

# КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ СОТРЯСЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Норка А.О.<sup>1</sup>, Воробьев С.В.<sup>1</sup>, Емелин А.Ю.<sup>2</sup>, Кузнецова Р.Н.<sup>3</sup>, Кудрявцев И.В.<sup>4</sup>, Серебрякова М.К.<sup>4</sup>, Коваленко С.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, 194100, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, 194044, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, Санкт-Петербург, Россия

Черепно-мозговая травма остается одной из наиболее часто встречающихся форм патологии головного мозга. Ее актуальность определяется как высокой распространенностью, так и значительными финансовыми затратами, связанными с лечением и реабилитацией пострадавших. В общей структуре травм преобладают ее легкие формы. Одним из проявлений комплекса биохимических и патофизиологических реакций, запускающихся в мозге в ответ на травму, является иммунологический ответ. В то же время тонкие механизмы его функционирования и их роль в патогенезе заболеваний остаются предметом дискуссии. **Цель исследования** — изучить роль иммунологических реакций в патогенезе легкой травмы мозга. **Материалы и методы.** Обследованы 22 пациента в возрасте от 20 до 45 лет с сотрясением головного мозга. В контрольную группу вошли 37 практически здоровых лиц в возрасте от 20 до 46 лет. Обследование включало сбор жалоб, анамнеза заболевания, оценку соматического и неврологического статуса, нейропсихологическое тестирование. Объектом лабораторного исследования служила венозная кровь. Основное внимание было уделено Т-хелперам центральной (СМ, CD45RA–CD62L+) и эффекторной (ЕМ, CD45RA–CD62L–) памяти, оценку которых проводили с применением многоцветного цитометрического анализа. **Результаты.** При поступлении в стационар пациенты предъявляли ряд жалоб, имеющих общий и когнитивный характер. При оценке неврологического статуса доминировали симптомы поражения мозжечка. Результаты нейропсихологического обследования позволили установить, что у больных преобладают нейродинамические и регуляторные нарушения. При анализе основных стадий созревания Th-клеток в крови пациентов с сотрясением головного мозга при сравнении с группой контроля отмечалось достоверное увеличение как относительного, так и абсолютного содержания Т-хелперов центральной памяти. В то же время процентное содержание ЕМ Th у пострадавших было несколько снижено. Также у пациентов с травмой среди Th-клеток центральной памяти снижалось относительное содержание Th1-клеток и возрастало относительное содержание Th17-клеток. Кроме того, в рамках пула СМ Th при сотрясении головного мозга наблюдается увеличение доли сразу трех типов Th17 — CCR6+DN Th17, Th17.1 и «классических» CCR4+CXCR3– Th17. **Обсуждение.** Изменения в субпопуляции Т-хелперов центральной памяти и Т-хелперов периферической памяти среди клеток CD3+CD4+ могут рассматриваться в качестве предиктора течения сотрясения головного мозга в остром периоде. При этом Т-клетки, принимающие участие в аутоиммунитете, не обязательно отражают сбой иммунной системы. Возможно, что в основе снижения уровня Th1 в циркуляторном русле у пациентов с травмой мозга лежит рекрутирование клеток иммунной системы. Было обнаружено также увеличение доли Th17 среди Т-хелперов центральной памяти, патрулирующих лимфоидную ткань, уже через сутки после травмы мозга. Данное обстоятельство может указывать на тот факт, что уже на ранних этапах после повреждения нервной ткани запускаются процессы, приводящие к формированию «провоспалительных» клеток, что позволяет рассматривать эти лимфоциты в качестве одной из основных популяций иммунокомпетентных клеток, обладающих нейродеструктивным эффектом.

**Ключевые слова:** черепно-мозговая травма; сотрясение головного мозга; субпопуляции лимфоцитов CD4+; CD45RA-негативных Th памяти; СМ-клетки памяти; ЕМ-клетки памяти.

**Для цитирования:** Норка А.О., Воробьев С.В., Емелин А.Ю., Кузнецова Р.Н., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Коваленко С.Н. Комплексная оценка клинико-иммунологических нарушений у пациентов в остром периоде сотрясения головного мозга. *Российский неврологический журнал*. 2020;25(5):21–28. DOI 10.30629/2658-7947-2020-25-5-21-28

**Для корреспонденции:** Емелин А.Ю. — e-mail: emelinand@rambler.ru

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

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Информация об авторах**

Норка А.О., <https://orcid.org/0000-0001-6483-7043>; e-mail: norka-anna@mail.ru

Воробьев С.В., <https://orcid.org/0000-0002-4830-907X>; e-mail: sergiognezdo@yandex.ru

Емелин А.Ю., <https://orcid.org/0000-0002-4723-802X>; e-mail: emelinand@rambler.ru

Кузнецова Р.Н., <https://orcid.org/0000-0003-4932-6733>; e-mail: kuznetzova.raisa@yandex.ru

Кудрявцев И.В., <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>; e-mail: igorek1981@yandex.ru

Серебрякова М.К., <https://orcid.org/0000-0003-2596-4220>; e-mail: m-serebryakova@yandex.ru

Коваленко С.Н., <https://orcid.org/0000-0002-0357-4742>

## COMPREHENSIVE ASSESSMENT OF CLINICAL AND IMMUNE DISORDERS IN PATIENTS WITH ACUTE CONCUSSION

Norka A.O.<sup>1</sup>, Vorobev S.V.<sup>1</sup>, Emelin A.Yu.<sup>2</sup>, Kuznetsova R.N.<sup>3</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>4</sup>, Serebriakova M.K.<sup>4</sup>, Kovalenko S.N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup>S.M. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of Russia, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup>First St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine», Saint Petersburg, Russia

