

УДК 616-092

Нарушение распределения лимфоцитов селезенки по фазам клеточного цикла при экспериментальном остром нарушении мозгового кровообращения различной степени тяжести

Кульчиков А.Е.¹, Морозов С.Г.¹, Мусин Р.С.², Гриненко Е.А.³¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации.

127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

³ Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр

нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

125047, Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, д. 16

Актуальность. Нарушение работы иммунной системы при инсульте играет важную патогенетическую роль в течении данного заболевания и складывается в целом на системном уровне из депрессии неспецифического и клеточного звена иммунитета, активации гуморального иммунитета, развития аутоиммунных реакций и дисбаланса в системе цитокинов. Однако в литературе не представлены данные, посвященные изучению статуса активности иммунокомпетентных клеток в зависимости от степени тяжести острой цереброваскулярной патологии.

Цель исследования: изучение пролиферативной активности и распределения лимфоцитов по фазам клеточного цикла при остром нарушении мозгового кровообращения (ОНМК) различной степени тяжести.

Материалы и методы: в экспериментальном исследовании на животных (крысы линии Вистар, массой 200-220 г, n = 55) изучали пролиферативную активность и распределение T- и B-лимфоцитов селезенки по фазам митотического цикла при экспериментальном ОНМК в левом полушарии (область внутренней капсулы) легкой, средней и тяжелой степени. У животных также оценивали неврологический статус с помощью шкалы Stroke-index McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной. Результаты: при оценке неврологического статуса на 3-и сутки от момента воспроизведения ОНМК выявлено, что тяжесть экспериментальной модели соответствует тяжести неврологического статуса животных. При моделировании ОНМК обнаружено изменение в распределении B-лимфоцитов по фазам клеточного цикла в виде снижения пролиферативной активности, на что указывает снижение пула клеток в группах ОНМК в фазе S, в которой происходит репликация ДНК (ОНМК легкой степени: 55,3% [52,7; 58,1]; ОНМК средней степени: 53,2% [50,9; 54,7]; ОНМК тяжелой степени: 46,2% [44,2; 50,0]), в фазе G2/M, в которой происходит деление клетки (ОНМК легкой степени: 1,1% [0,9; 1,3]; ОНМК средней степени: 0,8% [0,7; 1,1]; ОНМК тяжелой степени: 0,5% [0,5; 0,7]), и увеличение количества клеток в фазе G0/G1, в которой происходит синтез мРНК и белка (ОНМК легкой степени: 43,4% [40,8; 46,2]; ОНМК средней степени: 46,1% [44,4; 48,3]; ОНМК тяжелой степени: 53,3% [49,6; 55,4]), с достоверными отличиями от контроля. Указанные изменения нарастают с утяжелением модели ОНМК. Подобная тенденция отмечена в отношении T-лимфоцитов в группах ОНМК в виде снижения процента клеток в фазе S – в повышении пула клеток в фазах G0/G1, но при этом отмечается повышение количества лимфоцитов в фазах G2/M (ОНМК легкой степени: 2,9% [2,6; 3,2]; ОНМК средней степени: 3,8% [3,5; 4,1]; ОНМК тяжелой степени: 4,4% [4,1; 4,8]) с достоверными отличиями от контроля, что указывает на активное деление клеток. Данные изменения нарастают, при повышении степени тяжести ОНМК.

Заключение: острая цереброваскулярная патология приводит к нарушению распределения T- и B-лимфоцитов селезенки по фазам клеточного цикла и снижению их пролиферативной активности с нарастанием данных изменений с утяжелением степени тяжести инсульта.

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения; T-лимфоциты; B-лимфоциты; пролиферативная активность; фазы клеточного цикла.

Для цитирования: Кульчиков А.Е., Морозов С.Г., Мусин Р.С., Гриненко Е.А.. Нарушение распределения лимфоцитов селезенки по фазам клеточного цикла при экспериментальном остром нарушении мозгового кровообращения различной степени тяжести. Патогенез. 2019; 17(1): 56-65

DOI: 10.25557/2310-0435.2019.01.56-65

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.

Поступила: 20.10.2018

Disordered distribution of spleen lymphocytes over phases of the cell cycle in experimental stroke of different severity

Kulchikov A.E.¹, Morozov S.G.¹, Musin R.S.², Grinenko E.A.³

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,
Delegatskaya Str. 20, Bldg. 1, Moscow 127473, Russian Federation

³ N.N. Burdenko Neurosurgery Institute,
4th Tverskaya-Yamskaya Str. 16, Moscow 125047, Russian Federation

Background. Impairment of the immune system in stroke plays an important pathogenic role in development of this disease and generally consists at the systemic level of depressed non-specific and cellular immunity, activated humoral immunity, autoimmune reactions, and imbalance of the cytokine system. However, information about the relationship between activity of immunocompetent cells and severity of acute cerebrovascular disease is unavailable. Aim: To study proliferative activity and distribution of lymphocytes over phases of the cell cycle in stroke of different severity.

