

ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ РІЗНИХ ПІДТИПАХ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ В ГОСТРОМУ ПЕРІОДІ

ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ РІЗНИХ ПІДТИПАХ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ В ГОСТРОМУ ПЕРІОДІ – Вивчено вміст основних субпопуляцій Т-лімфоцитів при різних підтипах ішемічного інсульту (ІІ) в гострому періоді. Достовірно нижчі значення CD³⁺ та CD⁴⁺-лімфоцитів виявлено у хворих з атеротромботичним інсультом, порівняно з іншими підтипами ІІ, CD⁸⁺ та CD¹⁶⁺-лімфоцитів при атеротромботичному та кардіоемболічному ІІ.

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПОДТИПАХ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ – Изучено уровень основных субпопуляций Т-лимфоцитов при разных подтипах ишемического инсульта (ИИ) в остром периоде. Достоверно ниже значения CD³⁺ и CD⁴⁺-лимфоцитов наблюдались у пациентов с атеротромботическим инсультом, в сравнении с другими подтипами ИИ, CD⁸⁺ и CD¹⁶⁺-лимфоцитов при атеротромботическом и кардиоэмболическом ИИ.

FEATURES OF CELL IMMUNITY AT DIFFERENT SUBTYPES OF ISCHEMIC STROKE IN ACUTE PERIOD – The content of basic subpopulations of T-lymphocytes at different subtypes of ischemic stroke (IS) in the acute period was studied. Significantly lower values of CD³⁺ and CD⁴⁺-lymphocytes were found out in patients with atherothrombotic stroke compared with other subtypes of IS, CD⁸⁺ and CD¹⁶⁺-lymphocytes in atherothrombotic and cardioembolic IS.

Ключові слова: підтипи ішемічного інсульту, гострий період, Т-лімфоцити.

Ключевые слова: подтипы ишемического инсульта, острый период, Т-лимфоциты.

Key words: subtypes of ischemic stroke, acute period, T-lymphocytes.

ВСТУП У даний час не викликає сумнівів, що поряд з іншими факторами, в патогенезі ішемічного інсульту (ІІ) важлива роль належить імунологічним механізмам [2]. Структурно-функціональні зміни при інсульті запускають як місцеву, так і системну запальну відповідь через порушення гематоенцефалічного бар'єра [3]. Центральні пошкодження регуляції клітинної та гуморальної ланки імунітету призводять до гіперактивації або депресії імунної відповіді [1]. Більшість авторів виявила у гострому періоді асоціацію ІІ з пригніченням Т-клітинної ланки імунної системи (зменшення числа Т-лімфоцитів, Т-хелперів, цитотоксичних Т-лімфоцитів) [5, 12] і зниженням активності NK-клітин [4]. Дослідження останніх років на моделях гризунів показали, що Т-клітини накопичуються в зоні ішемії вже протягом перших 24 год після осередкової церебральної ішемії-реперфузії і впливають на розвиток запалення у тканинах і їх пошкодження [15]. В останні роки багато зусиль було віддано ролі специфічних Т-підтипів клітин при ІІ. Результати досліджень свідчать про зміни клітинного імунітету при ІІ у гострому періоді залежно від тяжкості захворювання та віку хворих. Зокрема, встановлено, що ступінь імунологічних порушень корелює з тяжкістю перебігу інсульту і прогнозом захворювання [10]. Для тяжчого перебігу і несприятливого наслідку інсульту характерне

більш виражене зменшення числа Т-лімфоцитів, Т-хелперів, підвищення рівнів ІgА і циркулюючих імунних комплексів. Хоча протизапальні підходи у лікуванні ІІ виявилися успішними в моделях на тваринах [9, 14], проте спроби перенести їх у клінічне застосування не увінчалися успіхом [7], можливо, через неоднорідність механізмів постішемічного запалення мозку. В даний час ІІ з позицій патогенезу розглядають як гетерогенний механізм і тому особливості імунної відповіді при різних типах мозкового інфаркту потребують уточнення.