**Abstract.** *Introduction.* Craniocerebral trauma remains one of the most common forms of brain pathology. Its relevance is determined by both, high prevalence and significant financial costs associated with the treatment, and rehabilitation of injured. Mild forms predominate in the general structure of injury. Immune response is one of the manifestations characteristic for a complex of biochemical and pathophysiological reactions triggered in the brain in response to injury. At the same time, the subtle mechanisms of its functioning and their role in pathogenesis of diseases remain the subject of discussion. Our research was aimed to study the role of immune reactions in the pathogenesis of mild brain injury. **Materials and methods.** 22 patients with concussion (aged from 20 to 45) were examined. The control group included 37 healthy individuals aged 20 to 46. The examination included the collection of complaints, medical history, assessment of somatic and neurological status, neuropsychological testing. The object of laboratory research was venous blood. Attention was mainly paid to the T-helpers of central (CM, CD45RA–CD62L+) and effector (EM, CD45RA–CD62L–) memory, which were evaluated using multicolored cytometric analysis. **Results.** Patients presented complaints of general and cognitive nature upon admission to the hospital. Cerebellar lesion symptoms dominated while neurological status evaluation. Neuropsychological examination allowed us to detect neuro-dynamic and regulatory disorders predominance. While conducting the analysis of the main stages of cell maturation in the blood of patients with concussion, it was noted that there was a significant increase in both, relative and absolute content of central memory T-helpers compared to the control group. At the same time, the percentage of EM Th in those with injury was slightly reduced. Also, in patients with injured Th cells of central memory, the relative content of Th1 cells decreased and the relative content of Th17 cells increased. In addition, within the CM Th pool, there was an increase in the proportion of three types of Th17 — CCR6+DN Th17, Th17.1 and «classic» CCR4+CXCR3– Th17. **Conclusion.** Changes in T-helpers of central memory and T-helpers of peripheral memory subpopulation among CD3+CD4+ cells can be considered as a predictor of the course of concussion in the acute period. However, T cells involved in autoimmunity, do not necessarily reflect the immune system disorders. It is possible that the basis for the decrease in the Th1 level in the circulatory bed in patients with brain injury is the recruitment of immune cells. An increase in the proportion of Th17 was also detected among T-helpers of central memory patrolling the lymphoid tissue the other day after the brain injury. This circumstance may indicate the fact that in the early stages after the nervous tissue damage, processes leading to the formation of «pro-inflammatory» cells are triggered. It allows us to consider these lymphocytes as one of the main populations of immunocompetent cells possessing a neuro-destructive effect.

**Key words:** brain injury; concussion; subpopulations of CD4+ lymphocytes; CD45RA– Th memory; CM memory cells; EM memory cells.

**For citation:** Norka A.O., Vorobev S.V., Emelin A.Yu., Kuznetsova R.N., Kudryavtsev I.V., Serebriakova M.K., Kovalenko S.N. Comprehensive assessment of clinical and immune disorders in patients with acute concussion. *Russian Neurological Journal (Rossijskij Nevrologicheskij Zhurnal)*. 2020;25(5):21–28. (Russian). DOI 10.30629/2658-7947-2020-25-5-21-28

**For correspondence:** Emelin A.Yu. — e-mail: emelinand@rambler.ru

**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

**Acknowledgements.** The study had no sponsorship.

### Information about authors

Norka A.O., <https://orcid.org/0000-0001-6483-7043>; e-mail: norka-anna@mail.ru

Vorobev S.V., <https://orcid.org/0000-0002-4830-907X>; e-mail: sergiognezdo@yandex.ru

Emelin A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-4723-802X>; e-mail: emelinand@rambler.ru

Kuznetsova R.N., <https://orcid.org/0000-0003-4932-6733>; e-mail: kuznetzova.raisa@yandex.ru

Kudryavtsev I.V., <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>; e-mail: igorek1981@yandex.ru

Serebriakova M.K., <https://orcid.org/0000-0003-2596-4220>; e-mail: m-serebriakova@yandex.ru

Kovalenko S.N., <https://orcid.org/0000-0002-0357-4742>

Received 03.03.20

Accepted 24.03.20

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) остается одной из наиболее часто встречающихся форм патологии головного мозга. Актуальность ее определяется как значительным отрицательным действием, которое травма мозга оказывает на социальные и бытовые

функции пациентов, так и высокими финансовыми затратами, связанными с лечением и последующей реабилитацией. Так, по имеющимся данным, в США ежегодно на лечение ЧМТ расходуется около 60 млрд долларов. При этом средние расходы

ведения больных с легкой травмой составляют 2700 долларов, тяжелой — более 150 000 долларов. Совокупные траты на одного пациента, включающие терапию и последующую реабилитацию, достигают 2 млн долларов. В России суммарные годовые потери вследствие перенесенной травмы мозга составляют до 2,6% от валового внутреннего продукта [1, 2]. При этом необходимо отметить, что в общей структуре ЧМТ превалирует так называемая легкая травма, включающая сотрясение (СГМ) и ушиб головного мозга легкой степени тяжести. По данным эпидемиологических исследований на ее долю приходится 80–90% от всех травм головного мозга, составляя от 100 до 749 случаев на 100 000 населения [3]. В то же время именно ввиду кажущейся «несерьезности» наблюдающихся нарушений далеко не всегда наблюдению за этой группой больных уделяется должное внимание. Зачастую это происходит вследствие недопонимания важности проблемы со стороны самих пострадавших, не вовремя или вовсе не обращающихся за медицинской помощью. Именно этим объясняется тот факт, что после этого вида травмы у ряда больных происходит длительное сохранение ряда жалоб и персистирование неврологических симптомов, а в некоторых случаях и формирование новых, трансформирующихся в последующем в симптомокомплекс, получивший название посттравматической энцефалопатии.