Materials and methods: This experimental study was performed on Wistar rats weighing 200–220 g (n=55). Proliferative activity and distribution of spleen T and B lymphocytes in the mitotic cycle were studied in the left hemisphere (capsula interna) on experimental models of mild, moderate and severe stroke. Neurological status of animals was evaluated using the Stroke-index McGraw scale modified by I.V. Gannushkina. Results: Assessment of the neurological status on the 3rd day after the onset of experimental stroke showed that the severity of experimental model corresponded to the severity of neurological status. Stroke was associated with changes in the distribution of B-lymphocytes over the cell cycle phases. This was evident as a decrease in proliferative activity shown by decreased pools of cells in the S-phase, in which DNA replication occurs (mild stroke, 55.3% [52.7; 58.1]; moderate stroke, 53.2% [50.9; 54.7]; severe stroke, 46.2% [44.2; 50.0]) and in the G2/M-phase, in which mitosis occurs (mild stroke, 1.1% [0.9; 1.3]; moderate stroke, 0.8% [0.7; 1.1]; severe stroke, 0.5% [0.5; 0.7]); and by increased pool of cells in the G0/G1 phase, in which mRNA and protein are synthesized (mild stroke, 43.4% [40.8; 46.2]; moderate stroke, 46.1% [44.4; 48.3]; severe stroke, 53.3% [49.6; 55.4]). These differences were significant compared with the control group. These changes increased with severity of the stroke model. A similar tendency was noted for T-lymphocytes in stroke groups – a decreased proportion of cells in the S-phase and an increased cell pool in the G0/G1-phases. However, in the G2/M-phases, the number of lymphocytes was increased (mild stroke, 2.9% [2.6; 3.2]; moderate stroke, 3.8% [3.5; 4.1]; severe stroke, 4.4% [4.1; 4.8]) and significantly different from the control, which indicated active mitosis. These changes increased with the severity of stroke.

Conclusion: acute cerebrovascular pathology results in disordered distribution of splenic T and B lymphocytes over cell cycle phases and decreased lymphocyte proliferative activity; these changes increased with the severity of experimental stroke.

Keywords: stroke; T-lymphocytes; B-lymphocytes; proliferative activity; phases of the cell cycle.

For citation: Kulchikov A.E., Morozov S.G., Musin R.S., Grinenko E.A. Disordered distribution of spleen lymphocytes over phases of the cell cycle in experimental stroke of different severity. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2019; 17(1): 56–65 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2019.01.56-65

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.

Received: 20.10.2018

Введение

Исследования последних лет показали, что нервная и иммунная системы тесно взаимосвязаны между собой и оказывают взаимное влияние друг на друга [1]. Стоит принимать во внимание важность нейроиммунных реакций при различных заболеваниях, особенно в условиях нарушения гематоэнцефалического барьера [2]. В последние годы накоплено множество данных по исследованию характера иммунных повреждений при остром нарушении мозгового кровообращения (ОНМК) [3–7]. Отмечено, что иммунная система играет важную роль в патогенезе инсульта, приводя в первую очередь к повреждению ЦНС за счет аутоиммунных реакций, а также к снижению иммунореактивности, и как следствие — развитие инфекционно-воспалительных осложнений (например, пневмонии) [8–14]. Последние, в свою очередь существенно отягощают течение ОНМК и часто являются причиной смерти [15]. В литературе представлены многочисленные данные, которые до-

вольно подробно раскрывают нарушения иммунореактивности при инсульте [3–14]. Данные нарушения складывается из аутоиммунной агрессии, дисбалансом в системе цитокинов, депрессий неспецифического и клеточного звена иммунитета, а также активацией гуморального иммунитета [8–10]. При этом остается нераскрытым вопрос о функциональных свойствах иммунокомпетентных клеток, в частности пролиферативной активности лимфоцитов и распределение их по фазам клеточного цикла. Также в литературе недостаточно данных о нарушении функциональной активности лимфоцитов при острой цереброваскулярной патологии различной степени тяжести, что является важным с точки зрения стратификации групп риска развития инфекционно-воспалительных осложнений. Раскрытие данных вопросов расширит понимание патогенеза ОНМК и может послужить базисом для разработки новых терапевтических подходов по введению больных с данным заболеванием. Целью данного исследования стало

изучение пролиферативной активности и распределение лимфоцитов по фазам клеточного цикла при ОНМК различной степени тяжести.

Материалы и методы исследования

Исследование было проведено на 55 крысах линии Вистар (самцы, возраст 4 месяца, масса 200—220 г). В течение эксперимента животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с существующими правилами и международными стандартами [15]. Исследование было выполнено в осеннее время года.

Моделирование левостороннего экспериментально-го ОНМК различной степени тяжести. У животных под наркозом (диэтиловый эфир, стадия III₃₋₄) была воспроизведена модель экспериментального левостороннего ОНМК (стереотаксические координаты внутренней капсулы слева: AP = 1,3 мм; ML = 2,5 мм; DV = 6 мм), с помощью 5-6 вращательных движений мандрена-ножа, введенного через направляющую иглу-канюлю [16]. В зависимости от степени тяжести моделируемого воздействия, животным дополнительно через мандрен в область разрушенной внутренней капсулы вводили аутокровь (средняя степень тяжести ОНМК), а при тяжелой форме ОНМК в дополнение к введенной крови, вращательными движениями мандрена, разрушали вышележащие структуры головного мозга с дополнительным введением аутокрови животного (от внутренней капсулы до коры головного мозга включительно) (табл. 1). Всем ложнооперированным животным под наркозом проводили скальпирование и трепанацию черепа слева.

Дизайн исследования. Перед началом эксперимента животные были разделены на пять групп, каждая из которых состояла из 11 животных: контроль – интактные животные (группа 1); ложнооперированные животные (ЛО) (группа 2); животные с ОНМК легкой степени (группа 3); животные с ОНМК средней степени тяжести (группа 4); животные с ОНМК тяжелой степени тяжести (группа 5). На 3-и сутки у всех групп животных оценивали неврологический статус для определения соответствия степени тяжести воспроизведенной модели ОНМК со степенью тяжести неврологического статуса, затем проводили эвтаназию под эфирным наркозом для оценки распределения лимфоцитов селезенки по фазам клеточного цикла.

Оценка неврологического статуса у экспериментальных животных. Неврологический статус у животных пяти экспериментальных групп определяли с помощью шкалы Stroke-index McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной [17, 18]. С целью адаптации животных, за 3 дня до начала эксперимента всем животным проводили оценку неврологического статуса по данной шкале. Значение индекса данной шкалы суммировали для каждого экспериментального животного.

