

Взаимосвязь биомаркеров аутофагии и показателей воспаления в остром периоде ишемического инсульта

В. С. Эмануэль¹, А. В. Луговая¹, А. М. Иванов², Ю. В. Никитин², И. А. Сухина², Г. Э. Кирилкин¹, А. П. Лосева¹, Д. В. Мелихова¹, П. Н. Носуля³, С. Ш. Забиров⁴, Ю. В. Эмануэль¹, Е. Р. Баранцевич¹

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

²ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург

³ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

⁴СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святителя Луки», Санкт-Петербург

РЕЗЮМЕ

Постиншемическое нейровоспаление является критическим патофизиологическим процессом в рамках всей схемы церебральной ишемии, охватывающей раннее повреждение и период восстановления тканей. Согласно последним экспериментальным данным, аутофагия участвует в регуляции нейровоспаления, влияя на исход острого периода ишемического инсульта (ИИ).

Цель. Оценить взаимосвязь между биомаркерами аутофагии и показателями воспаления в динамике острого периода атеротромботического ИИ.

Материалы и методы. Обследованы 112 пациентов в остром периоде впервые развившегося атеротромботического ИИ и 56 доноров (группа контроля). Пациентам проводили динамическое клинично-неврологическое обследование на 1-е, 7-е и 14-е сутки от начала заболевания (магнитно-резонансная томография, тестирование по шкале NIHSS, модифицированной шкале Рэнкина). В эти же временные интервалы осуществляли забор крови на исследование. Количество активных аутофагосом в периферической крови оценивали методом проточной цитометрии с помощью специфического красителя Cyto-ID. Концентрацию в сыворотке провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-18 (интерлейкины-1 β , -8, -18), ФНО- α (фактор некроза опухоли- α), биомаркеров аутофагии Beclin-1, LC3 и p62 определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. С-реактивный белок оценивали высокочувствительным иммунотурбидиметрическим методом.

Результаты. Выявлено статистически достоверное повышение исследуемых параметров по сравнению с группой контроля. Максимальное повышение биомаркеров воспаления отмечалось на 1-е, а ключевых показателей аутофагии (LC3, Beclin-1, Cyto-ID) – на 7-е сутки после развития ишемии. Установлена прямая взаимосвязь между уровнем аутофагии и концентрацией биомаркеров воспаления (СРБ, ИЛ-1 β , ИЛ-18, ФНО- α) на 1-е и 7-е сутки острого ИИ.

Выводы. Выявленные корреляционные связи свидетельствуют об участии активационной аутофагии в регуляции постиншемического нейровоспаления и ее вовлечении в ишемическое поражение головного мозга на ранних этапах острого периода ИИ (1–7-е сутки). Полученные результаты подтверждают данные литературы о влиянии аутофагии на исход острого периода заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аутофагия, острый ишемический инсульт, постиншемическое нейровоспаление, биомаркеры аутофагии, биомаркеры нейровоспаления, LC3, IL-1 β .

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Relationship between biomarkers of autophagy and inflammation in acute period of ischemic stroke

V. S. Emanuel¹, A. V. Lugovaya¹, A. M. Ivanov², Yu. V. Nikitin², I. A. Sukhina², G. E. Kirilkin¹, A. P. Loseva¹, D. V. Melikhova¹, P. N. Nosulya³, S. Sh. Zabirov⁴, Yu. V. Emanuel¹, E. R. Barantsevich¹

¹First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

²Military Medical Academy n.a. S. M. Kirov, Saint Petersburg, Russia

³North-Western State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

⁴City Clinical Hospital n.a. St. Luke, Saint Petersburg, Russia

SUMMARY

Postischemic neuroinflammation is a critical pathophysiological process within the entire pattern of cerebral ischemia, spanning early injury and tissue repair. According to recent experimental data, autophagy is involved in the regulation of neuroinflammation, influencing the outcome of the acute period of ischemic stroke (IS).

Objective. To evaluate the relationship between autophagy biomarkers and inflammation indicators in the dynamics of the acute period of atherothrombotic IS.

Materials and methods. 112 patients in the acute period of newly developed atherothrombotic IS and 56 donors (control group) were examined. Patients underwent dynamic clinical and neurological examination on the 1st, 7th and 14th days from the onset of the disease (magnetic resonance imaging, testing using the NIHSS scale, modified Rankin scale). At the same time intervals, blood was drawn for testing. The number of active autophagosomes in peripheral blood was assessed by flow cytometry using a specific Cyto-ID dye. The serum concentrations of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-8, IL-18 (interleukins-1 β , -8, -18), TNF α (tumor necrosis factor- α), autophagy biomarkers Beclin-1, LC3 and p62 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay analysis. C-reactive protein was assessed by a highly sensitive immunoturbidimetric method.

Results. A statistically significant increase in the studied parameters was revealed compared to the control group. The maximum increase in inflammation biomarkers was observed on the 1st day, and the maximum increase in key indicators of autophagy (LC 3, Beclin-1, Cyto-ID) – on the 7th day after the development of ischemia. A direct relationship was established between the level of autophagy and the concentration of inflammatory biomarkers (CRP, IL-1 β , IL-18, TNF- α) on the 1st and 7th days of acute IS.

Conclusions. The identified correlations indicate the participation of activated autophagy in the regulation of post-ischemic neuroinflammation and its involvement in ischemic brain damage in the early stages of the acute period of IS (days 1–7). The results obtained confirm the literature data on the influence of autophagy on the outcome of the acute period of the disease.