В настоящее время известно, что в ответ на травматическое повреждение головного мозга запускается комплекс биохимических и патофизиологических реакций, определяющих возникновение тех или иных клинических проявлений ЧМТ. Одним из таких механизмов является иммунологический ответ на повреждение, который сопровождается изменением соотношения субпопуляций Т-хелперов и их функций, степень и характер которых зависят от тяжести ЧМТ [4]. Т-клетки играют важную роль в развитии и поддержании вторичного повреждения после травмы мозга посредством взаимодействия различных типов клеток. Так, для острого периода известен феномен «критического периода», когда количество Т-хелперов становится ниже уровня цитотоксических Т-лимфоцитов. Данные изменения лежат в основе так называемого исходного механизма иммунорегуляторных нарушений, способствующего развитию воспалительных осложнений [5]. Более того, в течение 1–5 суток после ЧМТ в нервную ткань начинают проникать Т-лимфоциты из периферической крови, способствуя развитию иммунопосредованных реакций [6]. Также особый интерес представляют данные о том, что при большинстве нейровоспалительных заболеваний в очагах повреждения нервной ткани обнаруживаются скопления CD3-позитивных лимфоцитов, способных к экспрессии гена IL-17 и синтезу данного цитокина, ассоциированного с воспалительными и аутоиммунными реакциями [7]. В то же время тонкие механизмы функционирования Т-хелперов и их роль в патогенезе заболеваний, сопровождающихся формированием воспалительной реакции, остаются

предметом дискуссии. Появившиеся за последнее время новые методы позволяют значительно расширить горизонт наших знаний и решить ряд имеющихся проблем. Именно этим обусловлена актуальность, научная и практическая значимость анализа изменений субпопуляционного состава Т-хелперов периферической крови на ранних сроках перенесенной ЧМТ.

**Материалы и методы.** С целью изучения особенностей влияния иммунологических изменений на формирование клинической картины легкой ЧМТ нами были обследованы 22 пациента в возрасте от 20 до 45 лет с сотрясением головного мозга, находившихся на лечении в городской больнице № 26 города Санкт-Петербурга. Среди них было 8 женщин и 14 мужчин. Обследование включало сбор жалоб, анамнеза заболевания, оценку соматического и неврологического статуса по стандартной методике. Нейропсихологическое тестирование включало помимо скрининговых методик также и тесты, показавшие свою эффективность при использовании у больных с острой ЧМТ и ее последствиями [8]. Первоначально проводилась оценка пострадавших по шкале комы Глазго. В исследование брались больные с результатом 13 и более баллов. Полный протокол тестирования включал:

1. Краткую шкалу оценки психического статуса (Mini-Mental State Examination — MMSE).
2. Методику «Батарея исследования лобной дисфункции» (Frontal Assessment Battery — FAB).
3. Тест «10 слов».
4. Тест «таблицы Шульце».
5. Монреальскую шкалу оценки когнитивных функций (Monreal Cognitive Assessment — MoCA).
6. Тест рисования часов.
7. Символьно-цифровой тест.
8. Тест на ориентацию и амнезию Гальвестона.

Для исключения структурного поражения головного мозга применялись компьютерная и/или магнитно-резонансная томография. В контрольную группу вошли 37 практически здоровых лиц, не имевших неврологической и соматической патологии, а также нарушений иммунного статуса. Из них — 24 мужчины и 13 женщин в возрасте от 20 до 46 лет. Все обследование проводилось в день поступления больных.

Объектом лабораторного исследования служила венозная кровь. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными Л.А. Байдуном и соавт. [9]. Для выявления Т-хелперов — фенотип CD3+CD4+ — периферической крови использовали антитела против CD3 (клон UCHL1) и CD4 (клон 13B8.2). Для разделения общего пула Th-клеток на основные стадии созревания применяли антитела против поверхностных CD45RA (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4)) и CD62L (клон DREG56). В рамках данной работы основное внимание было уделено Т-хелперам центральной (CM, CD45RA–CD62L+) и эффекторной (EM,

CD45RA–CD62L–) памяти. В работе использовали антитела против CD3, CD4, CD45RA и CD62L, конъюгированные с APC-Alexa Fluor 750, Pacific Blue, FITC и PE соответственно (Beckman Coulter, США), а антитела против CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 были конъюгированы с Brilliant Violet 510™, PE/Cy7, APC и PerCP/Cy5.5 соответственно (Biolegend, США). Разрушение эритроцитов проводили с применением лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США) — к 975 мкл *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США), инкубацию с которым проводили в защищенном от света месте при комнатной температуре на протяжении 15 минут. После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали стерильным физиологическим раствором (330 g 7 минут), после чего полученный клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2–7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных осуществляли при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.5 (Beckman Coulter, США). Оценку коэкспрессии хемокиновых рецепторов CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 проводили тактикой «гейтирования», основанной на построении иерархических дендрограмм для CD45RA-негативных Th памяти, CM- и EM-клеток памяти, описанной ранее [10].

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Результаты выражали в виде процента позитивных клеток от искомой популяции и приводили в виде медианы и интерквартильного размаха (Q25; Q75). Сравнение уровней экспрессии основных хемокиновых рецепторов Т-хелперами различных стадий дифференцировки проводили при помощи U-критерия Манна–Уитни.