Морфологический контроль очага инсульта. Для проведения морфологического контроля повреждения мозга через сутки после моделирования ОНМК 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%-м растворе формалина, подвергали стандартной гистологической проводке, выполняли срезы на микротоме «Hisorange» (LKB) толщиной 6 мкм с шагом 200 мкм, после чего срезы окрашивали по методу Ниссля, а также гематоксилином и эозином.

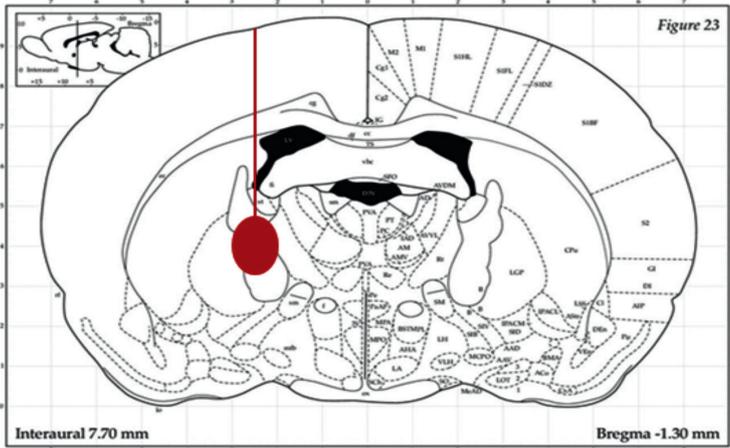
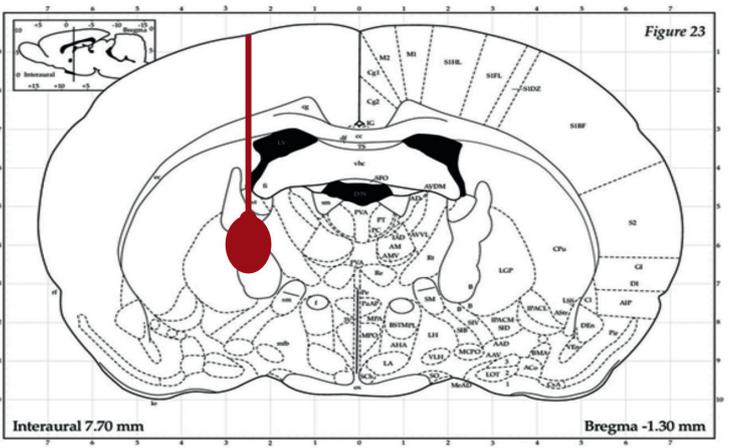
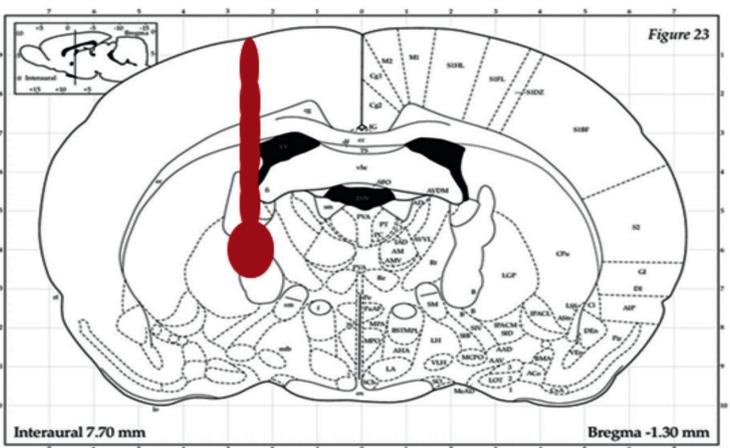
Оценка пролиферативной активности и распределения лимфоцитов по фазам клеточного цикла. Оценку пролиферативной активности определяли на 3-е сутки после операции на лимфоцитах селезенки – периферического органа иммунной системы, где происходит встреча антигена и иммунокомпетентных клеток и последующее формирование специфического иммунного ответа. Процесс индуцированной пролиферации Т- и В-лимфоцитов селезенки определяли с помощью метода проточной цитометрии, для чего ткань селезенки измельчали в среде RPMI-1640 и фильтровали до получения однородной клеточной суспензии. Клетки в концентрации 5×10^6 в 1 мл инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 3 суток в полной культуральной среде RPMI-1640 в присутствии митогенов. Состав полной культуральной среды: 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 200 мг/л глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 25 мМ 2-меркаптоэтанола. В качестве стимулятора Т-лимфоцитов использовали фитогемагглютинин (ФГА) в концентрации 30 мкг/мл. В качестве стимулятора В-лимфоцитов – липополисахарид E. coli (ЛПС) в концентрации 100 мкг/мл. По окончании культивирования спленоциты окрашивали флюорохромом PI. Для этого клетки в количестве 10^6 на пробу после отмывки в 5 мл забуференного физиологического раствора при 1000 об/мин в течение 10 мин ресуспендировали в 1 мл гипотонического лизирующего буфера (0,1% цитрата натрия, 0,1% Triton X-100, 5 мкг / мл PI, препараты компании «Sigma», США). После осторожного встряхивания клетки инкубировали при 22-25°C в течение 30 мин в темноте. Определяли распределение клеток по фазам клеточного цикла.