KEY WORDS: autophagy, acute ischemic stroke, postischemic neuroinflammation, autophagy biomarkers, neuroinflammation biomarkers, LC 3, IL-1 β .

CONFLICT OF INTEREST. The authors declare no conflict of interest.

Введение

Постиншемический воспалительный ответ играет существенную роль в патогенезе острого ишемического инсульта (ИИ). Он характеризуется микроглиальной и астроглиальной активацией с повышенной экспрессией медиаторов воспаления, участвующих в нарушении целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Привлеченные хемокинами лейкоциты при экстравазации выделяют матриксные металлопротеиназы-2 и -9, которые расщепляют плотные контакты между эндотелиальными клетками сосудов головного мозга. Это приводит к повреждению ГЭБ [1].

Нарушение целостности ГЭБ способствует распаду мозговой ткани и «утечке» в периферическую кровь (ПК) аутоантигенов головного мозга, что приводит к активации иммунной системы и притоку периферических иммунокомпетентных клеток в центральную нервную систему [1]. Таким образом, острая церебральная ишемия запускает местный и системный воспалительный иммунный ответ [2, 3].

В остром периоде ИИ в ПК пациентов регистрируется значительное повышение концентрации провоспалительных цитокинов: ФНО- α (фактор некроза опухоли α), ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18, ИЛ-21 (интерлейкины-1 β , -6, -8, -18, -21) [4]. Показано, что высокий уровень сывороточного ИЛ-1 β коррелирует со степенью тяжести острого ИИ и является предиктором плохого исхода заболевания. В литературных источниках подчеркивается важнейшая роль этого интерлейкина в ишемическом повреждении [5].

В последнее время большой интерес вызывает перспектива модулирования аутофагии при остром ИИ, являющейся мощным регулятором воспалительных реакций [6, 7]. Показано, что при остром ИИ аутофагия задействована в важнейших этапах воспалительного каскада, выступая либо в качестве индуктора, либо в роли ингибитора постиншемического нейровоспаления [8]. В последних отчетах аутофагия рассматривается как негативный регулятор NLRP3-воспаления (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor [NLR] family pyrin domain-containing 3), играющего значительную роль в патогенезе острого ИИ [9]. Это подтверждается экспериментальными данными, наглядно демонстрирующими, что применение ингибиторов аутофагии способствует активации NLRP3-инфламмосомы [10].

Аутофагия является важнейшим регулятором иммунологической толерантности [4, 11]. Показано, что после ишемической атаки происходит чрезмерная активация аутофагии в иммунокомпетентных клетках, в том числе в Т-лимфоцитах, что способствует формированию

аутореактивных клонов Т-клеток, принимающих активное участие в нейровоспалении и способствующих усугублению ишемического повреждения ткани головного мозга [4, 10, 12].

Во многих противовоспалительных механизмах, реализуемых базовой аутофагией при остром ИИ, участвуют ключевые белки аутофагического процесса Beclin-1, LC 3 и p62. Они выступают в роли регуляторов, подавляющих отдельные этапы постиншемического воспалительного каскада, благотворно влияя на клинический исход заболевания [13, 14].

Учитывая многочисленные механизмы, с помощью которых аутофагия влияет на отдельные этапы постиншемического нейровоспаления, целесообразно рассмотреть возможные пути ее модуляции с целью воздействия на определенные мишени воспалительного процесса [7, 11, 15].

В связи с тем, что в настоящий момент большинство литературных источников, освещающих данную проблему, приводят результаты экспериментальных исследований, представляет интерес сравнительная оценка биомаркеров аутофагии и постиншемического воспаления в клинических условиях.

Таким образом, принимая во внимание новейшие данные литературы о значительной роли аутофагии в регуляции постиншемического нейровоспаления и влиянии на исход острого периода ИИ, представляется актуальным оценить взаимосвязь между биомаркерами аутофагии и показателями воспаления в динамике острого периода ИИ и сопоставить с динамикой тяжести неврологического дефицита по шкале NIHSS (шкала инсульта Национального института здоровья) и объемом очага поражения головного мозга по результатам магнитно-резонансной томографии (МРТ).

Цель исследования: количественно оценить провоспалительные цитокины ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-18 ФНО- α , С-реактивный белок (СРБ) и показатели аутофагии LC 3, Beclin-1, p62, Cyto-ID в крови пациентов в остром периоде атеротромботического ИИ. Выявить взаимосвязь между биомаркерами аутофагии и показателями воспаления в динамике острого периода атеротромботического ИИ.

Материалы и методы

Все исследования были согласованы с этическим комитетом ПСПб ГМУ имени академика И. П. Павлова Минздрава России. Обследованы 112 пациентов

(77 мужчин и 35 женщин) в остром периоде впервые разившегося атеротромботического ИИ. Медиана возраста мужчин составила 54 (47,4; 60,6) года, а женщин – 58 (55,8; 60,2) лет. Пациенты были включены в исследование в первые 24 часа от начала заболевания и составили основную группу. В качестве контрольной группы были обследованы 56 здоровых лиц по полу и возрасту сопоставимые с больными острым ИИ.