**Результаты.** При поступлении в стационар пациенты предъявляли ряд жалоб, имеющих общий и когнитивный характер. Значительное количество пострадавших отмечали головную боль, повышенную утомляемость, а также указывали на снижение памяти на текущие события и ухудшение умственной работоспособности (95,5%). Реже больные обращали внимание на нарушение концентрации внимания (90,1%), головокружение (81,8%), повышенную сонливость (54,5%), тошноту (36,4%).

В клинической картине при оценке неврологического статуса доминировали симптомы поражения мозжечка: горизонтальный нистагм, шаткость и неустойчивость в позе Ромберга, интенционное дрожание при выполнении координаторных проб. Эти изменения были зафиксированы у всех больных. У 86,4% пациентов отмечены истончение или отсутствие поверхностных брюшных рефлексов, у 72,7% — повышение или асимметрия глубоких рефлексов, у 54,5% выявлялись двусторонние патологические кистевые

Таблица 1

Результаты нейропсихологического тестирования больных, перенесших сотрясение головного мозга (M ± S)

| Использованные методики                         |                                  | Результаты |
|-------------------------------------------------|----------------------------------|------------|
| MMSE, баллы                                     |                                  | 28,1 ± 1,9 |
| FAB, баллы                                      |                                  | 15,0 ± 1,6 |
| Тест «10 слов», количество слов                 | Непосредственное воспроизведение | 6,9 ± 1,2  |
|                                                 | Отсроченное воспроизведение      | 7,2 ± 0,9  |
| Символьно-цифровой тест, количество символов    |                                  | 39,1 ± 3,4 |
| Тест «таблицы Шульце», секунды                  | Первое предъявление              | 34,8 ± 4,7 |
|                                                 | Второе предъявление              | 38,1 ± 4,4 |
|                                                 | Третье предъявление              | 40,0 ± 5,5 |
|                                                 | Четвертое предъявление           | 41,9 ± 5,6 |
|                                                 | Пятое предъявление               | 44,5 ± 5,1 |
| MoCA, баллы                                     |                                  | 25,5 ± 3,2 |
| Тест рисования часов, баллы                     |                                  | 8,6 ± 1,4  |
| Тест на ориентацию и амнезию Гальвестона, баллы |                                  | 89,5 ± 9,5 |

Table 1

Neuropsychologic testing results in patients after brain concussion (M ± S)

| Tests used                                        |                              | Results    |
|---------------------------------------------------|------------------------------|------------|
| MMSE, points                                      |                              | 28.1 ± 1.9 |
| FAB, points                                       |                              | 15.0 ± 1.6 |
| Test «10 words», number of words                  | Spontaneous reproduction     | 6.9 ± 1.2  |
|                                                   | Delayed reproduction         | 7.2 ± 0.9  |
| Digit-symbol substitution test, number of symbols |                              | 39.1 ± 3.4 |
| Schulte Table, sec                                | 1 <sup>st</sup> presentation | 34.8 ± 4.7 |
|                                                   | 2 <sup>nd</sup> presentation | 38.1 ± 4.4 |
|                                                   | 3 <sup>rd</sup> presentation | 40.0 ± 5.5 |
|                                                   | 4 <sup>th</sup> presentation | 41.9 ± 5.6 |
|                                                   | 5 <sup>th</sup> presentation | 44.5 ± 5.1 |
| MoCA, points                                      |                              | 25.5 ± 3.2 |
| Clock-drawing test, points                        |                              | 8.6 ± 1.4  |
| Galveston Orientation and Amnesia Test, points    |                              | 89.5 ± 9.5 |

рефлексы (Россолимо, Вартенберга). Остальные симптомы поражения центральной нервной системы (ЦНС) отмечались значительно реже. В большинстве случаев регресс патологической симптоматики наблюдался в течение 6–8 суток от момента травмы. Однако в некоторых случаях имело место сохранение отдельных симптомов в более поздние сроки.

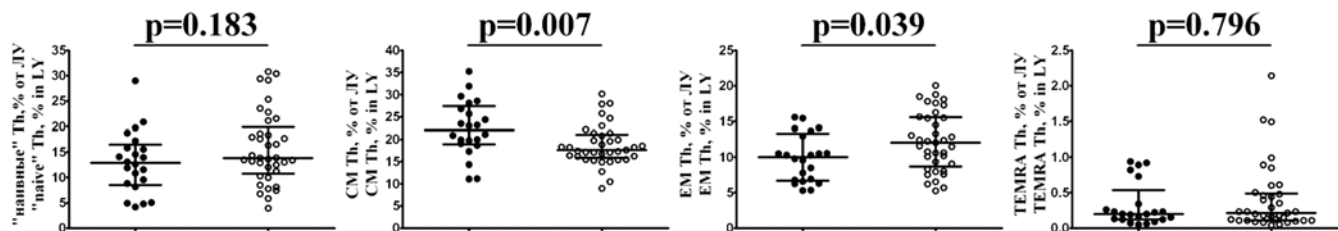
Проведение нейропсихологического обследования, выполненное в течение первых суток при поступлении в стационар, позволило установить, что у больных преобладают нейродинамические и регуляторные нарушения, возникающие вследствие поражения первого и третьего функциональных блоков согласно теории динамической локализации высших корковых функций А.Р. Лурии. Они проявлялись снижением концентрации внимания, его истощаемостью, повышенной отвлекаемостью, замедлением темпа мышления, снижением активности и мотивации к выполнению действий, сложности при переключении с одной задачи на другую. На этом фоне отмечаются нарушения памяти на текущие события. При этом подсказки при выполнении мнестических заданий, как правило, эффективны. Кроме того, в ряде случаев у пострадавших

отмечались элементы ретроградной и конградной амнезии. Необходимо отметить, что наибольшей эффективностью верификации имеющихся когнитивных нарушений обладают задания с ограничением по времени, требующие устойчивого внимания, быстрого темпа мышления и способности переходить от одного теста к другому. Общие сведения представлены в табл. 1.