Метою роботи стало дослідити особливості змін клітинного імунітету при різних підтипах ІІ у гострому періоді.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Було обстежено 86 хворих з різними підтипами ІІ, які знаходилися на стаціонарному лікуванні в інсультному відділенні Тернопільської обласної комунальної клінічної психоневрологічної лікарні. Тип ІІ встановлено відповідно до критеріїв TOAST. Гемодинамічний ішемічний інсульт (ГДІ) діагностовано у 24 (27,9 %) обстежуваних пацієнтів, атеротромботичний (АТІ) – у 19 (22,1 %), кардіоемболічний (КЕІ) – у 23 (26,4 %) та лакунарний (ЛІ) – у 20 (22,2 %) хворих. ІІ в каротидному басейні спостерігали – у 68 (79,1 %), у вертебробазиллярному – в 18 (20,9 %) пацієнтів. Вік хворих склав від 45 до 75 років (у середньому (59,4±3,7) р.): від 45 до 60 років – 41 (47,7 %), старше 60 років – 45 (52,3 %) пацієнтів. Середній вік хворих з ГДІ становив (60,0±2,4) р., з АТІ – (67,1±1,9) р., з КЕІ – (63,8±3,7) р. та з ЛІ – (61,1±2,8) р. Частка чоловіків була 48 (55,8 %), жінок – 38 (44,2 %).

До обстеження було включено хворих, яких госпіталізовано у перші 24 год від початку мозкового інфаркту. Критеріями виключення були: наявність повторних ІІ та порушення свідомості глибше за сопор (за шкалою Глазго менше 9–10 балів) та пацієнти з поліорганою недостатністю (серцево-легеневою декомпенсацією, хронічною нирковою патологією). Діагноз мозкового інфаркту верифікували за допомогою спіральної комп'ютерної томографії (Astelon 4, Toshiba). Тяжкість стану хворих та ступінь неврологічного дефіциту оцінювали за шкалою NIHSS на 1-шу добу інсульту. Відповідно до шкали NIHSS легкий ІІ діагностовано у 25 (29,1 %) хворих, середнього ступеня тяжкості – у 37 (43,0 %), тяжкий – у 16 (18,6 %) та дуже тяжкий – у 8 (9,3 %).

Для оцінки стану клітинного імунітету визначали вміст лейкоцитів, лімфоцитів, основних субпопуляцій лімфоцитів: зрілих Т-лімфоцитів (CD³⁺), Т-хелперів (CD⁴⁺), цитотоксичних лімфоцитів (CD⁸⁺), натуральних кілерів – NK-клітин (CD¹⁶⁺) та В-клітин (CD²²⁺) за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами, на яких адсорбовані моноклональні антитіла проти рецепторів відповідних типів лімфоцитів (фірма “Гранум”, Україна).

Статистичну обробку отриманих результатів виконано за допомогою пакета статистичного аналізу “ІВМ

SPSS Statistics 21st. Визначали середнє значення (M), та стандартну помилку (m). Порівняння вибірок здійснено із застосуванням критерію Стьюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Виявлено, що гострий ІІ перебігає на фоні ряду імунних порушень. У всіх обстежуваних хворих спостерігали лейкоцитоз та відносну лімфопенію. Відмічено пригнічення Т-клітинної ланки імунітету (табл. 1). Достовірно ($p < 0,05$) зменшувався по відношенню до контролю рівень зрілих Т-лімфоцитів (CD^{3+}). Одночасно у гострому періоді ІІ достовірно знижувалася кількість імунорегуляторних субпопуляцій лімфоцитів: Т-хелперів (CD^{4+}) і цитотоксичних Т-лімфоцитів (CD^{8+}) ($p < 0,05$). Відмічено достовірне ($p < 0,05$) підвищення співвідношення між вмістом CD^{4+} та CD^{8+} -лімфоцитів, що вказувало на більш значне зниження кількості цитотоксичних клітин. Спостерігали достовірно нижчий рівень НК-клітин по відношенню до КГ. Вміст В-лімфоцитів достовірно ($p < 0,05$) зростав у гострому періоді церебральної ішемії.