Критерии включения в исследование: информированное согласие на участие в исследовании; возраст от 45 до 60 лет; верифицированный с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) впервые выявленный острый ИИ в системе внутренней сонной артерии (атеротромботический патогенетический вариант); неврологическая симптоматика менее 14 баллов по шкале NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale – шкала инсульта Национального института здоровья); пол пациентов – мужской, женский; не более 24 часов от начала развития заболевания.

По результатам данных МРТ, в зависимости от объема очага поражения, основная группа была разделена на I группу (объем очага поражения вещества головного мозга менее 50 см³) и II группу (объем очага поражения вещества головного мозга более 50 см³). III группу (контрольную) составили здоровые люди по полу и возрасту сопоставимые с больными острым ИИ ($n = 56$).

Критерии исключения: отказ от подписания информированного согласия; возраст менее 45 или более 60 лет; повторный инсульт; геморрагический инсульт либо спонтанное субарахноидальное кровоизлияние; ИИ в вертебрально-базиллярной системе; расстройства сознания до уровня сопора или комы; сахарный диабет; плохо контролируемая артериальная гипертензия с АД выше 200/100 мм рт. ст.; острый инфаркт миокарда; застойная сердечная недостаточность ФК II; фибрилляция предсердий; алкогольная и (или) наркотическая зависимость; онкологическое заболевание; наличие ревматической патологии в анамнезе; анемия (гемоглобин менее 90 г/л); хроническая болезнь почек (СКФ менее 30 мл/мин); патология печени (АСТ и [или] АЛТ выше трех верхних границ нормы); наследственно-дегенеративные, системные, аутоиммунные, инфекционные, эндокринные заболевания; участие в других клинических исследованиях.

Пациентам проводили динамическое клинико-неврологическое обследование на 1-е, 7-е и 14-е сутки от начала заболевания: оценку выраженности неврологического дефицита по шкале NIHSS, исследование объема очага поражения методом МРТ головного мозга, тестирование по модифицированной шкале Рэнкина. В эти же временные интервалы осуществляли забор венозной крови на исследование. Забор крови участникам контрольной группы проводили однократно.

Для количественного определения аутофагосом в лейкоцитах периферической крови применяли набор для детекции аутофагии (CYTO-ID® Autophagy detection kit 2.0; Enzo, Великобритания), содержащий индикаторный краситель Cyto-ID. Этот катионный амфифильный краситель

специфически встраивается в активные аутофагосомы на всех стадиях аутофагии и дает интенсивное зеленое свечение. Количество активных аутофагосом оценивали по средней интенсивности флюоресценции красителя Cyto-ID с помощью метода проточной цитометрии (MoFlo TM Astrios EQ; Beckman Coulter, США).

Концентрацию провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-18, ФНО- α и биомаркеров аутофагии Beclin-1, LC3 и p62 в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью соответствующих тест систем (ELISA Kits; Abcam, Великобритания) и (ELISA Kits; Enzo, Великобритания).

Для количественного определения С-реактивного белка в крови использовали высокочувствительный иммунотурбидиметрический метод (cobas 6000; Roche Diagnostics, Швейцария).

Для статистической обработки полученных данных использовали непараметрический критерий Вилкоксона – Манна – Уитни для сравнения средних, корреляционный анализ по Спирману. Обработка материала проведена с использованием пакета программ Statistica 10.0 для Windows 10 (StatSoft, США). Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии значимых различий) принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

За период (14 дней) наблюдения у 99 (88,4%) пациентов наблюдались положительная динамика общего состояния и регресс общемозговых симптомов. У 13 (11,6%) пациентов состояние осталось неизменным.

При анализе динамики неврологического статуса пациентов по шкале NIHSS установлено, что неврологический дефицит на 1-е сутки ИИ варьировал от 6 до 14 баллов (медиана 10). За период наблюдения у большинства пациентов общемозговой синдром регрессировал, и на 14-е сутки медиана неврологического дефицита составила 8 (2; 14) баллов. Медиана по модифицированной шкале Рэнкина составила 4 (3; 5) балла на 1-е и 3 (2; 4) балла – на 14-е сутки острого ИИ.

Объем повреждения вещества головного мозга, выявленный при МРТ на 1-е сутки заболевания, варьировал от 10 до 320 см³ (медиана 165). За 14 дней исследования статистически значимых изменений размера очага повреждения не отмечалось.

Статистически достоверное повышение средней интенсивности флюоресценции красителя Cyto-ID, по сравнению с группой контроля, отмечалось на протяжении всего периода исследования во всех популяциях лейкоцитов обеих групп пациентов (рис. 1 и 2). Максимальный уровень флюоресценции выявлен на 7-е сутки. У пациентов с объемом очага поражения головного мозга менее 50 см³ (I группа) наблюдалось значительное снижение средней интенсивности флюоресценции Cyto-ID на 14-е сутки. У пациентов II группы (объем очага поражения более 50 см³) статистически достоверное повышение флюоресценции Cyto-ID, по сравнению с группой контроля, наблюдалось на протяжении всего исследования, включая 14-е сутки (рис. 2). Полученные данные показывают, что