При анализе содержания Т-лимфоцитов (CD3+) в периферической крови пациентов с СГМ и условно здоровых добровольцев достоверных различий между сравниваемыми группами выявлено не было. Так, уровень Т-лимфоцитов у пациентов с СГМ составлял 1346 кл/мкл (1147; 1716), а их относительное содержание — 75,45% (72,66; 81,30), что достоверно не отличалось ( $p = 0,814$  и  $p = 0,839$  соответственно) от значений группы контроля (1326 кл/мкл (1181; 1560) и 75,86% (73,76; 80,44) соответственно). При сравнении относительного и абсолютного содержания Т-хелперов периферической крови (Th, CD3+CD4+) нами также достоверных различий между пациентами с СГМ и здоровыми добровольцами выявлено не было (45,91% (41,82; 49,82) и 48,62% (41,93; 52,61) при  $p = 0,433$ , а также 797 мк/мкл (694; 1014) и 806 кл/мкл (730; 973) при  $p = 0,938$  соответственно).

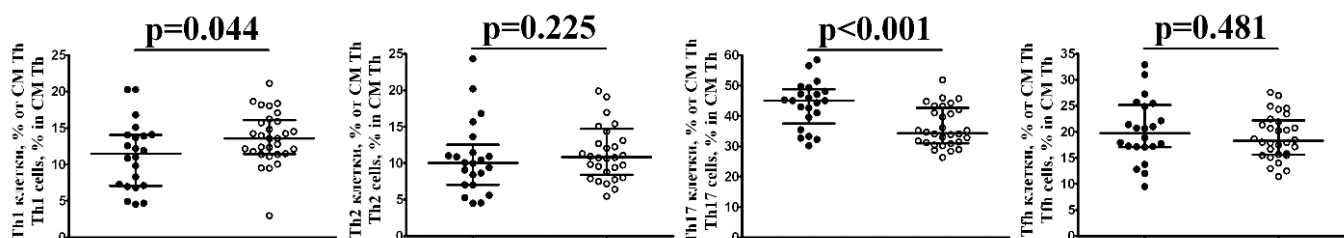
При анализе основных стадий созревания Th-клеток в крови пациентов с СГМ при сравнении с группой контроля отмечалось достоверное увеличение как относительного (22,03% (19,07; 26,80) против 17,58% (16,17; 20,81) при  $p = 0,007$ , так и абсолютного (403 кл/мкл (317; 543) против 309 кл/мкл (266; 364) при  $p = 0,020$ ) содержания Т-хелперов центральной памяти. В тоже время процентное содержание EM Th у пациентов с СГМ было несколько снижено относительно группы сравнения (10,04% (6,79; 12,96) и 12,06% (9,08; 15,50) соответственно, при  $p = 0,039$ ). По остальным популяциям Т-хелперов достоверных различий между сравниваемыми группами отмечено не было (рис. 1).

В ходе дальнейших исследований особое внимание было уделено Т-хелперам центральной памяти, которые способны к рециркуляции в пределах лимфоидной ткани, что позволяет охарактеризовать процессы дифференцировки и «поляризации» лимфоцитов CD3+CD4+, протекавших в периферических лимфоидных органах. На поверхности этих клеток нами был проведен анализ экспрессии ключевых хемокиновых рецепторов CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5, при помощи которых выявлены следующие субпопуляции «поляризованных» Т-хелперов: Th1, экспрессирующие исключительно CXCR3



**Рис. 1.** Распределение Т-хелперов периферической крови пациентов с СГМ по основным популяциям, выявленным на основании анализа коэкспрессии CD45RA и CD62L. Относительное содержание слева направо «наивных» Th, Th центральной и эффекторной памяти, а также Th лимфоцитов популяции TEMRA соответственно. Выделение черным — пациенты с СГМ, белым — условно здоровые добровольцы

**Fig. 1.** Distribution of T-helpers of peripheral blood in patients with TBI among the main populations, identified based on the analysis of coexpression of CD45RA and CD62L. Relative content from left to right of «naive» Th, Th of central and effector memory, as well as Th lymphocytes of the TEMRA population, respectively. Patients with TBI are highlighted in black, conditionally healthy volunteers — in white



**Рис. 2.** Относительное содержание основных субпопуляций «поляризованных» Th среди Т-хелперов центральной памяти с фенотипом CD45RA–CD62L+. Слева направо — относительное содержание Th1-клеток с фенотипом CXCR5–CXCR3+CCR6–CCR4–, Th2 с фенотипом CXCR5–CXCR3–CCR6–CCR4+, общей популяции Th17 (CXCR5–CCR6+), а также общей популяции Tfh с фенотипом CXCR3+CD4+CD3+ соответственно. Выделение черным — пациенты с СГМ, белым — условно здоровые добровольцы

**Fig. 2.** Relative content of main subpopulations of «polarized» Th among T-helpers of central memory with the CD45RA–CD62L+ phenotype. From left to right — the relative content of Th1 cells with the CXCR5–CXCR3+CCR6–CCR4– phenotype, Th2 with the CXCR5–CXCR3–CCR6–CCR4+ phenotype, the general population of Th17 (CXCR5–CCR6+), as well as the general population of Tfh with the CXCR3 phenotype CD4+CD3+, respectively. Patients with TBI are highlighted in black, conditionally healthy volunteers — in white

(фенотип CXCR5–CXCR3+CCR6–CCR4–), Th2, позитивные только по CCR4 (фенотип CXCR5–CXCR3–CCR6–CCR4+), общий пул Th17 (фенотип CXCR5–CCR6+), а также общий пул фолликулярных клеток (Tfh) с фенотипом CXCR5+CD4+CD3+.

