

## ДИНАМИКА И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ CD3CD95 ЛИМФОЦИТОВ, РАСТВОРИМЫХ FAS РЕЦЕПТОРА И FAS ЛИГАНДА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

СЕРГЕЕВА С.П.\*, БРЕСЛАВИЧ И.Д.\*\*, ЕРОФЕЕВА Л.М.\*\*\*, ГУЛЬТЯЕВ М.М.\*\*\*

\*ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»  
Минздрава РФ, Российская Федерация

\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Российская Федерация

\*\*\*ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет  
им. А.И. Евдокимова», Российская Федерация

---

### Резюме.

Цель: изучение динамики содержания в крови CD3CD95 лимфоцитов, растворимого Fas рецептора (sFas) и растворимого Fas лиганда (sFasL) в периферической крови пациентов, перенесших ишемический инсульт (ИИ), корреляции их уровней, а также соотношения их уровней с тяжестью неврологических проявлений. Материал и методы: в исследовании приняли участие 60 человек, группа контроля 25; концентрацию sFas, sFasL определяли иммуноферментным методом, экспрессию CD95 на CD3 лимфоцитах – методом проточной цитометрии. Для объективизации оценки тяжести состояния, выраженности очагового неврологического дефицита использовалась балльная шкала инсульта Национального института здоровья (НИИ). Результаты: уровень sFasL, соотношение уровней sFasL и sFas отражает тяжесть состояния пациентов после ишемического инсульта.

Заключение: исследованные показатели имеют прогностическую значимость и могут быть использованы в клинической практике при определении стратегии ведения пациентов с ишемическим инсультом. Перспективным представляется поиск путей воздействия на механизмы Fas-индуцированного апоптоза в диагностике, оценке прогноза и эффективности лечения пациентов с ИИ.

*Ключевые слова: апоптоз, инсульт, лимфоциты.*

### Abstract.

Objectives. To investigate the dynamics CD3CD95 lymphocytes, soluble Fas receptor (sFas) and soluble Fas ligand (sFasL) levels in peripheric blood of patients after ischemic insult, the correlation between them, as well as the relationship between these levels and the neurologic manifestations severity.

Material and methods. In all 60 patients were studied, 25 of them were healthy controls. By means of ELISA sFas and sFasL plasma levels were detected. Fas protein (CD95) expression on CD3 lymphocytes surfaces was detected using flow cytometry. To objectivize the estimation of the patients' severity condition, focal neurologic deficiency expressiveness the point scale of stroke assessment of National Institute of Health (NIH) was used.

Results. The level of sFasL and sFasL/sFas ratio correlated with the severity of patients' condition after ischemic insult and neurologic disorders ( $p < 0,05$ ).

Conclusions. The changes of plasma level of sFasL and sFasL/sFas ratio are prognostic markers and may be used in clinical practice for determining the management of patients with ischemic insult. Fas induced apoptosis mechanisms seem to be a worthwhile target for the search of new ways in diagnosing, assessment of prognosis and treatment efficacy of patients suffering from ischemic insult.

*Key words: apoptosis, ischemic insult, lymphocytes.*

---

Ишемический инсульт (ИИ) - актуальная медико-социальная проблема. Ежегодно в мире регистрируется более 30 миллионов

случаев инсульта, из них умирают 4,7 миллиона человек, и лишь 20% выживших могут вернуться к прежней работе [1]. Поиск надеж-

ных методов диагностики, прогноза, лечения, профилактики последствий и реабилитации пациентов после перенесенного инсульта имеет большое значение в практической неврологии для построения стратегии оказания медицинской помощи. Успех этой работы в большой мере определяется знанием фундаментальных клеточных и молекулярных звеньев патогенеза инсульта.