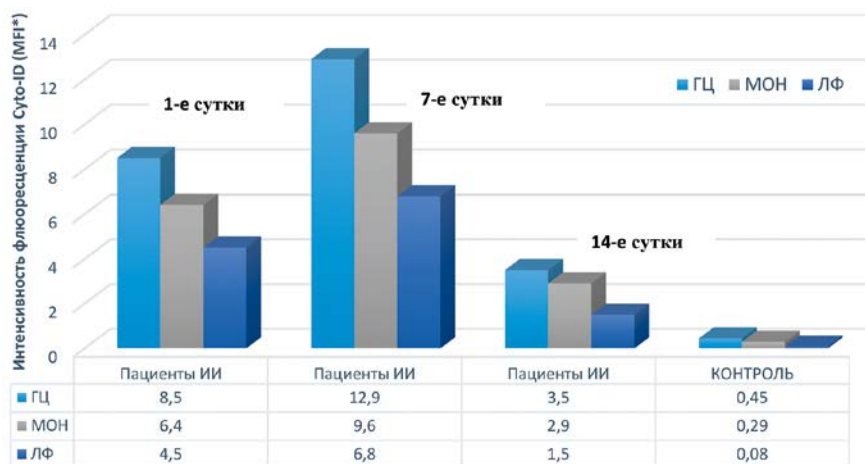


Рисунок 1. Динамика аутофагии лейкоцитов периферической крови в остром периоде ИИ по сравнению с группой контроля у пациентов с объемом очага поражения менее 50 см³. Примечание: MFI (mean fluorescence intensity)* – средняя интенсивность флюоресценции

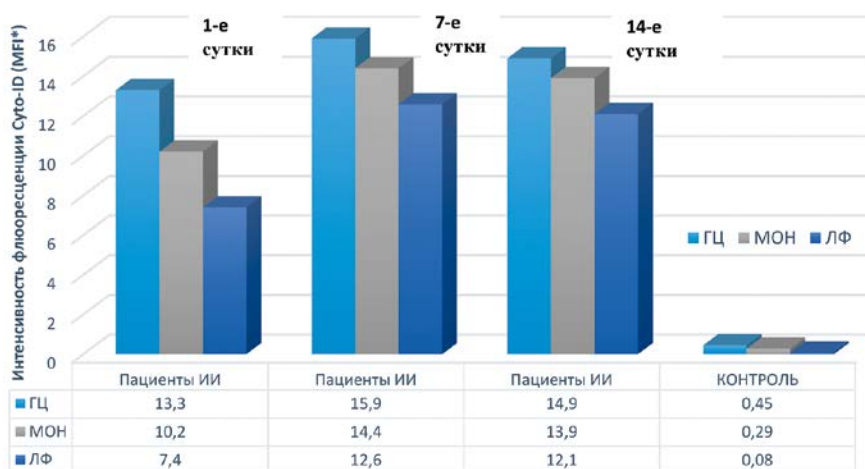


Рисунок 2. Динамика аутофагии лейкоцитов периферической крови в остром периоде ИИ по сравнению с группой контроля у пациентов с объемом очага поражения более 50 см³. Примечание: MFI (mean fluorescence intensity)* – средняя интенсивность флюоресценции

у пациентов с большим объемом очага поражения активационная аутофагия сохраняет интенсивность на протяжении всего периода исследования (рис. 1 и 2). Это может свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе, поскольку, согласно данным литературы, активационная (усиленная) аутофагия участвует в отсроченной гибели нейронов и способствует ухудшению исхода заболевания [15].

Выявлена прямая корреляционная связь между средним уровнем флюоресценции Cyto-ID в общей популяции лейкоцитов, тяжестью неврологического дефицита по шкале NIHSS и объемом поражения головного мозга на 1-е ($r = 0,69$; $p < 0,05$ и $r = 0,73$; $p < 0,01$ соответственно) и 7-е сутки ($r = 0,78$; $p < 0,01$ и $r = 0,83$; $p < 0,01$ соответственно). Согласно данным экспериментальных исследований, на ранних этапах острого периода ИИ действует активационная (деструктивная) аутофагия, участвующая в ишемическом поражении головного мозга. В конце острого периода при адекватно назначенной терапии происходит подавление активационной и включение базовой (физиологической) аутофагии, выполняющей защитную нейροпротективную функцию [15, 16]. Таким образом, в совокупности с литературными данными выявленные нами корреляционные связи между интенсивностью флюоресценции Cyto-ID, объемом поражения головного мозга и тяжестью неврологического дефицита на 1-е и 7-е сутки позволяют предположить, что активность аутофагии клеток периферической крови (ПК)

отражает активность этих процессов в очаге поражения у пациентов с острым ИИ.

Исследованием установлено, что в остром периоде ИИ наблюдается статистически достоверное по сравнению с контролем (III группа) повышение концентрации исследуемых провоспалительных цитокинов, более выраженное у пациентов II группы, что в сочетании с резким повышением С-реактивного белка (СРБ) может являться критерием общей воспалительной реакции (табл. 1 и 2). Известно, что провоспалительные цитокины ИЛ-1 β , ИЛ-8 и ФНО- α , резкое повышение которых выявлено в результате исследования, играют ключевую роль в развитии острофазового ответа на воспаление [2, 15]. Принимая во внимание, что на 1-е сутки исследования белок острой фазы воспаления СРБ был повышен в 18,9 раза в I группе и в 42,9 раза – во II группе пациентов, по сравнению с контролем (табл. 1), можно предположить системный характер воспаления в остром периоде ИИ, что согласуется с данными литературы [4, 12].