На рис. 2 показано, что у пациентов с СГМ среди Th-клеток центральной памяти снижалось ( $p = 0,044$ ) относительное содержание Th1-клеток с 13,57% (11,50; 15,91) до 11,47% (7,13; 14,03). Вместе с тем у пострадавших достоверно ( $p < 0,001$ ) возрастало относительное содержание Th17-клеток с 34,35% (31,20; 42,04) до 45,03% (39,51; 48,12).

В рамках общего пула CCR6-позитивных Т-хелперов (Th17) выделяют четыре независимые типа клеток, различающиеся не только по коэкспрессии хемокиновых рецепторов CCR4 и CXCR3, но и обладающие принципиально разными свойствами и функциями при запуске и поддержании воспалительной реакции в тканях [11, 12]. Так, в настоящее время принято выделять «дважды негативные» CCR4–CXCR3– или CCR6+DN Th17-лимфоциты, «неклассические» CCR4–CXCR3+ или Th17.1, «дважды позитивные» CCR4+CXCR3+ или CCR6+DP Th17, а также «классические» CCR4+CXCR3– Th17. На рис. 3 приведены результаты сравнения относительного содержания указанных выше популяций Th17 у пациентов с СГМ и условно здоровых добровольцев. Показано, что в рамках общего пула CM Th при СГМ наблюдается увеличение доли сразу трех типов Th17 — CCR6+DN Th17, Th17.1 и «классических» CCR4+CXCR3– Th17.

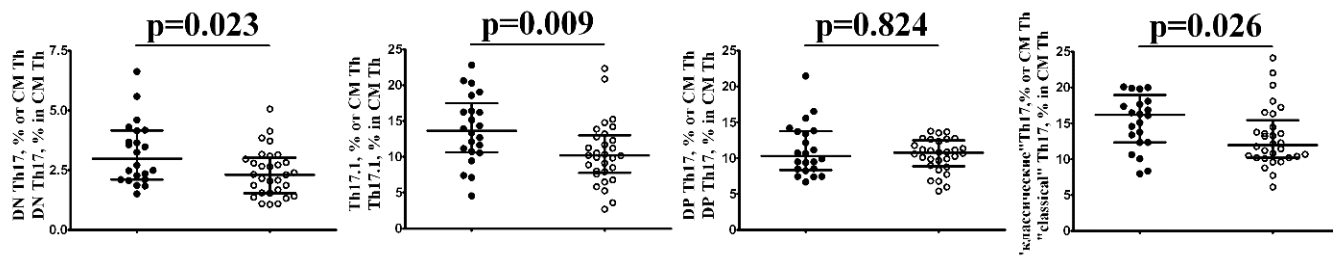
Корреляционный анализ позволил установить, что между выявленным нами изменением содержания ряда субпопуляций лимфоцитов и эффективностью выполнения определенных нейропсихологических тестов имеется достоверная связь. Так, между содержанием DN Th17-лимфоцитов и результатами выполнения таких методик, как MMSE, символично-цифровой тест, МоСА, установлена прямая корреляция, а с тестом «таблицы Шульце» — обратная. В тоже время концентрация Th1-клеток имела с данными тестами противоположную корреляционную связь. Общие данные представлены в табл. 2.

**Обсуждение.** Полученные на сегодняшний день данные позволяют рассматривать иммунные реак-

ции в числе ключевых звеньев патогенеза ЧМТ и ее последствий. Воспаление, опосредованное клетками иммунитета, играет двойственную роль, проявляя не только нейродеструктивные эффекты, но и участвуя в восстановлении поврежденной нервной ткани.

В 1999 г. Moalem и соавт. [13] было выдвинуто понятие «протективного аутоиммунитета» как важного физиологического механизма защиты ЦНС в случае ее повреждения, согласно которой аутоиммунные Т-клетки не обязательно отражают собой иммунной системы. Астроциты и микроглия поддерживают тканевой гомеостаз и в случае травмы головного мозга запускают каскад клеточных реакций, приводящий к продукции провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода и азота, которые далее воспринимаются цитокиновыми, Toll-подобными рецепторами (TLR). Эти сигналы вместе с IFN- $\gamma$ , секретируемым Th1 хориоидного сплетения, инициируют каскад, включающий активацию рецепторов интегрин (например, ICAM-1), хемокинов (например, CXCL 10), что приводит к рекрутированию клеток иммунной системы в ЦНС [14]. Возможно, что именно данный механизм может лежать в основе снижения уровня Th1 в циркуляторном русле у пациентов с ЧМТ, как это было показано нами.