Статистический анализ проводили с использованием программ Biostat, Statistica 10.0 и Excel. Все значения даны в виде медианы и квартилей (Me [Q1; Q3]). Статистическую значимость межгрупповых различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Результаты исследования

Морфологический контроль. При оценке срезов ткани головного мозга у всех животных с моделью ОНМК различной степени тяжести, через сутки после операции обнаруживается зона кровоизлияния в области внутренней капсулы слева, в группе средней степени тяжести и в группе тяжелой модели ОНМК помимо зоны кровоизлияния в области внутренней капсулы слева, также отмечены признаки деструкции тканей мозга. У всех животных с моделью ОНМК вне

**Технология моделирования различных степеней тяжести экспериментального ОНМК у животных
(левополушарный инсульт в области внутренней капсулы).**

Технология моделей	Схема моделей острой цереброваскулярной патологии
<p align="center">Лёгкая степень тяжести ОНМК</p> <p>В условиях стереотаксиса (координаты: AP=1,3 мм; ML=2,5 мм; DV=6 мм), в область внутренней капсулы через направляющую иглу-канюлю вводится мандрен-нож, далее 5-6 вращательными движениями подсекаются сосуды данной области с получением локальной гематомы.</p>	<p align="center">Лёгкая степень тяжести ОНМК</p>  <p align="right">Figure 23</p> <p align="center">Interaural 7.70 mm Bregma -1.30 mm</p>
<p align="center">Средняя степень тяжести ОНМК</p> <p>Воспроизводится модель легкой степени тяжести экспериментального ОНМК, и в дополнение через мандрен в область разрушенной внутренней капсулы вводится аутокровь животного.</p>	<p align="center">Средняя степень тяжести ОНМК</p>  <p align="right">Figure 23</p> <p align="center">Interaural 7.70 mm Bregma -1.30 mm</p>
<p align="center">Тяжёлая степень ОНМК</p> <p>Воспроизводится модель средней степени тяжести экспериментального ОНМК, и в дополнение вращательными движениями мандрена, разрушали вышележащие структуры головного мозга с последующим введением аутокрови (от внутренней капсулы до коры включительно).</p>	<p align="center">Тяжёлая степень ОНМК</p>  <p align="right">Figure 23</p> <p align="center">Interaural 7.70 mm Bregma -1.30 mm</p>

зависимости от степени тяжести присутствуют выраженные изменения со стороны сосудов и межклеточного вещества, резко выраженный отек головного мозга, а также нарушение гемо- и ликводинамики. В группе контрольных и ложнооперированных животных патологические изменения не выявлены. Таким образом, описанные морфологические изменения свидетельствуют о развитии характерных признаков ОНМК при использовании данной модели, причем изменения были более выраженными в группе животных со средней и тяжёлой степенью ОНМК.

Оценка неврологического статуса. При оценке неврологического статуса на 3-й день после воспроизведения экспериментального ОНМК по шкале Stroke-index McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной было выявлено, что тяжесть экспериментальной модели соответствует тяжести неврологического статуса животных (табл. 2). Так, у животных с ОНМК тяжёлой степени, суммарный Stroke-index составляет 8,00 [7,50; 8,37], что значимо выше по сравнению с группой животных ОНМК средней тяжести и группой ОНМК легкой степени тяжести. При детальном разборе шкалы, показано, что у животных в основном отмечалась неврологическая симптоматика в правых конечностях, что также указывает на соответствие воспроизведенного экспериментального ОНМК в левом полушарии.

Оценка пролиферативной активности и распределения лимфоцитов по фазам клеточного цикла. Полученные данные по оценке пролиферативного пула лимфоцитов селезенки без стимуляции митогенами у животных с различной степенью тяжести ОНМК на 3-е сутки после моделирования патологии (табл. 3) указывают на достоверное снижение количества лимфоцитов в S-фазе (репликация ДНК) митотического цикла. Что говорит о снижении пролиферативной активности лимфоцитов при инсульте, со значимыми отличиями от контрольной группы. Статистически значимые различия прослеживаются также между группами ОНМК средней и лёгкой степени тяжести ($p = 0,002$) и между группами тяжёлого ОНМК и ОНМК средней степени ($p = 0,035$). Между группами контроля и ложнооперированными животными достоверных различий по изменению показателя лимфоцитов в S-фазе митоза не выявлено ($p = 0,796$). При этом наблюдается повышение коли-

чества клеток в фазе G2/M (подготовка к делению и митоз) – в группах с ОНМК по сравнению с контролем, и их процент растет с возрастанием тяжести ОНМК. Также в группах животных с ОНМК отмечено повышение процента лимфоцитов, которые находятся в фазе G0/G1 (синтез мРНК и белков) митотического цикла по сравнению с контролем с достоверными отличиями. Между интактными и ложнооперированными животными достоверных различий не выявлено (табл. 3).

При оценке распределения T-лимфоцитов (митоген ФГА) по фазам клеточного цикла у животных с различной степенью тяжестью ОНМК в остром периоде (3-е сутки) отмечена сходная тенденция, что и при распределении лимфоцитов без стимуляции митогеном, а именно: уменьшение пролиферативного пула T-лимфоцитов, находящихся в S-фазе митотического цикла. Процент T-лимфоцитов в S-фазе в группах с экспериментальным ОНМК был достоверно меньше по сравнению с контролем, также достоверные различия по этому параметру прослеживаются между группами ОНМК средней степени и лёгкой степени ($p = 0,05$), и ОНМК тяжёлой степени и средней степени ($p = 0,001$) (рисунок). В отношении фазы G2/M сохраняется тенденция увеличения пула T-лимфоцитов в группах животных с экспериментальным ОНМК по сравнению с контролем. Указанные изменения нарастают с повышением степени тяжести ОНМК. Различий между группами интактных и ложнооперированных животных по всем параметрам фазы клеточного цикла не отмечено.

Полученные данные указывают в целом на снижение пролиферативной активности лимфоцитов селезенки (без стимуляции митогенами) и T-лимфоцитов (митоген ФГА) при ОНМК, о чем свидетельствуют уменьшение пула лимфоцитов в фазе S клеточного цикла, в котором происходит репликация ДНК, при одновременном повышении процента лимфоцитов в фазе G0/G1 (фаза покоя, в данных фазах происходит синтез мРНК и белков) [19]. С другой стороны, отмечено повышение количества лимфоцитов, которые находятся в фазе G2/M, что указывает на активное деление, т.е. непосредственно пролиферацию клеток. Данные изменения в фазах клеточного цикла нарастают, с повышением степени тяжести инсульта.

Таблица 2.