В обеих группах пациентов наблюдалось динамическое снижение концентрации биомаркеров воспаления (табл. 1 и 2). Тем не менее даже на 14-е сутки средние значения показателей воспаления были статистически достоверно повышены по сравнению с группой контроля, что свидетельствует о продолжающейся воспалительной реакции. Согласно данным литературы, постишемический воспалительный ответ, с одной стороны, направлен на удаление некротизированной ткани из зоны ишемии, преследуя защитные цели. С другой стороны, он приводит к увеличению объема очага поражения и отягощает заболевание [17]. Это происходит за счет рекрутирования из периферической циркуляции в зону поражения большого количества иммунных клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины [1, 4]. Кроме того, дополнительные медиаторы воспаления продуцируются клетками микроглии, активированной в результате ишемической атаки.

Таблица 1

Концентрация С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови пациентов в динамике острого периода ИИ

Группы	Время, прошедшее от начала острого ИИ		
	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
	Концентрация СРБ (мг/л)		
I (n = 82)	12,29**	7,13*	5,23*
II (n = 30)	27,89***	15,21**	11,01**
III (n = 56)	0,65	–	–

Примечания: * – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,050$); ** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,010$); *** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,001$); I группа – пациенты с объемом очага поражения головного мозга менее 50 см^3 ($n = 82$); II группа – пациенты с объемом очага поражения головного мозга более 50 см^3 ($n = 30$); III группа – контрольная ($n = 56$).

Показано, что воспалительная реакция, спровоцированная ишемией, может продолжаться от нескольких дней до нескольких месяцев [1].

Исследованием установлено статистически значимое по сравнению с контролем (III группа) повышение биомаркеров аутофагии, более выраженное во II группе пациентов (табл. 2). Согласно данным литературы, это свидетельствует о том, что индуцированная ишемией активационная аутофагия действует совместно с медиаторами воспаления на ранних этапах острого периода ИИ, способствуя прогрессированию заболевания [12, 14].

Вызывает интерес неравномерное динамическое изменение биомаркеров аутофагии и показателей воспаления. В отличие от последних, все изучаемые биомаркеры аутофагии достигают максимальных значений на 7-е сутки с незначительной тенденцией к снижению на 14-й день исследования (табл. 2). В совокупности с результатами, полученными с использованием красителя Cyto-ID (рис. 1 и 2), характеризующими интенсивность аутофагии в клетках ПК, можно предположить, что активационная аутофагия в очаге поражения достигает своего пика на 7-е сутки острого периода ИИ.

Для выявления взаимосвязи между активностью аутофагии в динамике острого периода ИИ

и показателями воспаления в качестве исследуемого параметра аутофагии был выбран белок LC 3 (microtubule-associated protein light chain 3), который участвует в образовании аутофагосом. Согласно данным литературы, белок LC 3 является самым надежным биомаркером аутофагии, так как его содержание в исследуемом биологическом материале положительно коррелирует с количеством активных аутофагосом – важнейших компонентов процесса аутофагии [18]. Таким образом, этот показатель отражает активность процесса аутофагии.

В 1-й день острого ИИ выявлена сильная прямая корреляционная связь между уровнем аутофагии и сывороточной концентрацией СРБ, ИЛ-1 β , ФНО- α и ИЛ-18, более выраженная во II группе (табл. 3). Наиболее значимая прямая зависимость отмечалась между концентрацией LC 3 и содержанием белков острой фазы воспаления СРБ ($r = 0,81$; $p < 0,05$) и ИЛ-1 β ($r = 0,83$; $p < 0,05$) соответственно. Также заслуживает внимания корреляционная связь между LC 3 и ФНО- α ($r = 0,73$; $p < 0,05$). Как известно, ФНО- α является плеiotропным цитокином, играющим важную роль во многих патологических клеточных процессах, включая роль индуктора активационной аутофагии [6, 10]. Таким образом, ФНО- α и аутофагия взаимодействуют по принципу обратной связи, дополнительно активируя друг друга: чем выше концентрация ФНО- α , тем интенсивнее процесс аутофагии, которая, в свою очередь, стимулирует дополнительную продукцию ФНО- α и т. д.

Таблица 2

Сравнительная характеристика содержания биомаркеров аутофагии и цитокинов в сыворотке крови в динамике острого ИИ

Показатели	Группы обследуемых лиц								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	1-е сутки			7-е сутки			14-е сутки		
LC3, нг/л	175,8*	252,7**	89,3	216,4**	311,2**	–	196,1*	273,8**	–
Beclin-1, нг/л	149,9*	188,9*	75,6	198,9*	230,7**	–	168,3*	203,9**	–
p62, пг/мл	37,5*	20,1*	11,4	32,7*	41,4**	–	24,6*	38,3**	–
ФНО- α , пг/мл	27,8**	64,1***	6,4	18,9*	27,9*	–	15,1*	20,9**	–
ИЛ-1 β , пг/мл	30,9**	55,4***	3,9	19,8**	33,5***	–	11,2*	19,5**	–
ИЛ-8, пг/мл	41,4**	81,5***	12,8	30,6*	59,8**	–	24,9*	41,7***	–
ИЛ-18, пг/мл	400,9*	891,6***	158,9	303,8*	501,6**	–	211,5*	415,6**	–

Примечания: * – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,050$); ** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,010$); *** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,001$).