Помимо этого, провоспалительные цитокины принимают участие в привлечении нейтрофилов в очаг поражения уже в первые часы после нанесения травмы [15]. Ключевую роль в регуляции функциональной активности нейтрофилов играют Th17 [16], экспрессия генов которых, способных «поляризовать» цитокины — IL-6 и TGF $\beta$ , — обнаруживается при моделировании ЧМТ в очагах повреждения. В ходе собственных исследований нами было обнаружено увеличение доли Th17 среди Т-хелперов центральной памяти, патрулирующих лимфоидную ткань, уже через сутки после нанесения ЧМТ. Данное обстоятельство может указывать на тот факт, что уже на ранних этапах после повреждения нервной ткани запускаются процессы, приводящие к формированию этих «провоспалительных» клеток. При этом известно, что при действии патологических факторов микроглия способна переходить в активированное состояние, образуя полипротеиновые



**Рис. 3.** Относительное содержание различных субпопуляций Th17 в периферической крови пациентов с СГМ среди Т-хелперов центральной памяти. Слева направо — относительное содержание DN Th17, Th17.1, DP Th17 и «классических» Th17, соответственно, в рамках общей популяции Т-хелперов центральной памяти у пациентов с СГМ (черным) и условно здоровых добровольцев (белым)

**Fig. 3.** The relative content of various Th17 subpopulations in the peripheral blood of patients with TBI among T-helpers of central memory. From left to right — the relative content of DN Th17, Th17.1, DP Th17 and «classical» Th17, respectively, within the general population of T-helpers of central memory in patients with TBI (black) and conventionally healthy volunteers (white)

Таблица 2

Содержание основных субпопуляций лимфоцитов в сыворотке крови больных, перенесших сотрясение головного мозга, и их корреляционные связи с нейропсихологическими тестами (M ± S)

| Субпопуляции лимфоцитов, абс. число |              | Нейропсихологические тесты и уровень корреляции по коэффициенту Спирмена |                         |       |                |                  |
|-------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------|----------------|------------------|
| норма                               | СТМ          | MMSE                                                                     | Символьно-цифровой тест | MoCa  | Таблицы Шульте | Тест Гальвестона |
| DN Th17                             |              |                                                                          |                         |       |                |                  |
| 2,4 ± 0,18                          | 3,22 ± 0,28  | 0,57                                                                     | 0,59                    | 0,57  | -0,63/-0,69    | -                |
| Th1                                 |              |                                                                          |                         |       |                |                  |
| 13,64 ± 0,65                        | 11,24 ± 0,99 | -0,51                                                                    | -0,61                   | -0,63 | 0,56/0,67      | -0,46            |

Table 2

The content of main subpopulations of lymphocytes in the blood serum of patients with concussion and their correlation with neuropsychological tests (M ± S)

| Subpopulations of lymphocytes, absolute number |              | Neuropsychological tests and correlation level (Spearman rank correlation coefficient) |                                |       |               |                                        |
|------------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------|---------------|----------------------------------------|
| norm                                           | TBI          | MMSE                                                                                   | Digit symbol substitution test | MoCa  | Schulte Table | Galveston Orientation and Amnesia Test |
| DN Th17                                        |              |                                                                                        |                                |       |               |                                        |
| 2.4 ± 0.18                                     | 3.22 ± 0.28  | 0.57                                                                                   | 0.59                           | 0.57  | -0.63/-0.69   | -                                      |
| Th1                                            |              |                                                                                        |                                |       |               |                                        |
| 13.64 ± 0.65                                   | 11.24 ± 0.99 | -0.51                                                                                  | -0.61                          | -0.63 | 0.56/0.67     | -0.46                                  |

комплексы, называемые «инфламмасомами». Эти комплексы провоцируют выделение провоспалительных каспаз, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  и компонента комплемента C1q, приводя к повреждению астроцитов и пролонгации нейровоспаления, что в свою очередь может способствовать развитию когнитивных нарушений [18, 19].

Как уже отмечалось ранее, Th17 можно разделить на несколько отдельных субпопуляций [12]. В ходе исследования впервые было показано, что у больных с ЧМТ в периферической крови на фоне снижения «классических» Th17 возрастали уровни DN Th17 и Th17.1. Следует отметить, что «классические» Th17 способны к синтезу большого количества IL-17A в ответ на стимуляцию, тогда как продукция остальных цитокинов, в первую очередь IL-22 и GM-CSF, у них менее выражена. Сравнительно недавно была детально описана популяция «неклассических» Th17 или Th17.1, обладающая характеристиками как Th1, так и Th17, к числу которых относятся экспрессия ядерных факторов TBX21 и RORC и способность к синтезу IFN- $\gamma$  и IL-17A [11]. Эти клетки по сравнению с «классическими» Th17-клетками секретируют *in vitro* большое количество GM-CSF, ответственного за привлечение и активацию нейтрофилов в очаге воспаления, а также IFN- $\gamma$ . Данные факты свидетельствуют о «провоспалительной» роли популяции Th1/Th17-клеток, то есть способствующей развитию и поддержанию воспалительной реакции в тканях. Широким спектром активностей, способствующих развитию в тканях воспалительных реакций, обладают также DN Th17. Так, CCR6+DN Th17 по сравнению с «классическими» Th17 экспрессировали больше IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-17F, MIP-3 $\alpha$ /CCL20 и TNF- $\alpha$  [12], а при сравнении CCR6+DN Th17 с Th17.1 было отмечено, что на фоне увеличенной экспрессии IL-17A и IL-17F они отличаются сниженной способностью к продукции IFN- $\gamma$  и TNF- $\gamma$ , хотя

уровни экспрессии GM-CSF и IL-22 были примерно одинаковыми. Кроме того, при сравнении способности к синтезу и секреции *in vitro* цитокинов Th17 было обнаружено, что именно CCR6+DN Th17 являются основными продуцентами IL-17F и IL-8, ответственных за привлечение и активацию нейтрофилов.