Отже, отримані дані свідчили про Т-клітинний імунodefіцит, пов'язаний з імунним постішемичним запаленням нейрональних і гліальних структур мозку при церебральній ішемії. Ці результати підтвердили дані інших досліджень, що вказували на зменшення кількості Т-лімфоцитів зі змінами їх субпопуляційного складу і порушенням активності НК-клітин при ІІ [12]. Такі зміни можуть бути пояснені виникаючим при ІІ тяжким стресом всього організму, та імунної системи зокрема. Це призводить до перерозподілу і фіксації лімфоцитів у лімфоїдних органах, затримкою виходу попередників з кісткового мозку. Зменшення кількості Т-лімфоцитів, їх основних субпопуляцій, НК-клітин в периферійній крові може виникати і як результат міграції цих клітин через пошкоджений гематоенцефалічний бар'єр у вогнище ішемії у центральній нервовій системі для участі в локальній імунній відповіді.

Проаналізовано вміст основних субпопуляцій Т-лімфоцитів при різних патогенетичних підтипах ІІ (табл. 2).

Виявлено, що при всіх підтипах ІІ по відношенню до КГ достовірно ($p < 0,05$) зростав лейкоцитоз. Найнижча кількість лімфоцитів була при КЕІ, ГДІ, дещо більша при АТІ та ЛІ. При всіх підтипах ІІ вміст лімфоцитів був достовірно ($p < 0,05$) нижчим, ніж у групі контролю.

Кількість зрілих лімфоцитів також односпрямовано змінювалася при різних підтипах ІІ у бік їх зниження і була достовірно ($p < 0,05$) нижчою, ніж у КГ. Найбільше знижувався вміст CD^{3+} -клітин при АТІ. Достовірно ($p < 0,05$) вищий, ніж при АТІ, рівень цих лімфоцитів діагностовано у хворих з ЛІ, ГДІ та КЕІ. Так само виявлено, що при всіх підтипах мозкового інфаркту достовірно нижчим, ніж у КГ, був вміст Т-хелперів (CD^{4+} -клітин). Найнижчі значення також відмічали в пацієнтів з АТІ порівняно із пацієнтами з іншими підтипами ІІ (достовірно нижчі, ніж при ГДІ, ЛІ та КЕІ). Одночасно серед пацієнтів з АТІ у групі хворих з пневмонією (4 пацієнти) вміст CD^{4+} -лімфоцитів був найнижчим і становив ($24,56 \pm 0,42$) %. Попередньо було продемонстровано, що CD^{4+} є однією з основних причин запалення мозку при транзиторній оклюзії СМА. Дослідження з використанням прижиттєвої відеомікроскопії засвідчили, що CD^{4+} та CD^{8+} Т-лімфоцити мають значний вплив на зниження мозкового ішемічно-реперфузійного індукування лейкоцитів і адгезію тромбоцитів у мікроциркуляторному руслі після впливу фокальної церебральної ішемії-реперфузії [15]. Також було показано, що CD^{4+} -лімфоцити роблять значний внесок у запальні та тромбогенні реакції при інфаркті головного мозку і неврологічні розлади, пов'язані з експериментальним інсультом. Неоднозначні дані відмічено щодо того, як різні підтипи CD^{4+} -лімфоцитів впливають на патогенез ІІ. Зокрема, встановлено,

Таблиця 1. Вміст основних субпопуляцій лімфоцитів у гострому періоді ІІ (M±m)

Показник	КГ (n=26)	Хворі з ІІ (n=86)
Лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	6,22±0,21	8,12±0,18*
Лімфоцити, %	30,41±0,77	23,41±0,65*
CD^{3+} -лімфоцити, %	57,29±1,02	38,21±0,56*
CD^{4+} -лімфоцити, %	32,27±0,65	27,77±0,31*
CD^{8+} -лімфоцити, %	19,52±0,44	10,70±0,25*
CD^{4+}/CD^{8+}	1,65±0,19	2,62±0,05*
CD^{16+} -лімфоцити, %	19,10±1,95	8,19±0,20*
CD^{22+} -лімфоцити, %	19,7±0,35	24,30±0,29*

Примітка. * – показники достовірні по відношенню до показників КГ ($p < 0,05$).