Таблица 3

Установленные корреляционные связи между концентрацией ключевого биомаркера аутофагии LC 3 (нг/л) и концентрацией показателей воспаления в динамике острого периода ИИ

Показатель	Коэффициент Спирмена (r), p < 0,05					
	Группы обследуемых пациентов					
	I	II	I	II	I	II
	1-е сутки		7-е сутки		14-е сутки	
ФНО-α, пг/мл	r = 0,68	r = 0,73	r = 0,56	r = 0,59	r = 0,31	r = 0,36
ИЛ-1β, пг/мл	r = 0,79	r = 0,83	r = 0,63	r = 0,69	r = -0,39	r = -0,45
ИЛ-8, пг/мл	r = 0,54	r = 0,59	r = 0,21	r = 0,26	r = 0,18	r = 0,21
ИЛ-18, пг/мл	r = 0,73	r = 0,79	r = 0,61	r = 0,65	r = -0,31	r = -0,53
СРБ, мг/л	r = 0,69	r = 0,81	r = 0,64	r = 0,75	r = 0,46	r = 0,49

Примечание: r – коэффициент Спирмена, обозначающий выявленные корреляционные связи между концентрацией биомаркера LC 3 и концентрацией биомаркеров воспаления.

Не менее важное значение имеет выявленная прямая корреляционная зависимость между LC 3 и ИЛ-8 (табл. 3). ИЛ-8 обладает выраженными провоспалительными свойствами, вызывая экспрессию молекул межклеточной адгезии и усиливая прилипание нейтрофилов к эндотелиальным клеткам и субэндотелиальным матричным белкам. Привлеченные ИЛ-8 лейкоциты при экстравазации выделяют матриксные металлопротеиназы-2 и -9, которые расщепляют плотные контакты между эндотелиальными клетками сосудов головного мозга [1, 5]. Это приводит к повреждению ГЭБ, вследствие чего повышается проницаемость сосудов, что может способствовать развитию вазогенного отека [13].

Следует подчеркнуть, что значимая корреляционная связь между уровнем активационной аутофагии и основными показателями воспаления отмечалась на 1-е и 7-е сутки заболевания, существенно ослабевая в дальнейшем (табл. 3). Полученные результаты подтверждают данные литературы о синергетическом разрушительном действии активационной аутофагии и медиаторов воспаления на ранних этапах острого периода ИИ [3, 10].

Особый интерес вызывает выявленная взаимосвязь между биомаркером аутофагии LC 3 и концентрацией цитокинов ИЛ-1β и ИЛ-18 (табл. 3). Как известно, универсальным медиатором постишемического воспаления является ИЛ-1β [5, 6]. При остром ИИ этот интерлейкин активирует практически все воспалительные процессы: поляризует иммунные клетки по провоспалительному фенотипу, рекрутирует лейкоциты из периферического кровотока в ишемический очаг поражения головного мозга, стимулирует чрезмерную активацию NLRP3-инфламмосомы, приводящую к гибели нейронов и микроглии по механизму пироптоза [8, 14]. Экспериментальные исследования на животных показали, что базовая аутофагия подавляет NLRP3-воспаление за счет ингибирования образования активного ИЛ-1 из неактивной формы его предшественника про-ИЛ-1. Установлено, что применение рекомбинантного человеческого IL-1RA (рекомбинантного антагониста рецептора ИЛ-1) уменьшает область повреждения мозга при ишемическом

инсульте и сопутствующие ему симптомы, а также способствует восстановлению утраченных двигательных функций [5, 12]. В настоящее время блокирование ИЛ-1β и NLRP3-рецепторов рассматривают как перспективный подход к ограничению воспаления при ишемическом инсульте [7, 14]. Выявленные на 14-е сутки отрицательные корреляционные связи между LC 3, ИЛ-1β и ИЛ-18 (табл. 3) косвенно подтверждают данные литературы о том, что базовая аутофагия при остром ИИ выполняет роль негативного регулятора NLRP3-воспаления [8, 13].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что активационная аутофагия и постишемическое воспаление взаимосвязаны и действуют совместно на ранних стадиях острого периода ИИ, усугубляя ишемическое поражение.

Выводы

1. В остром периоде атеротромботического ИИ выявлено статистически достоверное повышение сывороточной концентрации показателей воспаления (СРБ, ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-8, ИЛ-18) и биомаркеров аутофагии (LC 3, Beclin-1, p62, Cyto-ID) по сравнению с группой контроля, более выраженное у пациентов с объемом очага поражения головного мозга более 50 см³.
2. Максимальное повышение исследуемых биомаркеров воспаления отмечалось на 1-е, а ключевых показателей аутофагии (LC 3, Beclin-1, Cyto-ID) – на 7-е сутки после развития ишемии.
3. Установлена выраженная прямая взаимосвязь между концентрацией белка LC 3, отражающего уровень активационной аутофагии, и уровнем биомаркеров воспаления (СРБ, ИЛ-1β, ИЛ-18, ФНО-α) на 1-е и 7-е сутки острого ИИ.
4. Полученные данные свидетельствуют об участии активационной аутофагии в регуляции постишемического нейровоспаления и ее вовлечении в ишемическое поражение головного мозга на ранних стадиях острого периода ИИ. Таким образом, результаты исследования подтверждают данные литературы о влиянии аутофагии на исход заболевания.