Проведенный нами анализ показал, что содержание DN Th17, способных быстро и эффективно привлекать нейтрофилы в очаг воспаления, демонстрирует прямую положительную корреляционную связь с более высокими показателями выполнения когнитивных тестов, тогда как Th1, активирующие астроциты нервной ткани, обладали абсолютно противоположным эффектом. Таким образом, на данном этапе нашей работы мы можем предполагать, что «воспалительный» механизм Th17, основанный на эффективном клиренсе очага воспаления за счет приведения из периферической крови нейтрофильных гранулоцитов, является адекватной и компенсаторной реакцией протективного иммунитета. Дальнейшие исследования, раскрывающие взаимодействия между Th1 и Th17, а также другими клетками иммунной системы у больных при ЧМТ, позволят разработать новые подходы к снижению воспалительного процесса и усилению процессов тканевой репарации. Данные результаты создают предпосылку для разработки новых терапевтических вариантов лечения ЧМТ с применением иммунотропных препаратов. Не менее значимым является анализ клеточных и молекулярных механизмов развития посттравматических осложнений. Исследования в этом направлении помогут выявить не только перспективные прогностические биомаркеры, но и определить новые мишени терапевтических воздействий.

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

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Потапов А.А., Лихтерман Л.Б., Кравчук А.Д., Корниенко В.Н., Захарова Н.Е., Ошоров А.В. и др. Современные подходы к изучению и лечению черепно-мозговой травмы. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2010;4(1):4–12. [Potapov A.A., Lihtermann L.B., Kravchuk A.D., Kornienko V.N., Zaharova N.E., Oshorov A.V. et al. Modern approaches to the study and treatment of traumatic brain injury. *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noj nevrologii*. 2010;4(1):4–12 (In Russian)].
2. Лихтерман Л.Б. Черепно-мозговая травма. Диагностика и лечение. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014:488. [Lihtermann L.B. Cherepno-mozgovaya travma. Diagnostika i lechenie. M.: GEOTAR-Media; 2014:488. (In Russian.)].
3. Peeters W., van den Brande R., Polinder S., Brazinova A., Steyerberg E.W., Lingsma H.F. et al. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir*. 2015;157:1683–1696. <https://doi.org/10.1007/s00701-015-2512-7>
4. Miller A.C., Rashid R.M., Elamin E.M. The 'T' in trauma: the helper T-cell response and the role of immunomodulation in trauma and burn patients. *J. Trauma*. 2007;63:1407–1417. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31815b839e>
5. Nizamutdinov D., Shapiro L. Overview of Traumatic Brain Injury: An Immunological Context. *Brain Sciences*. 2017;7:11. <https://doi.org/10.3390/brainsci7010011>.
6. Kelso M.L., Gendelman H.E. Bridge between neuroimmunity and traumatic brain injury. *Curr. Pharm. Des*. 2014;20(26):4284–98.
7. Tzartos J.S., Friese M.A., Craner M.J., Palace J., Newcombe J., Esiri M.M. et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol*. 2008;172(1):146–155. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070690>
8. Воробьев С.В., Одинак М.М., Емелин А.Ю., Емельянов А.Ю. Комплексная оценка неврологических и нейропсихологических изменений у больных с посттравматическими когнитивными нарушениями. *Медицина катастроф*. 2015;2:41–44. [Vorobev S.V., Odinak M.M., Emelin A.Yu., Emelyanov A.Yu. Comprehensive assessment of neurological and neuropsychological changes in patients with post-traumatic cognitive impairment. *Medicina katastrof*. 2015;2:41–44. (In Russian.)]. <https://doi.org/10.33266/2070-1004>
9. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (проект). *Медицинская иммунология*. 2012;14(3):255–268. [Hajdukov S.V., Bajdun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. Standardized technology “the study subpopulation composition of lymphocytes of peripheral blood with the use of a flow cytometer analyzer” (draft). *Medicinskaya immunologiya*. 2012;14(3):255–268. (In Russian.)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268>
10. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции. *Медицинская иммунология*. 2016;18(3):239–250. [Kudryavcev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Totolyan A.A. Chemokine receptors on T-helpers of various levels of differentiation: the main subpopulations. *Medicinskaya immunologiya*. 2016;18(3):239–250. (In Russian.)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2016-3-239-250>
11. Paulissen S.M., van Hamburg J.P., Dankers W., Lubberts E. The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2015;74:43–53. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2015.02.002>
12. Wacleche V.S., Goulet J.P., Gosselin A., Monteiro P., Soudeyns H., Fromentin R. et al. New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology*. 2016;13:59. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0293-6>
13. Moalem G., Leibowitz-Amit R., Yoles E., Mor F., Cohen I.R., Schwartz M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med*. 1999;5(1):49–55. <https://doi.org/10.1038/4734>
14. Schwartz M., Baruch K. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *EMBO Journal*. 2014;33(1):7–22. <https://doi.org/10.1002/embj.201386609>
15. Roth T.L., Nayak D., Atanasijevic T., Koretsky A.P., Latour L.L., McGavern D.B. Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. *Nature*. 2014;505(7482):223–228. <https://doi.org/10.1038/nature12808>
16. Kuchroo V.K., Awasthi A. Emerging new roles of Th17 cells. *Eur. J. Immunol*. 2012;42(9):2211–2214. <https://doi.org/10.1002/eji.201242872>
17. Rothhammer V., Heink S., Petermann F., Srivastava R., Claussen M.C., Hemmer B. et al. Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of  $\alpha 4$  integrin expression during. *J. Exp. Med*. 2011;208(12):2465–76. <https://doi.org/10.1084/jem.20110434>
18. Lu A., Magupalli V.G., Ruan J., Yin Q., Atianand M.K., Vos M.R. et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell*. 2014;156(6):1193–1206. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.008>
19. Liddel S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>