Таблиця 2. Показники клітинного імунітету при різних підтипах ІІ (M±m)

Показник	Підтип ІІ			
	КЕІ (n=23)	АТІ (n=19)	ГДІ (n=24)	ЛІ (n=20)
Лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	9,72±0,42	8,2±0,37	10,02±0,49	7,11±0,28
Лімфоцити, %	19,51±0,35	23,03±0,62	20,12±0,27	26,34±0,31
CD^{3+} -лімфоцити, %	38,50±1,10	36,00±1,28	39,27±1,16	41,00±0,84
CD^{4+} -лімфоцити, %	27,90±0,52	25,55±0,86	28,09±0,75	29,02±0,43
CD^{8+} -лімфоцити, %	10,66±0,40	9,55±0,39	11,01±0,46	12,12±0,58
CD^{4+}/CD^{8+}	2,51±0,09	2,75±0,10	2,71±0,11	2,44±0,06
CD^{16+} -лімфоцити, %	7,91±0,31	7,90±0,30	8,07±0,35	9,22±0,50
CD^{22+} -лімфоцити, %	24,89±0,53	24,50±0,54	24,81±0,29	22,48±0,38

що CD⁴⁺ TH1-клітини посилюють місцеві запальні зміни у вогнищі ішемії шляхом посиленого випуску прозапальних цитокінів, включаючи ІЛ-2, ІЛ-12, ІFN- γ і TNF- α , тоді як CD⁴⁺ TH2-клітини мають захисну роль через виділення протизапальних цитокінів, таких, як ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-10 та ІЛ-13 [6].

Найнижчий вміст CD⁸⁺-лімфоцитів виявлено у хворих з АТІ та КЕІ (достовірно нижчий, ніж при ГДІ та ЛІ). CD⁸⁺ Т-лімфоцити вважають ключовими ефektorними клітинами в адаптивній імунній реакції. При гострому мозковому інфаркті цитотоксична функція CD⁸⁺ Т-лімфоцитів пригнічується. Це може бути одним з чинників підвищеної частоти інфекційних ускладнень при ІІ та зниженням нейропротективних механізмів у мозку [8]. У результаті погіршується прогноз для виходу з інсульту. Цитотоксичний механізм CD⁸⁺-клітин працює в основному через шлях дегрануляції, що заключається у виділенні клітиною після активації цитотоксину, який містить перфорин і різні гранзими, що призводить до прямого паралічу клітини-мішені або апоптозу. Також апоптоз клітини-мішені індукується шляхом вироблення і вивільнення цитокінів, таких, як інтерферон- γ та TNF- α [11].

Одночасно при АТІ та КЕІ відмічалися достовірно ($p < 0,05$) нижчі значення NK-клітин. Зменшення кількості CD¹⁶⁺-лімфоцитів також призводить до зниження синтезу перфорину, що на відміну від інших клітин, відбувається без попередньої активації NK-клітин, і до зменшення їх цитотоксичності [13] для знешкодження некротичних та апоптичних клітин-мішеней в зоні запалення.

Не відмічено значущої достовірної відмінності між вмістом В-лімфоцитів при АТІ, КЕІ та ГДІ. Достовірно ($p < 0,05$) нижчі, ніж при всіх інших підтипах ІІ, значення CD²²⁺-лімфоцитів виявлено у хворих з ЛІ.

Таким чином, при АТІ спостерігали найвираженіший гострий Т-клітинний імунодефіцит, що супроводжувався зниженням кількості CD³⁺, CD⁴⁺, CD⁸⁺-лімфоцитів та NK-клітин. Це свідчить про вираження імунного запалення у ділянці ішемії, яке поряд з іншими відстроченими механізмами бере активну участь у доформуванні інфаркту й зумовлює дифузну дегенерацію речовини мозку. Виявлені імунологічні зміни при даному типі мозкового інфаркту можуть сприяти збільшенню ішемічного вогнища, гіршому регресу неврологічної симптоматики та підвищеній сприйнятливості до інфекцій. Раніше ми показали найбільше зростання вмісту прозапальних цитокінів саме при АТІ. Тому, на наш погляд, активація запального ішемічного каскаду у вогнищі некрозу при АТІ та зниження вмісту субпопуляцій Т-лімфоцитів закономірно найбільш виражені саме при цьому підтипі ІІ.

ВИСНОВКИ 1. У гострому періоді різних підтипів ІІ виявлено пригнічення Т-клітинної ланки імунітету, що проявлялося у достовірному зниженні кількості імунорегуляторних субпопуляцій лімфоцитів: Т-хелперів, цитотоксичних Т-лімфоцитів, NK-клітин та підвищення співвідношення між вмістом CD⁴⁺ та CD⁸⁺-лімфоцитів.