Список литературы / References

1. Tsygan N. V., Trashkov A. P., Litvinenko I. V., Yakovleva V. A., Ryabtsev A. V., Vasiliev A. G., Churilov L. P. Autoimmunity in acute ischemic stroke and the role of blood-brain barrier: the dark side or the light one? *Front. Med.* 2019. Vol. 13. No. 4. P. 420–426. DOI: 10.1007/s11684-019-0688-6.
2. Lasek-Bal A., Jedzejowska-Szypulka H., Student S., Warsz-Wianecka A., Zareba K., Puz P., Bal W., Pawletko K., Lewin-Kowalik J. The importance of selected markers of inflammation and blood-brain barrier damage for short-term ischemic stroke prognosis. *J. Physiol. Pharmacol.* 2019. Vol. 70. No. 2. P. 209–217. DOI: 10.26402/jpp.2019.2.04.
3. Li S., Zhang Y., Shi S., Guo D., Chang T. Identification of immune characteristic landscapes related to autophagy in ischemic stroke. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2022. Vol. 10. Article No. 1026578. DOI: 10.3389/fcell.2022.1026578.
4. Hu K., Gao Y., Chu S., Chen N. Review of the effects and Mechanisms of microglial autophagy in ischemic stroke. *Int. Immunopharmacol.* 2022. Vol. 108. Article No. 108761. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.108761.
5. Zhu H., Hu S., Li Y., Sun Y., Xiong X., Hu X., Chen J., Qiu S. Interleukins and Ischemic Stroke. *Front. Immunol.* 2022. Vol. 13. Article No. 828447. DOI: 10.3389/fimmu.2022.828447.
6. Jiang C. T., Wu W. F., Deng Y. H., Ge J. W. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (Review). *Mol. Med. Rep.* 2020. Vol. 21. No. 5. P. 2006–2018. DOI: 10.3892/mmr.2020.11003.
7. Lu X., Zhang J., Ding Y., Wu J., Chen G. Novel Therapeutic Strategies for Ischemic Stroke: Recent Insights into Autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2022. Vol. 2022. Article No. 3450207. DOI: 10.1155/2022/3450207.
8. Li S., Liu H., Wang H. The Interplay between Autophagy and NLRP3 Inflammation in Ischemia/Reperfusion Injury. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. No. 16. P. 8773. DOI: 10.3390/ijms22168773.
9. Hou W., Hao Y., Sun L., Zhao Y., Zheng X., Song L. The dual roles of autophagy and the GPCRs-mediating autophagy signaling pathway after cerebral ischemic stroke. *Molecular Brain.* 2022. Vol. 15. No. 1. DOI: 10.1186/s13041-022-00899-7.
10. Qin X., Akter F., Qin L., Cheng J., Guo M., Yao S., Jian Z., Liu R., Wu S. Adaptive Immunity Regulation and Cerebral Ischemia. *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. No. 689. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00689.
11. Shi Q., Cheng Q., Chen C. The Role of Autophagy in the Pathogenesis of Ischemic Stroke. *Current Neuropharmacology.* 2021. Vol. 19. No. 5. P. 629–640. DOI: 10.2174/1570159x18666200729101913.
12. Zeng J., Bao T., Yang K., Zhu X., Wang S., Xiang W., Ge A., Zeng L., Ge J. The mechanism of microglia-mediated immune inflammation in ischemic stroke and the role of natural botanical components in regulating microglia: A review. *Front. Immunol.* 2023. Vol. 13. Article No. 1047550. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1047550.
13. Mo Y., Sun Y. Y., Liu K. Y. Autophagy and inflammation in ischemic stroke. *Neural Regen. Res.* 2020. Vol. 15. No. 8. P. 1388–1396. DOI: 10.4103/1673-5374.274331.
14. Wang X., Fang Y., Huang Q., Xu P., Lenahan C., Lu J., Zheng J., Dong X., Shao A., Zhang J. An updated review of autophagy in ischemic stroke: From mechanisms to therapies. *Experimental Neurology.* 2021. Vol. 340. Article No. 113684. DOI: 10.1016/j.expneurol.2021.113684.
15. Guan R., Zou W., Dai X., Yu X., Liu H., Chen O. et al. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke. *Journal of Biomedical Science.* 2018. Vol. 25. No. 87. https://doi.org/10.1186/s12929-018-0487-4
16. Li H., Qiu S., Li X., Li M., Peng Y. Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients. *J. Transl. Med.* 2015. Vol. 13. P. 359. https://doi.org/10.1186/s12967-015-0726-3
17. Jin W. N., Gonzales R., Feng Y., Wood K., Chai Z., Dong J. F. et al. Brain Ischemia Induces Diversified Neuroantigen-Specific T-Cell Responses That Exacerbate Brain Injury. *Stroke.* 2018. Vol. 49. No. 6. P. 1471–8. DOI: 10.1161/strokeaha.118.020203.
18. Chen R., Jiang M., Li B., Zhong W., Wang Z., Yuan W., Yan J. The role of autophagy in pulmonary hypertension: A double-edge sword. *Apoptosis.* 2018. Vol. 23. No. 9. P. 459–469. DOI: 10.1007/s10495-018-1477-4.