Апоптоз - один из основных механизмов гибели клеток в периинфарктной зоне [2, 3, 4], причем иммунные механизмы играют значимую роль в их активации. Так, посредством системы FasL/Fas с последующим образованием FADD (Fas, ассоциированный с доменом смерти) происходит инициация процессов апоптоза. Ингибирование указанной системы приводит к уменьшению степени поражения нервной ткани у животных после церебральной ишемии в эксперименте [5, 6]. В результате альтернативного сплайсинга, а также отщепления надмембранной части Fas-рецептора (Fas, CD95) или лиганда (FasL, CD178) металлопротеиназами (ММР) образуются растворимые молекулы Fas (соответственно sFas и sFasL), способные регулировать (индуцировать или ингибировать) развитие апоптоза [7, 8].

Целью настоящего исследования явилось изучение динамики содержания в крови CD3CD95 лимфоцитов, растворимого Fas рецептора (sFas) и растворимого Fas лиганда (sFasL) в периферической крови пациентов, перенесших ишемический инсульт (ИИ), корреляции их уровней, а также соотношения их уровней с тяжестью неврологических проявлений.

## Методы

Проведено проспективное одноцентровое контрольно-групповое исследование. Оно не предполагало вмешательства в план диагностических и лечебных мероприятий: все пациенты получали объем медицинской помощи в соответствии со стандартом медицинской помощи, оказываемой пациентам с инсультом (при оказании специализированной помощи). Исследование соответствовало требованиям Хельсинской Декларации.

Критерии включения: впервые развившийся ИИ, установленный клинически и при помощи методов нейровизуализации (КТ, МРТ). Критерии включения в группу контроля: возраст, сопоставимый с группой исследования, отсутствие в анамнезе острых нарушений мозгового кровообращения. Критерии исключения из обеих групп: наличие черепно-мозговых травм, транзиторных ишемических атак, онкологических и аутоиммунных заболеваний в анамнезе, вирусных и бактериальных инфекций, аллергических реакций на момент исследования.

Для объективизации оценки тяжести состояния, выраженности очагового неврологического дефицита и динамики клинических показателей использовалась балльная шкала инсульта Национального института здоровья (НИИ). Концентрацию sFas, sFasL определяли на 1, 7 и 21 сутки после ИИ методом иммуно-ферментного анализа (ИФА) с использованием стандартных тест-систем (Bender Medsystems, Vienna, Austria). Содержание CD95 лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии с использованием

Таблица 1 – Характеристика обследованных пациентов

		Группа контроля	Группа ИИ	Группа ИИ с благоприятным исходом	Группа ИИ с неблагоприятным исходом
Мужчины	Кол-во	12	23	12	11
	Возраст, лет	69±7	68±9	66±9	70±7
Женщины	Кол-во	13	37	23	14
	Возраст, лет	75±6	75±8	73±7	78±5
Всего	Кол-во	25	60	35	25
	Возраст, лет	72±10	72±11	71±11	74±12

моноклональных антител (Beckman Coulter, France).

В условиях стационара обследованы 60 человек (мужчин и женщин) (табл. 1). Из них выделено 3 группы: 1 группа контроля (n=25), в зависимости от исхода острого периода ИИ – 2 группа с благоприятным (балл по шкале NIH (National Institutes of Health Stroke Scale) на 21 сутки менее 5) и 3 группа с неблагоприятным исходом (балл по шкале NIHSS на 21 сутки более 5).

Для анализа полученных данных использовали статистические методы: дисперсионный, корреляционный, регрессионный, кластерный анализ данных. Данные были

проверены на нормальность распределения по тесту Шапиро–Уилка. Использовались параметрические (t-тест Стьюдента) и непараметрические (U-тест Манна–Уитни) критерии оценки статистической значимости различий. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Статистически значимой динамики изменения концентрации sFas на 1 и 7 сутки после ИИ не выявлено, на 21 сутки она была достоверно ниже значения указанного параметра на 7 сутки исследования (рис. 1). До-