Неврологический дефицит у животных с различной степенью тяжести экспериментального острого нарушения мозгового кровообращения.

Параметры	Экспериментальные группы				
	Контроль, $n = 10$	Ложная операция, $n = 10$	ОНМК, лёгкая степень, $n = 10$	ОНМК, средняя степень, $n = 10$	ОНМК, тяжёлая степень, $n = 10$
Stroke-index Me (Q1; Q3)	0	0	4,25 [3,13; 4,50]	6,25 [5,25; 6,88]	8,00 [7,50; 8,38]
p U-тест Манна-Уитни	-	-	<0,001*	<0,001* <0,001**	<0,001* <0,001** <0,001***

Примечания: обозначения статистической значимости различий: * – по сравнению с контрольной группой; ** – по сравнению с группой ОНМК лёгкая степень; *** – по сравнению с группой ОНМК средняя степень.

Интересный факт отмечен при анализе распределения В-лимфоцитов (митоген ЛПС) по фазам клеточного цикла, который заключается в общем снижении пролиферативной активности В-лимфоцитов, на что указывают снижение пула клеток в группах ОНМК в фазе S с достоверными отличиями по сравнению с группой контроля. Указанные изменения нарастают с утяжелением модели ОНМК, с достоверными различиями между группой ОНМК тяжёлой, средней ($p = 0,011$) и лёгкой степени ($p = 0,002$). В фазе G2/M отмечено также снижение пула клеток в группах ОНМК по сравнению с контролем. Данная тенденция нарастает с повышением степени тяжести с достоверными отличиями между группами с ОНМК. Отмечено также увеличение клеток в фазе G0/G1 в группах с ОНМК, с достоверными отличиями от контроля. Данные изменения также нарастают с повышением тяжести модели ОНМК со значимыми различиями между группами с экспериментальной патологией. Достоверной разницы между группой контроля и ложнооперированных животных по всем фазам митотического цикла выявлено не было (см. рисунок).

Обсуждение результатов

Проведенное исследование выявило некоторые закономерности системной реакции иммуокомпетентных клеток в остром периоде инсульта, которые проявляются в изменении распределения лимфоцитов по фазам клеточного цикла, причем данные изменения нарастают с увеличением степени тяжести

ОНМК. Выбранная модель инсульта в области внутренней капсулы слева (различной степени тяжести) соответствует тяжести неврологического статуса экспериментальных животных в острейшем периоде ОНМК.

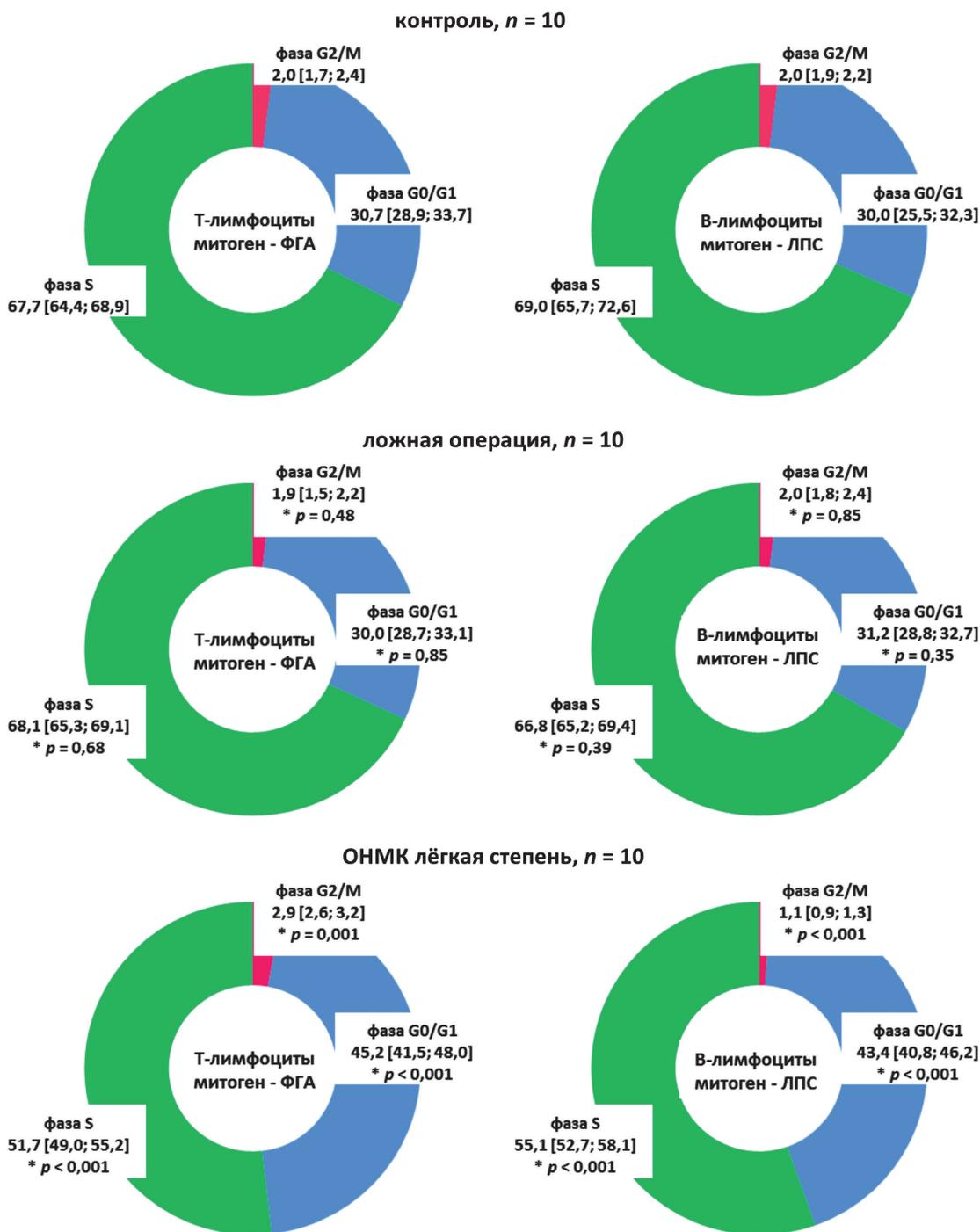
Изменения в распределении лимфоцитов по фазам митотического цикла складываются из увеличения доли клеток, которые находятся в фазе G0/G1, т.е. в фазе покоя, в которой происходит синтез мРНК и белков для последующего деления клетки и снижения доли клеток в фазе S, в которой наблюдается репликация ДНК, т.е. фактически активная подготовка к фазе G2/M. Данные нарушения характерны и для Т- и для В-лимфоцитов селезенки, они указывают в целом на снижение их пролиферативной активности и являются проявлением инсульт-индуцированного иммунодефицита, что соответствует данным литературы, в которых описывается снижение количества лимфоцитов в остром периоде инсульта [7]. Механизмы развития иммунодефицита при острой цереброваскулярной патологии связывают с активацией симпатоадреналовой системы и повышением уровня глюкокортикоидов и катехоламинов в периферической крови [20, 21]. Вместе с тем, в отношении Т-лимфоцитов отмечен интересный факт, который заключается в повышении пула лимфоцитов, находящихся в фазе G2/M (непосредственно деление клетки) на фоне уменьшения пула клеток в фазе S. То есть, с одной стороны наблюдается снижение пролиферации, в виде уменьшения пула клеток в фазе S и увеличения клеток в фазе G0/G1, а с другой стороны