2. Достовірно нижчі значення CD³⁺ та CD⁴⁺-лімфоцитів виявлено у хворих з АТІ, порівняно з іншими

підтипами ІІ, CD⁸⁺ та CD¹⁶⁺-лімфоцитів при АТІ та КЕІ, що свідчить про найбільше вираження імунного запалення при цих підтипах мозкового інфаркту.

3. Найбільше пригнічення Т-клітинної ланки імунітету може впливати на зниження процесів відновлення неврологічного дефіциту та підвищення сприйнятливості до інфекцій у пацієнтів з АТІ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Герасимова М. М. Клинико-иммунологические аспекты церебрального инсульта / М. М. Герасимова, С. Л. Медведева // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова (приложение "Инсульт"). — 2003. — № 9. — С. 134.
2. Жданов Г. Н. Роль интерлейкина 1- α в патогенезе острого периода ишемического инсульта / Г. Н. Жданов, М. М. Герасимова // Неврологический вестник. — 2005. — Т. XXXVII, вып. 1–2. — С. 18–21.
3. Сайко В. В. Клинико-морфологические исследования пневмоний у остром периоде фатального церебрального ишемического инсульта / В. В. Сайко, О. В. Сайко // Международный неврологический журнал. — 2012. — № 7 (53).
4. Сравнительное изучение иммунокорректирующего действия нейропептидных препаратов при острой экспериментальной цереброваскулярной патологии / А. Е. Кульчиков, О. С. Моложаева, О. В. Скачкова [и др.] // Цитокины и воспаление. — 2009. — Т. 8, № 3. — С. 38–43.
5. Analysis of lymphocyte subsets in patients with stroke and their influence on infections after stroke / A. Vogelgesang, U. Grunwald, S. Lanrgren [et al.] // Stroke. — 2008. — Vol. 39. — P. 237–241.
6. Arumugam, T. V. Stroke and T-cells Neuromolecular / T. V. Arumugam, D. N. Granger, M. P. Mattson // Med. — 2005. — Vol. 7. — P. 229–242.
7. Becker K. J. Anti-leukocyte antibodies: LeukArrest (Hu23F2G) and Enlimomab (R6.5) in acute stroke / K. J. Becker // Curr. Med. Res. Opin. — 2002. — Vol. 18, Suppl. 2. — P. 18–22.
8. Cytotoxic function of CD8+ T lymphocytes isolated from patients with acute severe cerebral infarction: an assessment of stroke-induced immunosuppression / G. Li, X. Wang, L. H. Huang [et al.] // BMC Immunol. — 2013. — Jan 3. — Vol. 14. — P. 1.
9. Effects of a selective CD11b/CD18 antagonist and recombinant human tissue plasminogen activator treatment alone and in combination in a rat embolic model of stroke / L. Zhang, Z. Zhang G., R. L. Zhang [et al.] // Stroke. — 2003. Vol. 34. — P. 1790–1795.
10. Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke. / X. Urra, A. Cervera, N. Villamor [et al.] // Neuroscience. — 2009. — Vol. 158, № 3. — P. 1174–1183.
11. Herrmann M. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: a comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein / M. Herrmann, P. Vos, M. T. Wunderlich // Stroke. — 2000. — Vol. 31. — P. 2670–2677.
12. Immune activation in the peripheral blood of patients with acute ischemic stroke / J. Yan, J. M. Greer, K. Etherington [et al.] // J Neuroimmunol. — 2009, Jan. 3. — Vol. 206(1-2). — P. 112–117.
13. Impaired function of innate T lymphocytes and NK cells in the acute phase of ischemic stroke. / A. Peterfalvi, T. Molnar, M. Banati [et al.] // Cerebrovasc Dis. — 2009. — Vol. 28(5). — P. 490–498.
14. T cells contribute to stroke-induced lymphopenia in rats / L. Gu, X. Xiong, D. Wei [et al.] // PLoS One. — 2013. — Vol. 8(3). — P. 559–602.
15. Role of T-lymphocytes and interferon- γ in ischemic stroke / G. Yilmaz, T. V. Arumugam, K. Y. Stokes, D. N. Granger // Circulation. — 2006. — Vol. 113. — P. 2105–2112.

Отримано 14.10.13