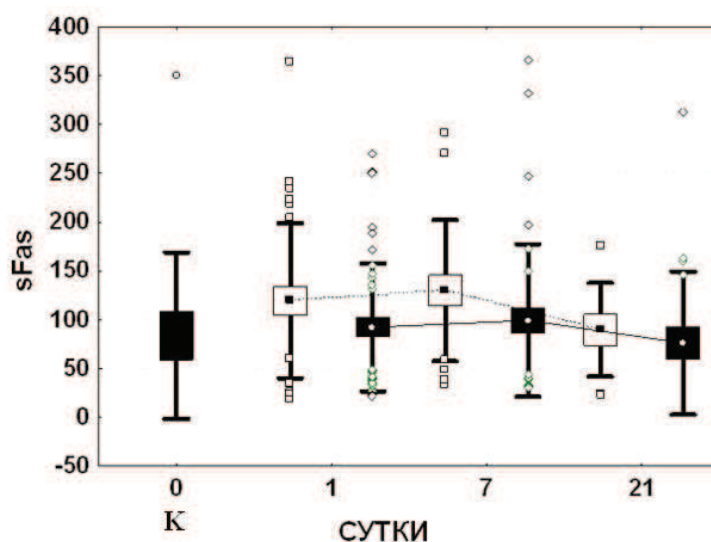


Рисунок 1 – Концентрация sFas в крови на 1, 7, 21 сутки после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (белый), в группе с неблагоприятным исходом (черный) и в группе контроля (К) (пг/мл).

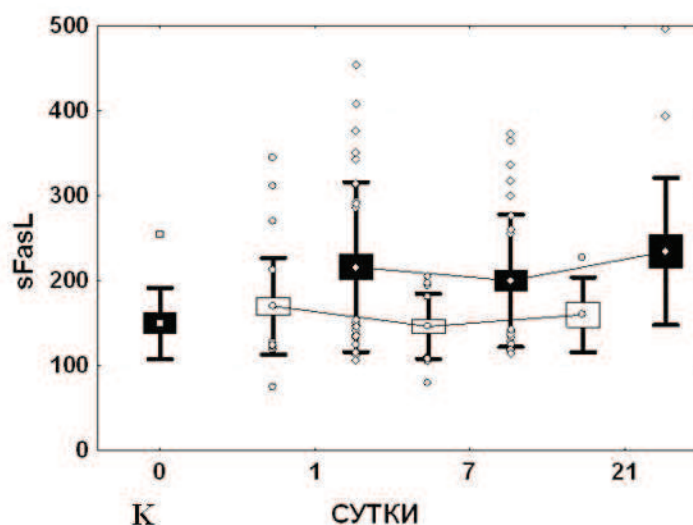


Рисунок 2 – Концентрация sFasL в крови на 1, 7, 21 сутки после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (белый), в группе с неблагоприятным исходом (черный) и в группе контроля (К) (пг/мл).

стоверных отличий от показателей группы контроля ( $83,61 \pm 24,61$  пг/мл) не выявлено во все сроки исследования. Вместе с тем, в группе пациентов с благоприятным исходом (балл по NIH на 21 сутки ниже 5) на 7 сутки исследования концентрация sFas была достоверно выше ( $P < 0,05$ ), чем в группе контроля. Учитывая низкий коэффициент корреляции ( $r < 0,01$ ,  $p > 0,05$ ) между sFas и баллом по шкале NIH, данный параметр, предположительно, не отражает тяжесть и исход ИИ. Отсутствие достоверной корреляции между значением концентрации sFas на первые сутки и баллом по шкале NIH на 21 сутки свидетельствует об отсутствии прогностической значимости данного параметра.

Концентрация sFasL достоверно отличалась от группы контроля ( $149,72 \pm 12,06$  нг/мл) во все сроки исследования и составляла  $197,65 \pm 10,15$ ,  $181,28 \pm 9,2$  и  $210,52 \pm 15,63$  нг/мл на 1, 7 и 21 сутки соответственно (рис. 2). Высокий положительный коэффициент корреляции ( $r = 0,23$ ,  $p < 0,05$ ) между sFasL и баллом по шкале NIH указывает на то, что данный параметр отражает тяжесть состояния пациентов с ИИ. Высокое значение коэффициента корреляции ( $r = 0,23$ ) и достоверности этого результата ( $p < 0,05$ ) указывает на прогностическую значимость указанного параметра. В группе пациентов с благоприятным исходом заболевания к 7 и 21 суткам исследования про-

центное содержание CD3CD95 лимфоцитов достоверно не отличалось от контрольных значений. Корреляционный анализ показал положительные связи между баллом по шкале NIH и указанным параметром. При оценке прогностической значимости достоверного результата не получено, однако этот параметр является прогностически значимым на 7 сутки исследования (высокая достоверная зависимость между содержанием CD3CD95 лимфоцитов на 7 сутки и баллом по NIH на 21).

В группе контроля соотношение sFasL/sFas было равно  $2,41 \pm 0,26$ . В группе с благоприятным исходом соотношение не отличалось достоверно от группы контроля и было равно  $2,02 \pm 0,29$ , в группе с неблагоприятным исходом оно было равно  $3,51 \pm 0,41$  и достоверно отличалось от группы контроля ( $p < 0,01$ ) и группы пациентов с благоприятным исходом ( $p < 0,01$ ). При проведении корреляционного анализа величина соотношения FasL/Fas на 1 сутки после ИИ прямо достоверно коррелировала с баллом по шкале NIH на 21 сутки ( $r = 0,47$ ,  $p = 0,006$ ), что говорит о прогностической значимости параметра; при этом содержание CD95 лимфоцитов на 1 сутки после ИИ прямо, но недостоверно коррелировало с баллом по шкале NIH на 21 сутки ( $r = 0,32$ ,  $p = 0,17$ ), что говорит о возможности использования

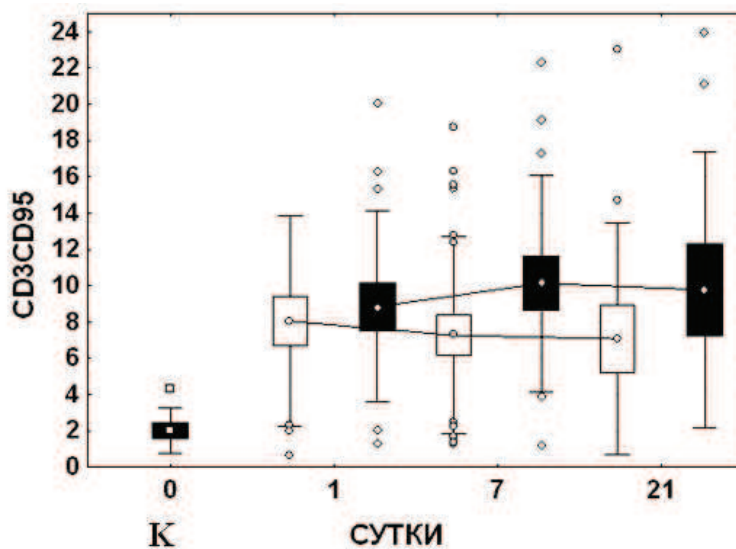


Рисунок 3 – Содержание CD3CD95 лимфоцитов в крови на 1, 7, 21 сутки после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (белый), в группе с неблагоприятным исходом (черный) и в группе контроля (К) (%).

определения данного параметра (количества CD95 лимфоцитов) для прогнозирования исхода острого периода ИИ возможно, однако зависимость недостоверная, а, следовательно, низкая точность. При выполнении кластерного анализа (метод одиночной связи) показано преимущество оценки соотношения sFasL/sFas для прогнозирования исхода острого периода ИИ (рис. 3).

### Обсуждение

Увеличение концентрации sFasL на начальном этапе можно расценивать как активацию механизмов компенсации в ответ на увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для лейкоцитов. При проникновении через ГЭБ лейкоциты экспрессируют металлопротеиназы (ММП), которые также приводят к демиелинизации и апоптозу олигодендроцитов, регулируют активность нейротрофических факторов, подавляют аксональный рост, отсекают надмембранную часть Fas и FasL, образуя их растворимые формы [8]. Увеличение уровня sFasL приводит к нарастанию масштаба апоптоза лимфоцитов и моноцитов, регулируя их количество в ткани головного мозга. Однако, данные изменения происходят не только в поврежденной ткани головного мозга, но и в периферической крови, являясь одной из причин развития лимфопении и снижения резистентности организма после ИИ. Также увеличение уровня sFasL приводит к нарастанию масштаба апоптоза нейронов и глиальных клеток, на поверхности которых экспрессируется CD95 [6]. В результате активации апоптоза в глиальных клетках, составляющих ГЭБ, проницаемость ГЭБ остается повышенной. Таким образом, через систему данных взаимодействий возможно регулирование проницаемости ГЭБ в зависимости от направления и выраженности указанных процессов.

При оценке изменения количества субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности CD3CD95 выявлено их достоверное увеличение на 1 сутки исследования, наиболее выраженное в группе пациентов с неблагоприятным исходом. Такой результат, наряду с увеличением концентрации sFasL в периферической крови, может быть

одной из причин активации апоптоза лимфоцитов и развития лимфопении в течение 1 суток ИИ.

### Заключение

Fas-индуцированный апоптоз играет значимую роль в патогенезе ИИ.

Концентрацию sFasL в плазме крови на 1 сутки после ИИ и содержание CD3CD95-положительных лимфоцитов на 7 сутки можно считать значимыми параметрами для оценки прогноза состояния пациентов при ИИ.

Концентрация sFasL в периферической крови во все сроки исследования отражает тяжесть состояния пациентов после ИИ. Определение соотношения sFasL/sFas на 1 сутки развития ИИ имеет прогностическую значимость и может быть использовано в клинической практике при выборе стратегии ведения пациентов с ИИ.

С учетом указанных фактов представляется перспективным поиск путей воздействия на механизмы Fas-индуцированного апоптоза в диагностике, оценке прогноза и эффективности лечения пациентов с ИИ.

### Литература

1. Mathers, C. D. Global and regional causes of death / C. D. Mathers, T. Boerma, D. Ma Fat // *British medical bulletin*. – 2009. – Vol. 92. – P. 7–32.
2. Inflammation and Apoptosis in Hypertension. Relevance of the Extent of Target Organ Damage / P. Morillas [et al.] // *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. – 2012. – Vol. 65, N 9. – P. 819–825
3. Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke / O. Saino [et al.] // *Journal of Neuroscience Research*. – 2010. – Vol. 88, N 11. – P. 2385–2397.
4. Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke—a possible target of antiapoptotic treatments / T. Sairanen [et al.] // *Brain*. – 2006. – Vol. 129, N 1. – P. 189–199.
5. Targeted mutation of Fas ligand gene attenuates brain inflammation in experimental stroke / F. Niua [et al.] // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2012. – Vol. 26, N 1. – P. 61–71.
6. Strasser, A. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system / A. Strasser, P.



- J. Jost, S. Nagata // Immunity. – 2009. – Vol. 30, N 2. – P. 180-192.
7. The prognostic impact of soluble apoptosis-stimulating fragment on mortality in patients with carotid atherosclerosis / M. Hoke [et al.] // Stroke. – 2011. – Vol. 42. – P. 2465-2470.
8. Ramos-Fernandez, M. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review / M. Ramos-Fernandez, M. F. Bellolio, L. G. Stead // Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2011. – Vol. 20, N 1. – P. 47–54.

*Поступила 12.03.2014 г.*

*Принята в печать 09.06.2014 г.*

**Сведения об авторах:**

Сергеева С.П. – к.м.н, доцент кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», Российская Федерация;

Бреславич И.Д. – соискатель кафедры аэромеханики и газовой динамики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Российская Федерация;

Ерофеева Л.М. – д.б.н., заведующая кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», Российская Федерация;

Гультияев М.М. – к.м.н., ведущий научный сотрудник Лаборатории патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», Российская Федерация.

**Адрес для корреспонденции:** 119992, Российская Федерация, г.Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2. E-mail: svetlanapalna@mail.ru – Сергеева Светлана Павловна.