Таблица 3.

Распределение лимфоцитов по фазам клеточного цикла при остром нарушении мозгового кровообращения в левом полушарии различной степени тяжести.

Экспериментальные группы	Параметры	Клетки в фазах клеточного цикла (%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Контроль, $n = 10$	Me [Q1; Q3]	30,36 [28,93; 31,89]	69,49 [67,97; 70,87]	0,15 [0,11; 0,18]
	p (*)	0,796	0,796	0,393
Ложная операция, $n = 10$	Me [Q1; Q3]	30,79 [28,68; 32,86]	69,11 [66,97; 71,16]	0,17 [0,14; 0,19]
	p (*)	0,796	0,796	0,393
ОНМК лёгкая степень, $n = 10$	Me [Q1; Q3]	41,86 [40,05; 43,17]	56,99 [55,01; 58,59]	1,93 [1,18; 2,02]
	p (*)	<0,001	<0,001	<0,001
ОНМК средняя степень, $n = 10$	Me [Q1; Q3]	46,43 [44,62; 51,83]	50,58 [45,82; 52,81]	2,69 [2,56; 2,85]
	p (*)	<0,001	<0,001	<0,001
	p (**)	0,009	0,002	<0,001
ОНМК тяжёлая степень, $n = 10$	Me [Q1; Q3]	51,15 [49,12; 52,33]	44,74 [43, 27; 47,04]	4,07 [3,83; 4,23]
	p (*)	<0,001	<0,001	<0,001
	p (**)	<0,001	<0,001	<0,001
	p (***)	0,143	0,035	<0,001

Примечания: обозначения статистической значимости различий (по критерию Манна-Уитни): * – по сравнению с контрольной группой; ** – по сравнению с группой ОНМК лёгкая степень; *** – по сравнению с группой ОНМК средняя степень.



Продолжение рисунка см. на стр. 63.

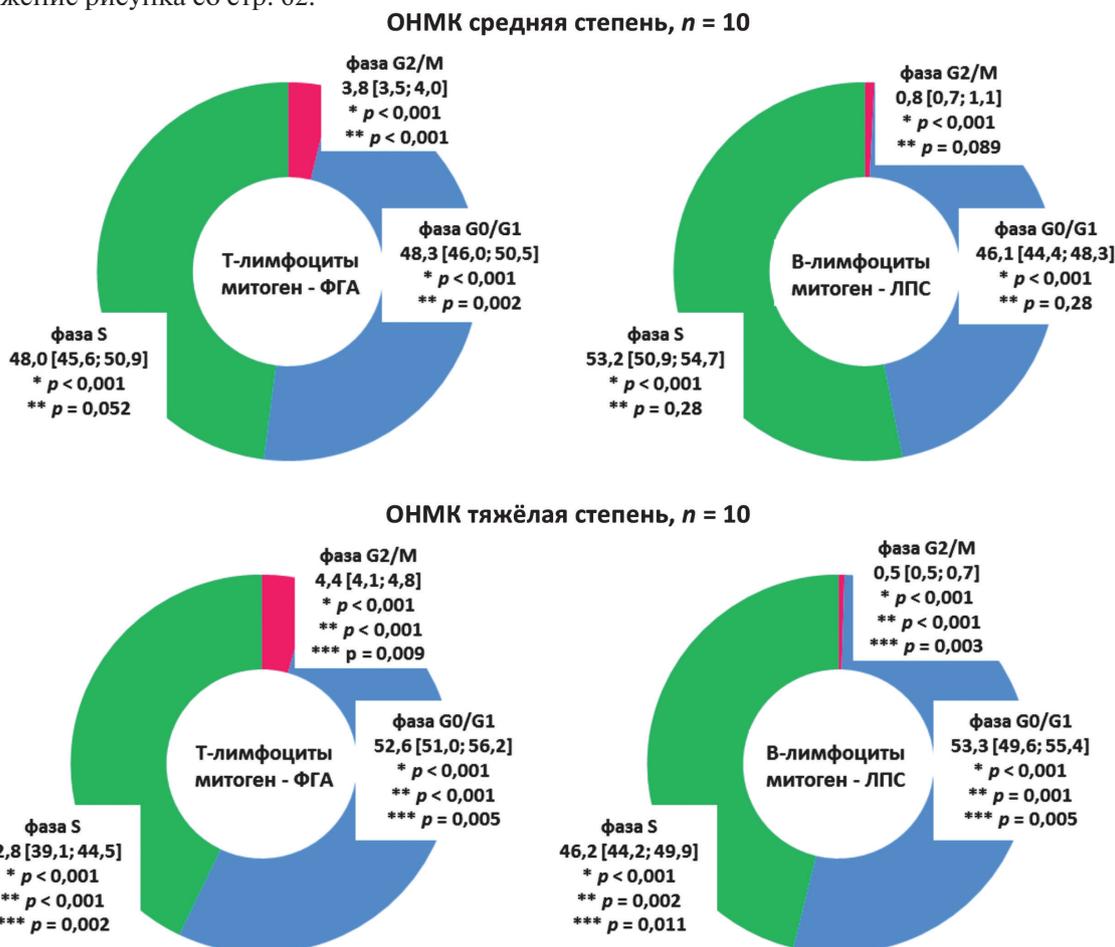
Распределение Т- и В-лимфоцитов селезенки по фазам клеточного цикла (%) при экспериментальном ОНМК в левом полушарии различной степени тяжести. Обозначения: статистической значимости различий (по критерию Манна-Уитни): * — по сравнению с контрольной группой; ** — по сравнению с группой ОНМК лёгкая степень; *** — по сравнению с группой ОНМК средняя степень.

