модель экспериментального инсульта (ЭИ) в условиях стереотаксиса (координаты внутренней капсулы слева: координаты:  $ML = 2,5$  мм;  $AP = 1,3$  мм;  $DV = 6$  мм), с помощью 5-6 вращательных движений мандрена-ножа, введенного через направляющую иглу-канюлю [8].

В зависимости от степени тяжести ЭИ, животным дополнительно через мандрен в область разрушенной внутренней капсулы вводили аутокровь (средняя степень тяжести ЭИ), а при тяжелой форме ЭИ в дополнение к введенной крови, вращательными движениями мандрена, разрушали вышележащие структуры головного мозга (от внутренней капсулы до коры головного мозга включительно). Всем ложнооперированным животным под наркозом проводили скальпирование и трепанацию черепа.

*Дизайн исследования.* Перед началом эксперимента животные были разделены на пять групп, каждая из ко-

торых состояла из 10 животных: контроль – интактные животные (группа 1); ложнооперированные животные (ЛО) (группа 2); животные с ЭИ легкой степени (группа 3); животные с ЭИ средней степени тяжести (группа 4); животные с ЭИ тяжелой степени тяжести (группа 5). На 7-е сутки животных забивали под эфирным наркозом для оценки функциональной (цитотоксической) активности естественных киллеров (НК-клеток) селезенки.

*Морфологический контроль очага инсульта.* Для проведения морфологического контроля повреждения мозга из каждой группы выбирали по одному животному, у которого, проводили гистологические исследования. Контроль топологии очага внутримозговой гематомы производили по фронтальным срезам мозга. Мозг крыс фиксировали в 10%-ном растворе формалина, подвергали стандартной гистологической проводке, выполняли срезы на микротоме «HistoRange» (LKB) толщиной 6 мкм с шагом 200 мкм, после чего срезы окрашивали по методу Ниссля, а также гематоксилином и эозином.

*Оценка цитотоксической активности естественных киллеров.* Функциональную (цитотоксическую) активность естественных киллеров селезенки (НК-клетки) оценивали при помощи проточной цитометрии. В качестве клеток-мишеней использовали две линии опухолевых клеток: К-562 и ЛСК (крысиная лимфосаркома, адаптированная к условиям суспензионного культивирования). Клетки-эффекторы (спленоциты) и клетки-мишени в соотношении 25:1 культивировали в среде RPMI (Sigma, USA), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, Sigma, USA) и 40 мкг/мл гентамицина в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 6 часов. Выживаемость клеток-мишеней оценивали цитофлуориметрически по включению йодистого пропидия (PI).

*Статистика.* Статистический анализ проводили с использованием программ Biostat, Statistica 10 и Exeel. Нормальность распределения определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Достоверность значений оценивали с помощью U-теста Манна-Уитни. Все значения даны в виде медиан и квартилей.

## Результаты исследования

При исследовании срезов головного мозга у всех животных с ЭИ различной степени тяжести, через сутки после операции обнаруживается зона кровоизлияния в области внутренней капсулы и деструкция тканей мозга. Помимо этого отмечаются выраженные изменения со стороны сосудов и межклеточного вещества, резко выраженный отек ткани мозга развивающийся в результате нарушения гемо- и ликвородинамики. Регистрируются резко выраженное полнокровие и явления стаза крови в мелких сосудах мозга, развитие отчетливого периваскулярного отека, а также обнаружение отдельных мелких («точечных») периваскулярных кровоизлияний. Отмечаются признаки набухания и значительный перинейритный отек (главным образом, в области дендритов). В неокортексе обнаруживаются признаки активации глиоцитов, что сопровождается усилением тинкториальных свойств их цитоплазмы в

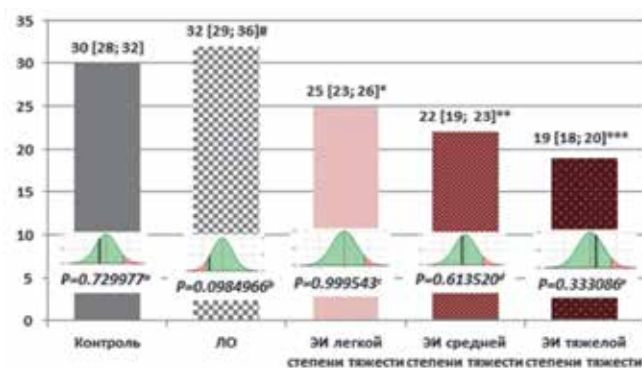
виде резкого гиперхроматоза и умеренного набухания ядер клеток. Указанные изменения сопровождаются отчетливым сателлитозом, т.е. скоплением нескольких глиальных клеток в области тел и дендритов пирамидных нейронов. В пирамидных нейронах отчетливо выражены явления центрального и периферического тигролиза. Об этом убедительно свидетельствует резкое сокращение субстанции Ниссля в цитоплазме клеток, причем в отдельных клетках глыбки сохраняются только в области парануклеарной цитоплазмы. Указанные морфологические изменения свидетельствуют о развитии характерных признаков инсульта при использовании данной модели.

Полученные данные по оценке цитотоксической активности естественных киллерных клеток селезенки (НК-клеток) у животных с различной степенью тяжести ЭИ на 7-е сутки после моделирования патологии указывают на снижение активности данных иммунокомпетентных клеток. Из приведенных данных в рис. 1 и 2 видно, что в группе ложнооперированных животных функциональная активность НК-клеток не снижается, как с клетками линии К-562 – группа контроля: 30 (28; 32)%, группа ЛО: 32 (29; 36)%, так и с клетками линии ЛСК – контроль: 29 (25; 30)%, ложнооперированные животные: 28 (26; 30)%, (в обоих случаях различия статистически незначимы).

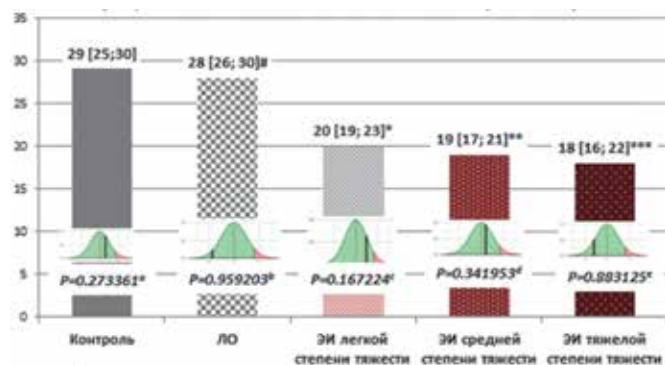
В тоже время у животных с моделью ЭИ в области внутренней капсулы наблюдается статистически значимое снижение функциональной активности естественных киллеров. Отмечено, что чем тяжелее степень тяжести ЭИ, тем более выраженное снижение активности НК-клеток с достоверными различиями (рис. 1 и 2). Причем статистически значимое снижение функциональной активности естественных киллеров прослеживается при тестировании с двумя линиями опухолевых клеток, т.е. линиями К-562 и клеток линии ЛСК. Эти данные указывают на угнетение активности НК-клеток непосредственно в периферическом органе иммунной системы, где происходит процесс дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

### Обсуждение

В ходе проведения исследования, показано, что в остром периоде ЭИ возникают снижение цитотоксической активности естественных киллеров, которые играют значимую роль в противовирусном и противоопухолевом иммунитете. Причем отмечено, что чем тяжелее инсульт, тем тяжелее снижение цитотоксической активности естественных киллеров. Полученные данные указывают на снижение внутриклеточных ресурсов натуральных киллеров, что проявляется низкой функциональной активностью и невозможностью полноценно утилизировать чужеродный антиген. Данная реакция при моделировании ЭИ, по-видимому, может быть связана с адаптационной реакцией организма при нарушении целостности гематоэнцефалического барьера и выбросу в периферическую кровь нейроантигенов, которые фактически чужеродны для иммунной системы. С другой стороны, данная реакция может объясняться также тем, что при инсульте раз-



**Рис. 1.** Функциональная активность НК-клеток селезенки у животных с различной степенью тяжести экспериментального инсульта (клетки линии К-562), %. Обозначения групп животных см. в разделе «Материалы и методы исследования». Статистическая значимость различий: # –  $p = 0,436$  по сравнению с контрольной группой; \*, \*\*, \*\*\* –  $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой. Внизу на столбцах приведены результаты проверки нормальности распределения выборки по критерию Шапиро-Уилка.