Статья поступила / Received 20.11.23

Получена после рецензирования / Revised 23.11.23

Принята к публикации / Accepted 24.11.23

Сведения об авторах

Эмануэль Владимир Сергеевич, врач-невролог, ассистент кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного образования¹. ORCID: 0000-0002-9938-247x

Луговая Анна Владимировна, к.м.н., ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, с.н.с., врач клинической лабораторной диагностики¹. ORCID: 0000-0002-7690-9064

Иванов Андрей Михайлович, д.м.н., проф., член-корр. РАН, зав. кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики, президент ассоциации «Федерация лабораторной медицины России»². ORCID: 0000-0002-8899-7524

Никитин Юрий Владимирович, врач – аллерголог-иммунолог центра клинической лабораторной диагностики, преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики². ORCID: 0000-0001-7892-2783

Сухина Ирина Александровна, к.б.н., преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики². ORCID: 0000-0003-1984-2497

Кирилкин Герман Эдуардович, клинический ординатор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины¹. ORCID: 0000-0001-8913-984x

Лосева Алина Павловна, студентка VI курса лечебного факультета¹. ORCID: 0009-0004-0561-9133

Мелихова Дарья Вадимовна, студентка VI курса лечебного факультета¹. ORCID: 0009-0009-0456-5512

Носуля Полина Николаевна, студентка VI курса лечебного факультета³. ORCID: 0009-0004-7679-4721

Забиров Сергей Шамилович, к.м.н., член Союза реабилитологов России, рук. центра медицинской реабилитации и зав. отделением медицинской реабилитации взрослых с нарушением функции ЦНС, врач-невролог⁴. ORCID: 0000-0001-6348-0759

Эмануэль Юлия Владимировна, к.м.н., врач-невролог, доцент кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного образования¹. ORCID: 0000-0001-5649-6090

Баранцевич Евгений Робертович, д.м.н., проф., гл. невролог Северо-Западного федерального округа, председатель Ассоциации неврологов Санкт-Петербурга, зав. кафедрой неврологии и мануальной медицины факультета последипломного образования¹. ORCID: 0000-0003-3804-3877

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

²ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург

³ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

⁴СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святого Луки», Санкт-Петербург

Автор для переписки: Эмануэль Юлия Владимировна. E-mail: ejvcons@mail.ru

Для цитирования: Эмануэль В.С., Луговая А.В., Иванов А.М., Никитин Ю.В., Сухина И.А., Кирилкин Г.Э., Лосева А.П., Мелихова Д.В., Носуля П.Н., Забиров С.Ш., Эмануэль Ю.В., Баранцевич Е.Р. Взаимосвязь биомаркеров аутофагии и позитивной воспалительной в остром периоде ишемического инсульта. *Медицинский алфавит.* 2023; (33): 37–43. https://doi.org/10.33667/2078-5631-2023-33-37-43

About authors

Emanuel Vladimir S., neurologist, graduate student of Dept of Neurology and Manual Medicine of Faculty of Postgraduate Education¹. ORCID: 0000-0002-9938-247x

Lugovaya Anna V., PhD Med, assistant at Dept of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course in Molecular Medicine, senior researcher, Clinical Laboratory diagnostician¹. ORCID: 0000-0002-7690-9064

Ivanov Andrei M., DM Sci (habil.), professor, corresponding member of RAS, head of Dept of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, president of the Association 'Federation of Laboratory Medicine of Russia'². ORCID: 0000-0002-8899-7524

Nikitin Yuri V., clinical allergologist-immunologist at Centre of Clinical Laboratory Diagnostics, Lecturer at Dept of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics². ORCID: 0000-0001-7892-2783

Sukhina Irina A., PhD Bio, lecturer at Dept of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics². ORCID: 0000-0003-1984-2497

Kirilkin German E., clinical resident at Dept of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course in Molecular Medicine¹. ORCID: 0000-0001-8913-984x

Loseva Alina P., 6th year student of General Medicine Faculty¹. ORCID: 0009-0004-0561-9133

Melikhova Dar'ya V., 6th year student of General Medicine Faculty¹. ORCID: 0009-0009-0456-5512

Nosulya Polina N., 6th year student of General Medicine Faculty³. ORCID: 0009-0004-7679-4721

Zabirov Sergei Sh., PhD Med, member of the Union of Rehabilitologists of Russia, head of Centre for Medical Rehabilitation, head of Dept of Medical Rehabilitation of Adults with CNS Disabilities, neurologist⁴. ORCID: 0000-0001-6348-0759

Emanuel Yuliy V., PhD Med, neurologist, associate professor at Dept of Neurology and Manual Medicine of Faculty of Postgraduate Education¹. ORCID: 0000-0001-5649-6090

Barantsevich Evgenii R., DM Sci (habil.), professor, chief neurologist of the North-Western Federal District, chairman of the Association of Neurologists of Saint Petersburg, head of Dept of Neurology and Manual Medicine of Faculty of Postgraduate Education¹. ORCID: 0000-0003-3804-3877

¹First Saint Petersburg State Medical University n.a. I.P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

²Military Medical Academy n.a. S.M. Kirov, Saint Petersburg, Russia

³North-Western State Medical University n.a. I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

⁴City Clinical Hospital n.a. St. Luke, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author: Emanuel Yuliy V. E-mail: ejvcons@mail.ru

For citation: Emanuel V.S., Lugovaya A.V., Ivanov A.M., Nikitin Yu.V., Sukhina I.A., Kirilkin G.E., Loseva A.P., Melikhova D.V., Nosulya P.N., Zabirov S. Sh., Emanuel Yu.V., Barantsevich E.R. Relationship between biomarkers of autophagy and inflammation in acute period of ischemic stroke. *Medical alphabet.* 2023; (33): 37–43. https://doi.org/10.33667/2078-5631-2023-33-37-43