увеличение клеток в фазе G2/M. Данная особенность распределения Т-лимфоцитов по фазам клеточного цикла, по-видимому, связана с ускоренным переходом определенного пула Т-лимфоцитов в фазу деления клетки в виде ответа системного иммунитета на выброс нейроантигенов, учитывая специфику мо-

дели ОНМК. Ускоренный переход из фазы S в фазу G2/M можно также связать с возможным влиянием выброса нейротрофических факторов на факторы регуляции митоза [22].

Распределение В-лимфоцитов по фазам клеточного цикла выражается не только в уменьшения

Продолжение рисунка со стр. 62.



Распределение Т- и В-лимфоцитов селезенки по фазам клеточного цикла (%) при экспериментальном ОНМК в левом полушарии различной степени тяжести. Обозначения: статистической значимости различий (по критерию Манна-Уитни): * — по сравнению с контрольной группой; ** — по сравнению с группой ОНМК лёгкая степень; *** — по сравнению с группой ОНМК средняя степень.

пула клеток, находящихся в фазе S и увеличении доли клеток в фазе G0/G1, но и в уменьшении доли клеток в фазе G2/M, что указывает на снижение пролиферативной активности В-лимфоцитов и подавление гуморального звена иммунитета в остром периоде ОНМК. Подавление пролиферативной активности В-лимфоцитов в нашем исследовании соответствует данным литературы, по снижению количества циркулирующих В-клеток селезенки при инсульте [23].

Еще одна закономерность, обнаруженная в данном исследовании — это нарастание нарушения распределения и Т- и В-лимфоцитов по фазам клеточного цикла и снижение пролиферативной активности при увеличении тяжести острой цереброваскулярной патологии. Это имеет ключевое значение для выделения определённых групп риска среди пациентов с инсультом, для оценки иммунного статуса и рассмотрения вопроса о проведении иммунокоррекции с целью профилактики инфекционно-воспалительных осложнений.

Заключение

Таким образом, моделирование экспериментального ОНМК различной степени тяжести с локализацией очага инсульта в области внутренней капсулы слева в остром периоде приводит к нарушению распределения Т- и В-лимфоцитов по фазам клеточного цикла что выражается в снижении пролиферативной активности данных иммунокомпетентных клеток, которое нарастает с увеличением степени тяжести острого нарушения мозгового кровообращения.

Список литературы

- Mueller K.L., Hines P.J., Travis J. Neuroimmunology. Science. 2016; 353(6301): 760-761. DOI: 10.1126/science.353.6301.760
- Jassam Y.N., Izzy S., Whalen M., McGavern D.B., El Khoury J. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. Neuron. 2017; 95(6): 1246-1265. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.07.010
- Rayasam A., Hsu M., Kijak J.A., Kissel L., Hernandez G., Sandoz 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; 154(3): 363-376. DOI: 10.1111/imm.12918

4. Malone K., Amu S., Moore A.C., Waeber C. The immune system and stroke: from current targets to future therapy. *Immunol. Cell Biol.* 2019; 97(1): 5-16. DOI: 10.1111/imcb.12191
5. Kim E., Cho S. Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Stroke. *Neurotherapeutics.* 2016; 13(4): 702-718. DOI: 10.1007/s13311-016-0463-1
6. Ao L.Y., Yan Y.Y., Zhou L., Li C.Y., Li W.T., Fang W.R., Li Y.M. Immune Cells After Ischemic Stroke Onset: Roles, Migration, and Target Intervention. *J. Mol. Neurosci.* 2018; 66(3): 342-355. DOI: 10.1007/s12031-018-1173-4
7. Черных Е.П., Шевела Е.Я., Морозов С.А., Останин А.А. Иммунопатогенетические аспекты ишемического инсульта. *Медицинская иммунология.* 2018; 20(1): 19-34. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-19-34
8. Chamorro Á., Meisel A., Planas A.M., Urra X., van de Beek D., Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nat. Rev. Neurol.* 2012; 8(7): 401-410. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.98
9. Hannawi Y., Hannawi B., Rao C.P., Suarez J.I., Bershada E.M. Stroke-associated pneumonia: major advances and obstacles. *Cerebrovasc. Dis.* 2013; 35(5): 430-443. DOI: 10.1159/000350199
10. Iadecola C., Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* 2011; 17(7): 796-808. DOI: 10.1038/nm.2399
11. Stott D.J., Falconer A., Miller H., Tilston J.C., Langhorne P. Urinary tract infection after stroke. *QJM.* 2009; 102(4): 243-249. DOI: 10.1093/qjmed/hcp012
12. Hug A., Dalpke A., Wiczorek N., Giese T., Lorenz A., Auffarth G., Liesz A., Veltkamp R. Infarct volume is a major determinant of post-stroke immune cell function and susceptibility to infection. *Stroke.* 2009; 40(10): 3226-3232. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.557967
13. Urra X., Miró F., Chamorro A., Planas A.M. Antigen-specific immune reactions to ischemic stroke. *Front. Cell Neurosci.* 2014; 8: 278. DOI: 10.3389/fncel.2014.00278
14. 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; 11: 110. DOI: 10.1186/1471-2377-11-110
15. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Source 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. 246 p.
16. 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 имени И.П. Павлова.* 2002; 52 (6): 765-768.
17. Ганнушкина И.В. Иммунологические аспекты травмы и сосудистых поражений головного мозга. М.: Медицина, 1974. 199 с.
18. Ганнушкина И.В. Патофизиологические механизмы нарушений мозгового кровообращения и новые направления в их профилактике и лечении. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова.* 1996; 96(1): 14-20.
19. Bell S.P., Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 2002; 71: 333-374. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135425
20. 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; 4(3): 170-175.
21. Meisel C., Schwab J., Prass K., Meisel A., Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005; 6 (10): 775-786. DOI: 10.1038/nrn1765
22. Stone W.L., Varacallo M. *Physiology, Growth Factor.* StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
23. 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; 176(11): 6523-6531.