**Рис. 2.** Функциональная активность НК-клеток селезенки у животных с различной степенью тяжести экспериментального инсульта (клетки линии ЛСК), %. Обозначения – как на рис. 1.

вивается сильный стресс и нарушается нейроиммунный баланс, который приводит к развитию вторичного иммунодефицита. В клинической практике эти данные могут помочь практикующему врачу в плане мониторинга пациентов с инсультом, особенно при тяжелом течении заболевания, на предмет оценки риска развития ИВО.

### Заключение

Таким образом, моделирование инсульта в области внутренней капсулы слева приводит к угнетению натуральных киллеров, которые играют одно из ведущих мест в иммунном ответе.

### Список литературы

- Meschia J.F., Bushnell C., Boden-Albala B., Braun L.T., Bravata D.M., Chaturvedi S., Creager M.A., Eckel R.H., Elkind M.S., Fornage M., Goldstein L.B., Greenberg S.M., Horvath S.E., Iadecola C., Jauch E.C., Moore W.S., Wilson J.A.; American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Functional Genomics and Translational Biology; Council on Hypertension. Guidelines for the Primary Prevention of Stroke: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/

- American Stroke Association. *Stroke*. 2014; 45(12): 3754-3832. DOI: 10.1161/STR.0000000000000046
2. Truelsen T., Krarup L.H., Iversen H.K., Mensah G.A., Feigin V.L., Sposato L.A., Naghavi M. Causes of Death Data in the Global Burden of Disease Estimates for Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Neuroepidemiology*. 2015; 45(3): 152-160. DOI: 10.1159/000441084
  3. Hoffmann S., Harms H., Ulm L., Nabavi DG., Mackert BM., Schmehl I., Jungehulsing G.J., Montaner J., Bustamante A., Hermans M., Hamilton F., Göhler J., Malzahn U., Malsch C., Heuschmann P.U., Meisel C., Meisel A.; PREDICT Investigators. Stroke-induced immunodepression and dysphagia independently predict stroke-associated pneumonia – The PREDICT study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2017; 37(12): 3671-3682. DOI: 10.1177/0271678X16671964
  4. Stanley D., Mason L.J., Mackin K.E., Srikhanta Y.N., Lyras D., Prakash M.D., Nurgali K., Venegas A., Hill M.D., Moore R.J., Wong C.H. Translocation and dissemination of commensal bacteria in post-stroke infection. *Nat. Med.* 2016; 22(11): 1277-1284. DOI: 10.1038/nm.4194
  5. Магаева С.В., Морозов С.Г. Нейроиммунофизиология. Москва: Изд-во ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 2005. 160 с.
  6. Старченко А.А. Клиническая нейроиммунология хирургических заболеваний головного мозга. СПб.: Санкт-Петербургское медицинское издательство, 2001. 434 с.
  7. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington DC: National Academy Press, 1996. 345 p.
  8. Макаренко А.Н., Косицын Н.С., Пасикова Н.В., Свинов М.М. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у экспериментальных животных. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова. 2002; 52(6): 765-768.

## References

1. Meschia J.F., Bushnell C., Boden-Albala B., Braun L.T., Bravata D.M., Chaturvedi S., Creager M.A., Eckel R.H., Elkind M.S., Fornage M., Goldstein L.B., Greenberg S.M., Horvath S.E., Iadecola C., Jauch E.C., Moore W.S., Wilson J.A.; American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Functional Genomics and Translational Biology; Council on Hypertension. Guidelines for the Primary Prevention of Stroke: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014 Dec; 45(12): 3754–3832. doi: 10.1161/STR.0000000000000046. Epub 2014 Oct 28.
5. Magaeva S.V., Morozov S.G. [*Neuroimmunophysiology*]. M.: Publishing House of the V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 2005. 160 p. (in Russian)
6. Starchenko A.A. [*Clinical neuroimmunology of surgical diseases of the brain*]. SPb.: St. Petersburg Medical Publishing House, 2001. 434 p. (in Russian)
7. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington DC: National Academy Press, 1996. 345 p.
8. Makarenko A.N., Kositsyn N.S., Pasikova N.V., Svinov M.M. [Simulation of local cerebral hemorrhage in different brain structures of experimental animals]. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. I.P.Pavlova [I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity]*. 2002; 52(6): 765-768. (in Russian)

## Сведения об авторе:

Кульчиков Андрей Евгеньевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»