References

1. Mueller K.L., Hines P.J., Travis J. *Neuroimmunology.* Science. 2016; 353(6301): 760-761. DOI: 10.1126/science.353.6301.760
2. Jassam Y.N., Izzy S., Whalen M., McGavern D.B., El Khoury J. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron.* 2017; 95(6): 1246-1265. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.07.010
3. Rayasam A., Hsu M., Kijak J.A., Kissel L., Hernandez G., Sander 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; 154(3): 363-376. DOI: 10.1111/imm.12918
4. Malone K., Amu S., Moore A.C., Waeber C. The immune system and stroke: from current targets to future therapy. *Immunol. Cell Biol.* 2019; 97(1): 5-16. DOI: 10.1111/imcb.12191
5. Kim E., Cho S. Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Stroke. *Neurotherapeutics.* 2016; 13(4): 702-718. DOI: 10.1007/s13311-016-0463-1
6. Ao L.Y., Yan Y.Y., Zhou L., Li C.Y., Li W.T., Fang W.R., Li Y.M. Immune Cells After Ischemic Stroke Onset: Roles, Migration, and Target Intervention. *J. Mol. Neurosci.* 2018; 66(3): 342-355. DOI: 10.1007/s12031-018-1173-4
7. Chernykh E.R., Shevela E.Ya., Morozov S.A., Ostanin A.A. [Immunopathogenic aspects of ischemic stroke]. *Medicinskaya immunologiya [Medical immunology].* 2018; 20(1): 19-34. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-19-34 (in Russian)
8. Chamorro Á., Meisel A., Planas A.M., Urra X., van de Beek D., Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nat. Rev. Neurol.* 2012; 8(7): 401-410. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.98
9. Hannawi Y., Hannawi B., Rao C.P., Suarez J.I., Bershada E.M. Stroke-associated pneumonia: major advances and obstacles. *Cerebrovasc. Dis.* 2013; 35(5): 430-443. DOI: 10.1159/000350199
10. Iadecola C., Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* 2011; 17(7): 796-808. DOI: 10.1038/nm.2399
11. Stott D.J., Falconer A., Miller H., Tilston J.C., Langhorne P. Urinary tract infection after stroke. *QJM.* 2009; 102(4): 243-249. DOI: 10.1093/qjmed/hcp012
12. Hug A., Dalpke A., Wiczorek N., Giese T., Lorenz A., Auffarth G., Liesz A., Veltkamp R. Infarct volume is a major determinant of post-stroke immune cell function and susceptibility to infection. *Stroke.* 2009; 40(10): 3226-3232. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.557967
13. Urra X., Miró F., Chamorro A., Planas A.M. Antigen-specific immune reactions to ischemic stroke. *Front. Cell Neurosci.* 2014; 8: 278. DOI: 10.3389/fncel.2014.00278
14. 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; 11: 110. DOI: 10.1186/1471-2377-11-110
15. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Source 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. 246 p.
16. Makarenko A.N., Kositsyn N.S., Pasikova N.V., Svinov M.M. [The method of modeling local hemorrhage in various structures of the brain in experimental animals]. *Zhurnal vysshei nervnoi deyatel'nosti im. I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity].* 2002; 52(6): 765-768. (in Russian)
17. Gannushkina I.V. [Immunological aspects of trauma and vascular lesions of the brain]. М.: Medicine, 1974. 199 p. (in Russian)

-
18. Gannushkina I.V. [Pathophysiological mechanisms of cerebral circulation disorders and new directions in their prevention and treatment]. Zhurnal nevrologii i psichiatrii im. S.S. Korsakova [S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry]. 1996; (1): 14-20. (in Russian)
 19. Bell S.P., Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. Annu. Rev. Biochem. 2002; 71: 333-374. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135425
 20. 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; 4(3): 170-175.
 21. Meisel C., Schwab J., Prass K., Meisel A., Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. Nat. Rev. Neurosci. 2005; 6 (10): 775-786. DOI: 10.1038/nrn1765
 22. Stone W.L., Varacallo M. Physiology, Growth Factor. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
 23. 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; 176(11): 6523-6531.

Сведения об авторах:

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»

Морозов Сергей Георгиевич – доктор медицинский наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Мусин Рашид Сяитович – доктор медицинский наук, профессор кафедры нервных болезней лечебного факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Гриненко Елена Анатольевна – доктор медицинский наук, научный сотрудник Отделения реанимации и интенсивной терапии Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации